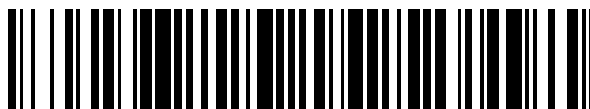


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 224**

51 Int. Cl.:

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 49/10 (2006.01)

A61K 49/18 (2006.01)

A61K 51/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.04.2013** **PCT/EP2013/057677**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.10.2013** **WO13153197**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2013** **E 13718146 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020** **EP 2836237**

54 Título: **Nanopartículas ultrafinas como agente de contraste multimodal**

30 Prioridad:

13.04.2012 FR 1253438

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.11.2020

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON I (20.0%)
43 boulevard du 11 Novembre 1918
69622 Villeurbanne Cedex, FR;
NANO-H (20.0%);
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (20.0%);
UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES (20.0%) y
UNIVERSITÉ DE BORDEAUX (20.0%)

72 Inventor/es:

CREMILLIEUX, YANNICK;
BIANCHI, ANDREA;
DUFORT, SANDRINE;
COLL, JEAN-LUC;
LUX, FRANÇOIS y
TILLEMENT, OLIVIER

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

Observaciones:

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

ES 2 791 224 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas ultrafinas como agente de contraste multimodal

5 Sector de la técnica

La presente divulgación se refiere a un nuevo uso de nanopartículas ultrafinas como agente diagnóstico, terapéutico o teranóstico, caracterizado por el modo de administración de las mismas por vía respiratoria. La invención se dirige igualmente a las aplicaciones derivadas de este nuevo modo de administración, particularmente para la formación de imágenes de los pulmones y el diagnóstico o pronóstico de patologías pulmonares. En el campo terapéutico, las aplicaciones previstas son las de agentes radiosensibilizadores o radioactivos para radioterapia (y opcionalmente curieterapia), para terapia con neutrones, agentes para fototerapia o termoterapia, particularmente para el tratamiento de tumores de pulmón.

15 Estado de la técnica

A pesar de los considerables esfuerzos de investigación, el cáncer sigue siendo una de las principales causas de mortalidad en el mundo (R. Siegel *et al.*: *Cancer Statistics* 2012, 2012, 62, 10-29). Entre los diferentes tipos de cáncer, el cáncer de pulmón constituye la causa principal de las muertes por cáncer (J. S. Guthi *et al.*, *Molecular Pharmaceutics*, 2009, 7, 32-40):

- se han calculado 1,4 millones de decesos mundiales al año,
- la tasa de supervivencia a los 5 años es inferior al 15 %.

La baja supervivencia de los pacientes que padecen cáncer de pulmón se debe principalmente a la ausencia de herramientas para el diagnóstico precoz y para vehiculizar localmente los agentes terapéuticos.

El uso de nanopartículas como agente de contraste en formación de imágenes médicas o como agente terapéutico es conocido desde hace más de dos décadas. En efecto, estas nanopartículas presentan numerosas ventajas con respecto a los compuestos moleculares:

- la detección mejora considerablemente debido a un número mayor de elementos activos por partículas, además, en el contexto de la IRM, mejora también la eficacia por el ion Gd^{3+} (P. Caravan, *Chem. Soc. Rev.*, 2006, 35, 512-523 / J. S. Ananta *et al.*, *Nat. Nano.*, 2010, 5, 815-821),
- se pueden injertar varias moléculas de un ligando particular por nanopartícula y/o combinar varios tipos de ligandos por nanopartículas a fin de aumentar la afinidad de las nanopartículas por determinados tejidos o tipos celulares en función de la aplicación prevista (E. Garanger *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, 2006, 4, 1958-1964 / Z.-H. Jin *et al.*, *Molecular Cancer*, 2007, 6, 41),
- su escala nanométrica les confiere propiedades nuevas y originales que se pueden utilizar en aplicaciones biomédicas (E. Boisselier, D. Astruc, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, 38, 1759-1782 / C. Xu, S. Sun, *Dalton Trans.*, 2009, 5583-5591 / P. Zrazhevskiy *et al.*, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, 39, 4326-4354),
- son rígidas y presentan poca interacción con el medio biológico.

El enfoque multimodal, en particular, consiste en utilizar un conjunto de nanopartículas que comprenden, cada una de ellas, varios agentes de contraste moleculares. De este modo permite combinar no solo diferentes técnicas de formación de imágenes, sino también diferentes técnicas de terapia al reagrupar varios agentes activos en terapia en una misma nanopartícula. Los agentes activos en formación de imágenes y los agentes activos en terapia pueden ser idénticos o diferentes entre sí.

Este enfoque es particularmente adecuado para el desarrollo de medicamentos en teranóstica. Particularmente, se pueden añadir otras funciones de formación de imágenes (luminiscencia, cintigrafía...), funciones terapéuticas (liberación de principios activos, radiosensibilización, curieterapia...) así como funciones de vectorización biológica para una concentración de agentes terapéuticos en la zona de interés. Este enfoque permite específicamente prever una terapia guiada por formación de imágenes determinando precisamente el comportamiento del agente teranóstico en el cuerpo mediante su biodistribución visualizada por formación de imágenes. El agente teranóstico se puede activar después (por rayos X, γ , neutrones, luz según el tipo de agente) en el momento mejor (cuando la concentración es máxima en la zona por tratar y mínima en los tejidos sanos).

La solicitud de patente WO 2009/053644 describe nanopartículas basadas en lantánidos (gadolinio en particular) y el uso de las mismas como agentes radiosensibilizadores. Divulga el uso de moléculas orgánicas en la superficie o en el revestimiento de las nanopartículas, a fin de mejorar específicamente la biodistribución y favorecer las concentraciones locales muy elevadas en las zonas tumorales.

La solicitud de patente WO 2011/135102 describe nanopartículas ultrafinas con un diámetro medio inferior a 5 nm, con una matriz de poliorganosiloxano funcionalizada y que incluye complejos metálicos, por ejemplo de gadolinio, y,

si se requiere, otros agentes de contraste o radiosensibilizadores. Estas nanopartículas ultrafinas presentan propiedades multimodales particularmente interesantes en la formación de imágenes médicas y en la terapia del cáncer. Tras una inyección intravenosa, se constata una excelente biodistribución y una eliminación renal rápida y completa debido a su pequeño tamaño, lo que limita los riesgos de efectos secundarios o tóxicos (F. Lux *et al.*, *Ange. Chem. Int. Ed.*, 2011, 123, 12507-12511).

El pulmón es un órgano único en el sentido de que se puede orientar selectivamente hacia él un agente diagnóstico o terapéutico por vía intravenosa o por vía respiratoria. No obstante, la administración de nanopartículas que se pueden usar como agente de contraste se efectúa convencionalmente mediante inyección intravenosa debido a los riesgos de retención a largo plazo en los pulmones (y, por tanto, de toxicidad asociada). (J. Roller *et al.*, *Nanomedicine*, 2011, 7, 753-762 /R. Rossin *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 2008, 49, 103-111).

En tomografía CT (*computed tomography* o tomografía computarizada), se ha descrito la administración por inhalación de nanopartículas basadas en elementos pesados (por ejemplo, oro (Cai, S. H. *et al.*, *Investigative Radiology*, 2007, 42, 797-806) y compuestos yodados (Aillon, *et al.*, *Molecular Pharmaceutics*, 2010, 7, 1274-1282). En formación de imágenes por resonancia magnética (IRM), solamente se han utilizado agentes de contraste negativos (nanopartículas basadas en óxidos de hierro (G. Huang *et al.*, *Chem.*, 2009, 19, 6367-6372)) por vía respiratoria por su baja toxicidad y su facilidad de síntesis y de funcionalización. No obstante, el uso de un agente de contraste negativo no es óptimo para la formación de imágenes del pulmón y el diagnóstico se podría mejorar mediante el uso de agentes de contraste positivos.

Para la formación de imágenes en fluorescencia, se han utilizado nanopartículas con emisión cercana al infrarrojo (NIR), tales como los puntos cuánticos (*quantum dots*), aunque su toxicidad inherente limita las aplicaciones clínicas posibles en el futuro (A. Zintcheko *et al.*, *Molecular Therapy*, 2009, 17, 1849-1856 / F-X. Blé *et al.* *Magnetic Resonance in Medicine* 62:1164-1174 2009) describen la síntesis y el comportamiento *in vivo* de moléculas capaces de marcar el moco a fin de estudiar los mecanismos de depuración mucociliares. Muestran la ventaja de utilizar un fluoróforo en el IR cercano así como un agente de contraste T₁ para sus macromoléculas. Este enfoque no permite obtener una señal IRM fuerte (4 Gd³⁺ para moléculas de más de 10 kDa) o, si no, es necesario utilizar polímeros de dextrano con pesos moleculares mucho más elevados (superiores a 70 kDa). Además, estos polímeros de tipo polisacárido son activos desde el punto de vista biológico y pueden interactuar con las glicoproteínas del moco para la fijación en los sitios ricos en enlaces de hidrógeno. El agente de contraste se elimina por expectoración y no permite obtener un realce de los tejidos pulmonares.

Así, hasta donde saben los inventores, la administración por vía respiratoria de agentes de contraste multimodales de nanopartículas basadas en gadolinio no se ha descrito nunca para la formación de imágenes IMR T₁ de los pulmones. Los inventores han demostrado ahora que una administración por vía respiratoria de agentes de contraste en forma de nanopartículas ultrafinas (con un diámetro medio inferior a 10 nm, incluso inferior a 5 nm, por ejemplo comprendido entre 1 y 5 nm) permite una distribución del agente de contraste particularmente favorable para la formación de imágenes del pulmón o la terapia de patologías pulmonares y una eliminación renal satisfactoria, limitando así los riesgos de toxicidad, inherentes a este tipo de estructuras.

Objeto de la invención

La invención viene definida por las reivindicaciones.

La presente divulgación pretende satisfacer al menos uno de los siguientes objetos:

- (i) proponer nuevos modos de administración tópica de agentes de contraste multimodales en formación de imágenes (por ejemplo, IRM T₁, cintigrafía PET o SPECT, fluorescencia en el IR cercano, tomografía de rayos X) y que sean poco tóxicos;
- (ii) proponer nuevos métodos de formación de imágenes que permitan una detección fiable de patologías pulmonares, en particular tumores de pulmón o el remodelado bronquial en el asma severa, asociados eventualmente a un acto terapéutico,
- (iii) proponer nuevos agentes diagnósticos, terapéuticos o teranósticos para las patologías pulmonares, en particular el cáncer de pulmón o el asma, agentes que presentan un gran potencial en IRM T₁ conjugado con otras modalidades de formación de imágenes, una distribución pulmonar adecuada, un paso a la sangre y una eliminación renal eficaz,
- (iv) proponer nuevos medios de administración de profármacos o de agentes de contraste, que requieren pocos dispositivos y que permiten reducir las dosis que se han de inyectar por una vía no invasiva, cómoda y no tóxica para el paciente.
- (v) proponer nuevos medios de vectorización hacia tumores no pulmonares, mediante una administración no invasiva, debido al paso a la sangre.

Estos objetos, entre otros, son conseguidos por la presente divulgación que se refiere, en un primer aspecto, a nanopartículas para su uso como agente terapéutico o como agente de contraste para la formación de imágenes médicas,

- con un diámetro medio comprendido entre 1 y 20 nm, preferentemente entre 1 y 10 nm y, aún más preferentemente, entre 2 y 5 nm o aún entre 1 y 5 nm,
- que comprende al menos un agente de contraste para la formación de imágenes médicas y/o un agente radiosensibilizador o radioactivo para radioterapia, un agente para terapia con neutrones, fototerapia o termoterapia,

y caracterizadas por que se administran a una persona o a un animal por vía respiratoria, particularmente intranasal o intratraqueal.

En un modo de realización preferente, se usan nanopartículas híbridas que comprenden:

- una matriz de poliorganosiloxano (POS) que incluye, como agente de contraste o radiosensibilizador, cationes de tierras raras M^{n+} , siendo n un número entero comprendido entre 2 y 4, opcionalmente en parte en forma de un óxido y/o un oxihidróxido metálico, opcionalmente asociado a cationes dopantes D^{m+} , siendo m un número entero comprendido entre 2 y 6, siendo D preferentemente un elemento de transición o una tierra rara;
- un agente quelante injertado en la matriz POS mediante enlaces covalentes -Si-C-, en cantidad suficiente para poder complejar todos los cationes M^{n+} y, si se requiere, D^{m+} ; estando preferentemente en exceso el agente quelante así injertado con respecto a los cationes M^{n+} y, si se requiere, D^{m+} ;
- si se requiere, una o varias moléculas de vectorización para la orientación selectiva de las nanopartículas, estando dicha molécula o moléculas de vectorización injertadas en la matriz POS o en el agente quelante.

En un segundo aspecto, la presente divulgación se refiere a un método de administración no invasivo de nanopartículas híbridas tales como las definidas anteriormente, caracterizado por que las nanopartículas híbridas se administran a una persona o a un animal por vía respiratoria en forma de aerosol.

En un tercer aspecto, la presente divulgación se refiere a un aerosol para la administración de un agente de contraste o terapéutico por vía respiratoria, que contiene nanopartículas tales como las definidas anteriormente y, si se requiere, un vehículo, fluido o disolvente farmacéuticamente aceptable. La presente divulgación se refiere a formulaciones farmacéuticas adecuadas para estos aerosoles y a un dispositivo de aerosol que las contiene.

En un cuarto aspecto, la presente divulgación se refiere a un método de control de la eficacia terapéutica de un tratamiento terapéutico en una persona o un animal, comprendiendo dicho método las etapas siguientes:

- al inicio del tratamiento se administran al paciente nanopartículas tales como las definidas anteriormente como agente de contraste, por vía respiratoria en forma de aerosol,
- se capturan las imágenes mediante una técnica de formación de imágenes adecuada a fin de visualizar las lesiones,
- se repiten las etapas (i) y (ii) a lo largo del tratamiento del paciente, tanto como sea necesario,
- se deduce la eficacia terapéutica del tratamiento comparando la evolución de las lesiones en las imágenes a lo largo del tratamiento.

Este método se aplica ventajosamente al control de la eficacia de un tratamiento antitumoral, particularmente dirigido contra tumores de pulmón, o incluso para el control de la eficacia de un tratamiento contra una afección pulmonar inflamatoria, tal como el asma.

En un quinto aspecto, la presente divulgación se refiere a nanopartículas para sus usos terapéuticos contra el cáncer de pulmón, como agente radiosensibilizador, fotosensibilizador, radiactivo, en radioterapia, terapia con neutrones, curieterapia, fototerapia dinámica o termoterapia.

Descripción detallada de la invención

Nanopartículas usadas en las aplicaciones de acuerdo con la presente divulgación

La presente divulgación obtiene ventajas sorprendentes, puestas de manifiesto por los inventores, de una administración por vía respiratoria de determinadas nanopartículas que se pueden usar como agente de contraste, particularmente en IRM T₁. El conjunto de las aplicaciones que se derivan están asociadas así a las características químicas y estructurales de estas nanopartículas que se describen a continuación:

En efecto, la presente divulgación se refiere a nanopartículas para su uso como agente terapéutico o como agente de contraste para la formación de imágenes médicas, presentando dichas nanopartículas un diámetro medio comprendido entre 1 y 20 nm, preferentemente entre 1 y 10 nm y, aún más preferentemente, entre 2 y 5 nm o aún entre 1 y 5 nm, y comprendiendo al menos un agente de contraste para la formación de imágenes médicas y/o un agente radiosensibilizador o radioactivo para radioterapia, un agente para terapia con neutrones, fototerapia o termoterapia, estando caracterizadas dichas nanopartículas por que se administran a una persona o a un animal por vía respiratoria, particularmente intranasal o intratraqueal.

De acuerdo con la presente divulgación se usarán ventajosamente nanopartículas con un diámetro muy pequeño.

Se seleccionarán nanopartículas con un diámetro medio comprendido, por ejemplo, entre 1 y 10 nm y, aún más preferentemente, entre 2 y 5 nm o entre 1 y 5 nm, lo que permite una excelente distribución de las nanopartículas en los pulmones (y, por tanto, una detección fiable de las patologías pulmonares), un paso a la sangre y una eliminación renal rápida (y, por tanto, una baja toxicidad). En un modo de realización específico, dichas nanopartículas con diámetro muy pequeño, por ejemplo, comprendido entre 1 y 5 nm, son nanopartículas que comprenden al menos una matriz de poliorganosiloxano.

La distribución de tamaño de las nanopartículas se mide, por ejemplo, mediante un granulómetro comercial, tal como un granulómetro Zetasizer Nano-S de Malvern basado en la PCS (*Photon Correlation Spectroscopy* o espectroscopía de correlación fotónica). Esta distribución se caracteriza por un diámetro hidrodinámico medio.

En el contexto de la presente divulgación, por "diámetro medio" se entiende la media armónica de los diámetros de las partículas. Un método de medición de este parámetro se describe igualmente en la norma ISO 13321:1996.

En el contexto de la invención, por "agente de contraste" se entiende cualquier producto o composición usado en la formación de imágenes médicas con el fin de aumentar artificialmente el contraste, lo que permite visualizar una estructura anatómica particular (por ejemplo determinados tejidos o un órgano) o patologías (por ejemplo tumores) de estructuras próximas o no patológicas. El principio de funcionamiento del agente de contraste depende de la técnica de formación de imágenes utilizada.

La estructura exacta del agente de contraste o del agente radiosensibilizador se determinará en función de la aplicación deseada.

En una variante preferente, para las aplicaciones de formación de imágenes por resonancia magnética (IRM), las nanopartículas contienen preferentemente cationes metálicos de tierras raras y, de manera más preferente aún, un lantánido que presenta comportamiento magnético tal como Gd o Dy (o Eu para la CEST), y que representa al menos un 10 % del conjunto de los cationes metálicos presentes en la partícula. Las nanopartículas basadas en un lantánido, por ejemplo gadolinio, permiten un uso como agente de contraste positivo en IRM T₁, particularmente apropiado para la formación de imágenes de los pulmones.

Así, en un modo de realización preferente, las nanopartículas comprenden cada una de ellas un agente de contraste o radiosensibilizador, seleccionado entre un lantánido, un óxido y/o un oxihidróxido de lantánido, seleccionando preferentemente el lantánido entre Dy, Lu, Gd, Ho, Eu, Tb, Nd, Er, Yb o mezclas de los mismos y, aún más preferentemente, gadolinio.

Ventajosamente, y como es bien conocido, se podrá combinar el uso de las nanopartículas en terapia y para una detección *in vivo* en IRM, lo que permite, por ejemplo, la monitorización de una terapia. Preferentemente, se seleccionarán como agente radiosensibilizador únicamente lantánidos, e incluyendo al menos un 50 % en masa de gadolinio (Gd), disprosio (Dy), lutecio (Lu) u holmio (Ho) o mezclas de los mismos, por ejemplo al menos un 50 % en masa de gadolinio.

De acuerdo con una variante, se usarán nanopartículas en las que, la parte que contiene lantánidos contiene en su periferia lantánidos que generan una señal IRM, por ejemplo gadolinio, y al menos otro lantánido en su parte central. Los lantánidos con número atómico elevado que absorben las radiaciones están situados preferentemente en el centro del núcleo de la nanopartícula.

De acuerdo con otra variante, es conocido que cierto número de lantánidos presentan secciones eficaces de captura de neutrones asociada a una reacción muy energética, lo que permite su uso en tratamientos por terapia con neutrones, por ejemplo contra el cáncer. Se podrá seleccionar, si se requiere en la terapia prevista, un lantánido que presente una sección eficaz de captura suficiente para tal fin, de modo que permita igualmente un tratamiento por terapia con neutrones. Para este fin, la elección del gadolinio (¹⁵⁷Gd) resulta particularmente interesante y se usarán lantánidos como agente de contraste constituido por al menos un 50 % en masa de gadolinio.

En un modo de realización preferente, las nanopartículas que se pueden usar de acuerdo con la presente divulgación se caracterizan por que comprenden al menos un agente de contraste para la formación de imágenes IRM T₁, y al menos otro agente de contraste apropiado para una de las siguientes técnicas de formación de imágenes:

- (i) cintigrafía PET o SPECT,
- (ii) fluorescencia en el visible o en el infrarrojo cercano,
- (iii) tomografía de rayos X.

Aún más preferentemente, se seleccionan las nanopartículas de modo que tengan una relaxividad r₁ por partícula comprendida entre 50 y 5000 mM⁻¹.s⁻¹ y/o una relación másica de Gd de al menos un 5 %, por ejemplo de entre un 5 y un 50 %.

Para la formación de imágenes en cintigrafía, las nanopartículas comprenden un isótopo radioactivo que se puede usar en cintigrafía, y seleccionado preferentemente entre el grupo constituido por isótopos radioactivos de In, Tc, Ga, Cu, Zr, Y o Lu, por ejemplo: ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{177}Lu .

- 5 Para la fluorescencia en el infrarrojo cercano, se podrá usar, por ejemplo, un lantánido seleccionado entre Nd, Yb o Er.

10 Para la fluorescencia en el visible, se puede usar un lantánido seleccionado entre Eu o Tb. Estos agentes de contraste o terapéuticos están opcionalmente protegidos por un revestimiento de naturaleza orgánica, por ejemplo, una matriz de poliorganosiloxano.

15 Un modo de realización se refiere, por tanto, a nanopartículas híbridas de tipo núcleo-cáscara. Son conocidas en particular nanopartículas de tipo núcleo-cáscara, basadas en un núcleo constituido por un óxido de tierras raras y una matriz de poliorganosiloxano, opcionalmente funcionalizada (véanse específicamente los documentos WO 2005/088314 y WO 2009/053644).

20 Las nanopartículas pueden estar funcionalizadas mediante moléculas que permiten una orientación selectiva de las nanopartículas hacia tejidos específicos. La nanopartícula puede servir también como vector del agente radiosensibilizador y/o del agente de contraste, en función de las aplicaciones previstas. Estos pueden estar acoplados a la nanopartícula mediante enlaces covalentes o atrapados mediante una unión no covalente, por ejemplo, mediante encapsulación o interacción hidrófila/hidrófoba o por medio de un agente quelante.

En un modo de realización preferente, se usan nanopartículas híbridas que comprenden:

- 25 • una matriz de poliorganosiloxano (POS) que incluye, como agente de contraste o radiosensibilizador, cationes de tierras raras M^{n+} , siendo n un número entero comprendido entre 2 y 4, opcionalmente en parte en forma de un óxido y/o un oxihidróxido metálico, opcionalmente asociado a cationes dopantes D^{m+} , siendo m un número entero comprendido entre 2 y 6, siendo D preferentemente una tierra rara distinta de M, un actínido y/o un elemento de transición;
- 30 • un agente quelante injertado en la matriz POS mediante enlaces covalentes -Si-C-, en cantidad suficiente para poder complejar todos los cationes M^{n+} y, si se requiere, D^{m+} ; estando preferentemente en exceso el agente quelante así injertado con respecto a los cationes M^{n+} y, si se requiere, D^{m+} ;
- 35 • si se requiere, una molécula de vectorización para la orientación selectiva de las nanopartículas, injertada en la matriz POS o en el agente quelante.

En el caso de una estructura de tipo núcleo-carcasa, la matriz POS forma la capa superficial que rodea al núcleo basado en cationes metálicos. Su espesor, por tanto, puede variar de 0,5 a 10 nm y representar de un 25 a un 75 % del volumen total.

40 La matriz POS desempeña un papel de protección del núcleo frente al medio exterior (particularmente contra la hidrólisis) y optimiza las propiedades de los agentes de contraste (luminiscencia, por ejemplo). Permite igualmente la funcionalización de la nanopartícula, mediante el injerto de agentes quelantes y moléculas de vectorización.

Ventajosamente, el agente quelante se selecciona entre los productos siguientes:

- 45
- los productos del grupo de los ácidos policarboxílicos poliaminados y derivados de los mismos y, aún más preferentemente del subgrupo que comprende: DOTA, DTPA, EDTA, EGTA, BAPTA, NOTA y mezclas de los mismos;
 - los productos del grupo que comprende porfirina, clorina, 1,10-fenantrolina, bipyridina, terpiridina, cyclam, triazacilononano, sus derivados y mezclas de los mismos;
 - y mezclas de los mismos.
- 50

Si M es un lantánido, el agente quelante se selecciona ventajosamente entre los que presentan propiedades complejantes de los lantánidos, en particular entre aquellos cuya constante de complejación $\log(K_{C1})$ es superior a 15, preferentemente 20. Como ejemplos preferentes de quelantes, complejantes de los lantánidos, se pueden citar los que comprenden un motivo de ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), ácido 1,4,7-triazacilononano-1,4,7-triaacético (NOTA) o derivados de los mismos.

60 Además, en función de la aplicación prevista, las nanopartículas se dopan opcionalmente con otro catión metálico de tierras raras o de actínidos, por ejemplo un lantánido, incluso dos lantánidos diferentes, seleccionado al menos uno entre Eu y Tb.

Entre los actínidos, en una variante apropiada para aplicaciones de terapia asociada a reacciones nucleares, se seleccionará, por ejemplo, un radionucleido entre Ac, Th, Pa, Np, U y Pu.

Preferentemente, M y D se seleccionan entre los grupos de elementos siguientes: lantánidos, elementos de

transición, actínidos, elementos de los grupos Ib, IIa, IIIa, IIIb, Va, VIb, VIIb, VIII de la tabla periódica de acuerdo con el Manual de Merck - Undécima edición; preferentemente en los subgrupos que comprenden:

- 5
 - los lantánidos siguientes: Gd, Dy, Eu, Tb, Nd, Yb, Er, Ho, Lu;
 - Ib: Cu, Ag, Au;
 - IIa: Ca, Mg;
 - IIIa: Ga, In;
 - IIIb: Y;
- 10
 - Va: Bi;
 - VIb: Cr, Mo;
 - VIIb: Mn, Tc;
 - VIII: Fe, Ru, Pt, Rh, Ir.

15 Los elementos Gd y Dy son adecuados, por ejemplo, para nanopartículas útiles como agente de contraste en IRM.

Los elementos Eu, Tb, Nd, Yb y Er son adecuados, por ejemplo, para nanopartículas útiles como agente de fluorescencia.

20 Los elementos Ho y Lu son adecuados, por ejemplo, para nanopartículas útiles como agente de curieterapia. Los elementos Lu, Yb, Gd y Ho son adecuados, por ejemplo, para nanopartículas útiles como agente de radiosensibilización.

25 De acuerdo con una característica ventajosa de la presente divulgación, los cationes M^{n+} y/o D^{m+} se localizan en la superficie de las nanopartículas. De esto se deduce que estos cationes están cerca de moléculas de agua y, así, pueden tener en particular un importante efecto de realce de contraste T_1 en IRM. Esta mejora de los rendimientos de las nanopartículas usadas de acuerdo con la presente divulgación, es un indicador, entre otros, de la localización de los cationes M^{n+} y/o D^{m+} en la superficie.

30 *Nanopartículas ultrafinas funcionalizadas "sin núcleo"*

En un modo de realización más particularmente preferente, debido en especial a sus dimensiones muy reducidas, las nanopartículas que se pueden usar de acuerdo con la presente divulgación se obtienen a partir de una nanopartícula precursora que comprende:

- 35
 - un núcleo que comprende un óxido y/o un oxihidróxido metálico (M) de tierras raras, al menos en parte en forma catiónica M^{n+} , siendo n un número entero comprendido entre 2 y 4, opcionalmente dopado con un dopante (D) presente, al menos en parte, en forma catiónica D^{m+} , siendo m un número entero comprendido entre 2 y 6, preferentemente un elemento de transición;
- 40
 - al menos una capa de revestimiento que comprende poliorganosiloxanos (POS);
 - y, opcionalmente, un subrevestimiento que comprende un agente quelante C1 adecuado para complejar los cationes M^{n+} o una molécula hidrófila adecuada para asegurar la suspensión en agua de las nanopartículas;

45 estando sometida dicha nanopartícula precursora a una disolución completa o parcial del núcleo M mediante un agente modificador del pH y/o un quelante C2, idéntico o diferente a C1, adecuado para complejar la totalidad o una parte de los cationes M^{n+} y/o D^{m+} de modo que el diámetro medio de la nanopartícula así obtenida se reduzca a un valor comprendido entre 1 y 20 nm, preferentemente entre 1 y 10 nm, aún más preferentemente entre 2 y 5 nm o aún entre 1 y 5 nm.

50 Estas nanopartículas obtenidas según el modo descrito anteriormente no comprenden un núcleo encapsulado por al menos un revestimiento. Se obtienen tamaños constatados comprendidos entre 3 y 5 nm. Se habla entonces de nanopartículas ultrafinas.

55 Estas nanopartículas denominadas "ultrafinas" o "sin núcleo" opcionalmente se injertan con moléculas de vectorización y, en particular, moléculas que se orientan selectivamente a los tejidos de los pulmones como las descritas en el párrafo siguiente.

60 Preferentemente, los agentes quelantes C1 y/o C2 están presentes en las nanopartículas en una cantidad tal que la totalidad o una parte de los iones, en particular los cationes M^{n+} , incluso los D^{m+} , no están libres sino complejados. Mejor aún, el porcentaje másico de los elementos M y D implicados en los enlaces M-O-M o M-O-D o D-O-D o M-O-Si o D-O-Si, con respecto al número total de elementos M y D, es inferior o igual a, en orden creciente, preferentemente 10; 5; 2, 1; 0,5; 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} .

65 El número de quelantes C1 y/o C2 en las nanopartículas es superior al número de cationes restantes M^{n+} y/o D^{m+} , incluso de otros cationes (por ejemplo, Ca^{++} , Mg^{+}) añadidos opcionalmente además de los cationes M^{n+} y/o D^{m+} .

Este porcentaje de enlaces (óxidos) M-O-M o M-O-D o D-O-D o M-O-Si o D-O-Si, se puede medir mediante técnicas conocidas de tipo EXAFS, XPS, espectroscopía vibracional, microscopía electrónica de transmisión acoplada a análisis estructurales, etc.

- 5 Esta medición permite evaluar el número de enlaces específicos del núcleo, asimismo esta medición permite una medida cuantitativa de la presencia o no del núcleo y permite también evaluar las especies M o D que podrían disolverse fácilmente y encontrarse en forma iónica en solución.

- 10 Los quelantes C1 se pueden injertar en la superficie de partículas de polisiloxano o se pueden insertar directamente en el seno de la matriz POS. Una parte o la totalidad de estos quelantes se destinan a complejar cationes M^{n+} (por ejemplo de gadolinio), incluso D^{m+} . Otra parte de estos quelantes puede servir para la complejación de cationes endógenos a fin de asegurar una buena compatibilidad con los medios biológicos encontrados.

- 15 Uno de los principales intereses de las nanopartículas ultrafinas de acuerdo con la presente divulgación es que M y/o D pueden ser un agente activo en formación de imágenes (por ejemplo un agente de contraste) y/o en terapia.

- 20 Específicamente, M/M^{n+} (por ejemplo de gadolinio), incluso D/D^{m+} , presentan propiedades destacadas para aplicaciones biológicas en formación de imágenes y/o en terapia como, por ejemplo, propiedades magnéticas, fluorescentes, radioactivas (elemento de número atómico elevado) o radiosensibilizadores (X, gamma, beta, neutrones).

Estas nanopartículas, por tanto, se pueden usar como agente de contraste en sistemas de formación de imágenes como: IRM, cintigrafía SPECT, cintigrafía PET, formación de imágenes por fluorescencia, escáneres de rayos X.

- 25 Además de la funcionalización quelante, estas nanopartículas pueden ser modificadas (funcionalización) en la superficie con compuestos hidrófilos (PEG) y/o cargadas de otra forma a fin de adaptar su biodistribución en el seno del organismo y/o permitir un buen marcaje celular, en particular para el seguimiento de las terapias celulares.

- 30 Se pueden funcionalizar en la superficie, por ejemplo, mediante injerto de moléculas que se orientan selectivamente a los tejidos pulmonares o, debido a su paso a la sangre, mediante injerto de moléculas que se orientan selectivamente a determinadas zonas de interés del organismo, en particular zonas tumorales. De este modo, se concentra el agente transportado por estas nanopartículas en la zona de interés sin tener que aumentar de forma considerable las cantidades inyectadas como ocurre actualmente.

- 35 La funcionalización se puede efectuar también mediante compuestos que comprenden un principio activo y/o compuestos luminiscentes (fluoresceína). De ella resultan posibilidades de usos terapéuticos como agente radiosensibilizador en combinación con radioterapias, terapias con neutrones, como agente radioactivo para tratamientos de curieterapia, como agente para la PDT (terapia fotodinámica) o como agente de vectorización de moléculas con efecto terapéutico.

- 40 Otra característica de estas nanopartículas ultrafinas es el mantenimiento del carácter rígido de los elementos y de la geometría global de las partículas después de la inyección. Esta elevada rigidez tridimensional está asegurada por la matriz de polisiloxano, en la que la mayoría de los átomos de silicio están unidos a otros 3 o 4 átomos de silicio mediante un puente de oxígeno. La combinación de esta rigidez con su tamaño pequeño permite aumentar la relaxividad de estas nanopartículas para las frecuencias intermedias (20 a 60 MHz) con respecto a los compuestos comerciales (complejos a base de Gd-DOTA, por ejemplo), aunque también para frecuencias superiores a 100 MHz presentes en las IRM de alto campo de nueva generación.

- 50 Esta rigidez, no presente en los polímeros, es también una ventaja para la vectorización y la accesibilidad de las moléculas de vectorización.

Por otro lado, se debe subrayar que la biocompatibilidad de estas nanopartículas no es la menor de sus cualidades.

- 55 Preferentemente, las nanopartículas de acuerdo con la presente divulgación y, en particular, de acuerdo con el presente modo de realización, tienen una relaxividad r_1 por ion M^{n+} que es superior a $5 \text{ mM}^{-1}(\text{de ion } M^{n+}) \cdot \text{s}^{-1}$, preferentemente $10 \text{ mM}^{-1}(\text{de ion } M^{n+}) \cdot \text{s}^{-1}$, para una frecuencia de 20 MHz. Por ejemplo, tienen una relaxividad r_1 por nanopartícula comprendida entre 50 y $5000 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Mejor aún, estas nanopartículas tienen una relaxividad r_1 por ion M^{n+} a 60 MHz que es superior o igual a la relaxividad r_1 por ion M^{n+} a 20 MHz. La relaxividad r_1 considerada en este caso es una relaxividad por ion M^{n+} (por ejemplo gadolinio). La r_1 se obtiene a partir de la fórmula siguiente: $1/T_1 = [1/T_1]_{\text{agua}} + r_1[M^{n+}]$.

En otra variante, las nanopartículas tienen una relación másica de agente de contraste IRM T_1 de tipo lantánido, preferentemente gadolinio, superior al 5 %, por ejemplo, comprendida entre un 5 % y un 50 %.

- 65 Se describen más detalles relativos a estas nanopartículas ultrafinas, a procedimientos de síntesis de las mismas y a sus aplicaciones en la solicitud de patente WO2011/135101, la cual se incorpora por referencia.

Las moléculas de vectorización

Las moléculas de vectorización se injertan en la superficie de la nanopartícula y/o en el interior del revestimiento. Se podrá utilizar un acoplamiento convencional con grupos reactivos presentes, opcionalmente precedido de una etapa de activación. Las reacciones de acoplamiento son conocidas por el experto en la técnica y se seleccionarán en función de la estructura de la capa superficial de la nanopartícula y de los grupos funcionales de la molécula de vectorización. Véase, por ejemplo, "Bioconjugate Techniques", G.T. Hermanson, *Academic Press*, 1996, en "Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity", Segunda Edición, W.T. Mason, ed. *Academic Press*, 1999. Se describen más adelante métodos preferentes de acoplamiento. Preferentemente, estas moléculas de vectorización se injertan en los agentes quelantes de nanopartículas según la variante de las nanopartículas ultrafinas "sin núcleo" tal como la descrita en el párrafo anterior.

Se seleccionarán las moléculas de vectorización en función de la aplicación prevista.

En un modo de realización preferente, se seleccionarán, por ejemplo, moléculas adecuadas para la vectorización activa hacia tumores, específicamente tumores de pulmón. A modo de ejemplo de moléculas de vectorización que se pueden injertar sobre las nanopartículas se pueden citar las moléculas que contienen el tripéptido RGD capaz de reconocer la integrina $\alpha_v\beta_3$. Tales péptidos y sus derivados (particularmente el pentapéptido cíclico) se describen en particular en el documento WO2004/026894.

Recientemente se ha observado que la integrina $\alpha_v\beta_3$ presentaba un perfil de expresión muy particular en el cáncer de pulmón. En tejidos sanos, este heterodímero es indetectable (con excepción de los osteoblastos) mientras que se expresa en aproximadamente 10^5 copias por célula esencialmente sobre la superficie ventral de las células endoteliales de los capilares de neoformación o de remodelado. La integrina, de hecho, está implicada en una unión con la matriz extracelular para permitir el anclaje y la movilidad de las células. Su accesibilidad por vía sanguínea, por tanto, es moderada. Por lo que se refiere a las células tumorales y, en particular, de cáncer de pulmón, la integrina $\alpha_v\beta_3$ es expresada en mayor cantidad en el frente de invasión del tumor y también por las células que escapan del tumor para formar metástasis. Aunque además, se ha constatado que el tumor induce un remodelado de los tejidos normales próximos, que viene acompañado de una sobreexpresión de la integrina $\alpha_v\beta_3$ sobre la superficie de las células normalmente negativas. Así, una administración de nanopartículas de acuerdo con 1 la presente divulgación, por vía respiratoria, por ejemplo mediante nebulización, comprendiendo dichas nanopartículas además, injertadas en su superficie, moléculas que se orientan selectivamente a la integrina $\alpha_v\beta_3$, tales como los péptidos que contienen el motivo RGD, permite una vectorización particularmente eficaz hacia tumores de pulmón, particularmente en comparación con una administración "convencional" por vía intravenosa.

Los inventores han constatado, además, que la administración de las nanopartículas por vía respiratoria permite alcanzar el torrente sanguíneo y, por tanto, otros tejidos mediante el paso a la sangre de las nanopartículas al nivel de los pulmones, y/o su absorción por el sistema celular inmunitario. Estas nanopartículas pueden efectuar así una vectorización tumoral pasiva o activa hacia tumores no pulmonares, a los que convencionalmente los agentes de contraste se orientan selectivamente por inyección intravenosa.

Asimismo, en determinados modos de realización, se seleccionarán moléculas que se orientan selectivamente a otros órganos y, en particular, a tejidos cancerosos.

Se han descrito moléculas de vectorización adecuadas para la orientación selectiva hacia tejidos tumorales, por ejemplo, en la publicación internacional WO01/00621 e incluyen derivados de amonio cuaternario, aptámeros, polipéptidos, anticuerpos...

Compuestos hidrófilos

De acuerdo con una variante de la presente divulgación, las nanopartículas se pueden funcionalizar sobre su superficie con compuestos hidrófilos seleccionados entre el grupo de los polioles, preferentemente entre el subgrupo que comprende glicoles, azúcares y mezclas de los mismos; dextranos, siendo particularmente preferentes el PEG y el PPG.

De acuerdo con una alternativa, estos compuestos hidrófilos se pueden seleccionar entre aquellos que tienen pesos moleculares inferiores a 2000 g/mol, preferentemente inferiores 800 g/mol. A continuación se dan ejemplos de compuestos hidrófilos, con su peso molecular (Mw) preferente:

- Poli(etilenglicol)bis(carboximetil) éter (PEG), $250 < Mw < 2000 \text{ g.mol}^{-1}$;
- Polioxietilen bis(amina), $250 < Mw < 2000 \text{ g.mol}^{-1}$;
- O-metil-O'-succinilpolietilenglicol, Mw del orden de 2000 g.mol^{-1} ;
- Metoxipolietilenglicolamina, Mw del orden de 750 g.mol^{-1} ;
- Ácido succínico y mercaptosuccínico;
- Azúcares, en particular glucosa y sus derivados, por ejemplo, los dextranos;

- Aminoácidos o péptidos hidrófilos (ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, cisteína, serina, treonina, glicina...);
- Y mezclas de los mismos.

Más en general, los compuestos hidrófilos comprenden ventajosamente funciones alcohol o ácido carboxílico o amina o amida o éster o éter-óxido o sulfonato o fosfonato o fosfinato y se unirán, preferentemente de forma covalente, a al menos un 10 % de los átomos de silicio del POS de la matriz.

Procedimiento de obtención de nanopartículas de acuerdo con la presente divulgación

De manera general, el experto en la técnica podrá fabricar con facilidad las nanopartículas usadas de acuerdo con la presente divulgación. Más precisamente, cabe destacar los elementos siguientes:

Para nanopartículas de tipo núcleo-carcasa basadas en un núcleo de óxido u oxihidróxido de lantánidos, se podrá utilizar un procedimiento de fabricación que emplea un alcohol como disolvente, tal como se describe, por ejemplo, en P. Perriat *et al.*, *J. Coll. Int. Sci.*, 2004, 273, 191; O. Tillement *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129, 5076 y P. Perriat *et al.*, *J. Phys. Chem. C*, 2009, 113, 4038.

Para la matriz POS, se pueden emplear diversas técnicas, derivadas de las iniciadas por Stoeber (Stoeber, W; *J. Colloid Interf Sci* 1968, 26, 62). Asimismo se puede utilizar el procedimiento empleado para el revestimiento descrito en Louis *et al.* (Louis *et al.*, 2005, *Chemistry of Materials*, 17, 1673-1682) o la solicitud internacional WO 2005/088314.

En la práctica, para la síntesis de nanopartículas ultrafinas, se forma una nanopartícula de tipo núcleo-carcasa con un núcleo de óxido de lantánido (por medio de un poliol modificado) y una carcasa de polisiloxano (mediante sol/gel), y este elemento tiene un tamaño, por ejemplo, de aproximadamente 10 nm (preferentemente 5 nanómetros). Se puede realizar así un núcleo de óxido de lantánido de tamaño muy pequeño (adaptable inferior a 10 nm) en un alcohol mediante uno de los procedimientos descritos en las publicaciones siguientes: Perriat *et al.*, *J. Coll. Int. Sci.*, 2004, 273, 191; O. Tillement *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129, 5076 y P. Perriat *et al.*, *J. Phys. Chem. C*, 2009, 113, 4038.

Estos núcleos pueden estar recubiertos con una capa de polisiloxano siguiendo, por ejemplo, un protocolo descrito en las publicaciones siguientes: C. Louis *et al.*, *Chem. Mat.*, 2005, 17, 1673 y O. Tillement *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129, 5076.

Se injertan en la superficie del polisiloxano quelantes específicos de los cationes metálicos implicados; también se puede insertar una parte en el interior de la capa aunque el control de la formación del polisiloxano es compleja y el simple injerto exterior da, para determinados tamaños muy pequeños, una proporción suficiente de injerto.

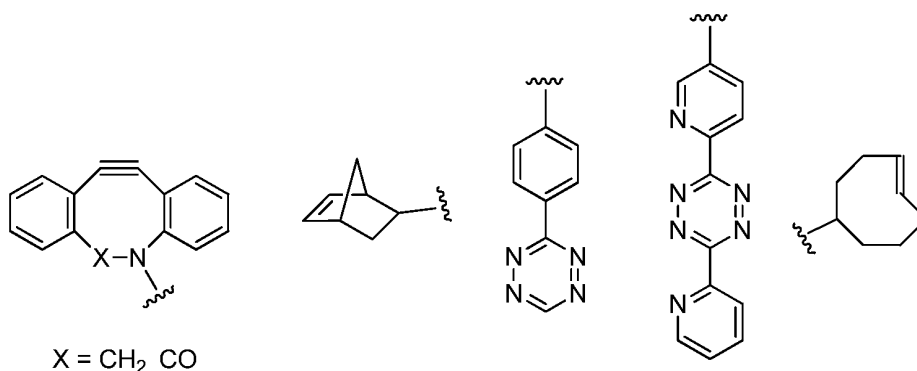
Se separan las nanopartículas de los residuos de síntesis mediante un método de diálisis o de filtración tangencial, sobre una membrana que comprende poros de tamaño adecuado.

El núcleo se destruye por disolución (por ejemplo modificando el pH o aportando moléculas complejantes a la solución). Esta destrucción del núcleo permite, por tanto, una dispersión de la capa de polisiloxano (según un mecanismo de desmoronamiento o de corrosión lenta), lo que permite obtener al final un elemento de polisiloxano de morfología compleja cuyas dimensiones características son del orden de la magnitud del espesor de la capa de polisiloxano, es decir, mucho menor que el de los elementos elaborados actualmente.

El hecho de retirar el núcleo permite así pasar de un tamaño de partículas de aproximadamente 5 nanómetros de diámetro a un tamaño de aproximadamente 3 nanómetros. Además, esta operación permite aumentar el número de M (por ejemplo gadolinio) por nm³ en comparación con una nanopartícula de polisiloxano teórica del mismo tamaño pero que comprende M (por ejemplo gadolinio) únicamente en la superficie. El número de M para un tamaño de nanopartícula se puede evaluar por medio de la relación atómica M/Si medida por EDX.

Sobre estas nanopartículas se pueden injertar moléculas de vectorización, por ejemplo por acoplamiento mediante enlace peptídico sobre un constituyente orgánico de la nanopartícula, como el descrito en Montalbetti, C.A.G.N., Falque B. *Tetrahedron* 2005, 61, 10827-10852.

Se podrá emplear también un método de acoplamiento que usa la "química clic" (*click chemistry*), Jewett, J.C.; Bertozzi, C.R. *Chem. Soc. Rev.* 2010, 39, 1272-1279, y en la que intervienen grupos del tipo: -N₃, -CN, -C=CH, o uno de los grupos siguientes:



En un modo de realización específico, la nanopartícula de acuerdo con la presente divulgación comprende un quelante que presenta una función ácida, por ejemplo el DOTA. Se procede a la activación de la función ácida de la nanopartícula, por ejemplo, empleando EDC/NHS (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida/*N*-hidrosuccinimida) en presencia de una cantidad adecuada de moléculas de vectorización. Las nanopartículas así injertadas se purifican después, por ejemplo, mediante filtración tangencial.

Modo de administración de las nanopartículas y aerosol que contiene las nanopartículas

De acuerdo con una característica esencial de la presente divulgación, las nanopartículas tales como las definidas anteriormente y, en particular, las nanopartículas ultrafinas sin núcleo, se administran por vía respiratoria en forma de aerosol.

Así, la presente divulgación se refiere a un aerosol para la administración de un agente de contraste o terapéutico en una persona o un animal por vía respiratoria, comprendiendo dicho aerosol, como agente de contraste o terapéutico, nanopartículas tales como las definidas en los párrafos previos y, más preferentemente, nanopartículas ultrafinas sin núcleo y, si se requiere, un vehículo, fluido o disolvente farmacéuticamente aceptable.

Por "vía respiratoria" se entiende el conjunto de vías aéreas del aparato respiratorio, que incluye la vía intranasal o la intratraqueal, en oposición específicamente a otros modos de administración de fármacos o agentes de contraste, constituidos en particular por la vía oral o la intravenosa. El fin es alcanzar los pulmones por inhalación de las nanopartículas.

Por "aerosol" se entiende una suspensión semiestable de gotitas líquidas (que contienen las nanopartículas) o de partículas sólidas dispersadas en un gas de soporte, por ejemplo aire.

El aerosol se obtiene así mediante un dispositivo apropiado de acuerdo con los parámetros centrados en la farmacología deseada o en el paciente. El dispositivo permite, por ejemplo, la atomización de un volumen determinado de una formulación líquida que contiene una suspensión coloidal de nanopartículas. Según la formulación y la dosis deseada, tales dispositivos incluyen, sin ser limitantes, un aerosol dosificador, un inhalador de polvo seco, un inhalador a base de líquido, un nebulizador (de aire comprimido/chorro), un nebulizador ultrasónico, un nebulizador de membrana vibrante/de malla). Para una revisión detallada de los inhaladores que se pueden utilizar (aunque no limitante), véase en particular el documento M. B. Dalovich *et al.*, *Lancet*, 2011, 377, 1032-1045.

Así, la presente divulgación se refiere igualmente a una formulación de nanopartículas, como las definidas en los párrafos previos, particularmente nanopartículas ultrafinas sin núcleo, estando caracterizada dicha formulación por que es adecuada para una administración mediante un aerosol. La formulación puede ser una formulación líquida que contiene las nanopartículas en forma de una suspensión coloidal estable, por ejemplo en agua estéril. De forma alternativa, puede ser un material seco obtenido de la liofilización de dicha formulación líquida que contiene la suspensión coloidal. Este material seco se rehidrata después en un volumen de líquido adecuado antes de su uso.

La presente divulgación se refiere igualmente a un inhalador que contiene una formulación líquida o liofilizada para un aerosol, tal como se ha descrito anteriormente.

A modo de ejemplo, para una formación de imágenes IRM de los pulmones, se preparará una formulación que contiene una dosis adecuada de nanopartículas ultrafinas sin núcleo, basadas en gadolinio y, opcionalmente, otro agente de contraste, estando dichas nanopartículas en suspensión en agua. La administración de esta formulación en forma de aerosol se efectúa por medio de un nebulizador en forma de una solución salina, tal como la descrita, por ejemplo, en la parte experimental.

Método de formación de imágenes médicas

La presente divulgación se refiere igualmente a un método de formación de imágenes médicas no invasivo en una

persona o un animal, que comprende las etapas siguientes:

- (i) se administran nanopartículas, tales como las definidas en los párrafos previos, particularmente nanopartículas ultrafinas sin núcleo, como agente de contraste IRM T₁, por vía respiratoria, por ejemplo en forma de aerosol,
- (ii) se capturan las imágenes IRM mediante una secuencia IRM apropiada.

El método de formación de imágenes no conlleva así ningún método invasivo y es particularmente cómodo para el paciente. En particular, no conlleva una inyección intravenosa de agente de contraste, siendo administrado este únicamente por vía respiratoria. Este método permite, si se requiere, una disminución de la dosis administrada por una administración local (en los pulmones) y una disminución de los efectos secundarios o tóxicos asociados a la administración de agentes de contraste.

La etapa (i) se ha descrito en el párrafo anterior.

Para la etapa (ii) se procede convencionalmente mediante un dispositivo IRM, seleccionando la secuencia IRM apropiada según el paciente, la zona de interés por estudiar y el tipo de imagen deseada, tal como se describe, por ejemplo, en "Comprendre l'IRM, manuel d'auto-apprentissage" de Bruno Kastler, Daniel Vetter. (Editor: Masson, 2011, ISBN: 9782294710445).

Las nanopartículas usadas de acuerdo con la presente divulgación son agentes de contraste multimodales. Así, se puede combinar, con una sola administración varias técnicas de formación de imágenes y, en particular, la IRM T₁, la cintigrafía PET (por ejemplo ⁶⁴Cu) o SPECT (¹¹¹In o ^{99m}Tc), la fluorescencia en el infrarrojo cercano, opcionalmente un agente radiosensibilizador, fotosensibilizador o adecuado en radioterapia, curieterapia, terapia con neutrones, fototerapia, etc.

En un modo particularmente preferente, el método se aplica a la formación de imágenes IRM de los pulmones y, en particular, a la formación de imágenes de tumores de pulmón. Para una formación de imágenes de tumores de pulmón, tras la administración de nanopartículas ultrafinas sin núcleo basadas en gadolinio, se seleccionará, por ejemplo, un contraste ponderado en T₁, con un tiempo de eco corto para maximizar la intensidad de la señal IRM pulmonar. Las técnicas de IRM empleadas tendrán en cuenta las especificidades de la IRM pulmonar, es decir, los movimientos respiratorios y cardíacos, la baja densidad tisular y la no homogeneidad magnética de este órgano ("MRI of the Lung", Hans Ulrich Kauczor, Ed. Springer, 2009, ISBN 55 9783540346180).

Debido a su administración a los pulmones, una aplicación evidente de los métodos de formación de imágenes de acuerdo con la presente divulgación se refiere al diagnóstico de patologías pulmonares, por ejemplo, patologías cancerosas (tumores de pulmón) y no cancerosas y, en particular, patologías pulmonares inflamatorias que incluyen, por ejemplo, el asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o, incluso, las bronconeumopatías crónicas obstructivas.

La presente divulgación se refiere igualmente a un método de control de la eficacia terapéutica de un tratamiento terapéutico en una persona o un animal, comprendiendo dicho método las etapas siguientes:

- (i) al inicio del tratamiento se administran al paciente nanopartículas tales como las definidas anteriormente como agente de contraste, por vía respiratoria en forma de aerosol,
- (ii) se capturan las imágenes mediante una técnica de formación de imágenes adecuada a fin de visualizar las lesiones,
- (iii) se repiten las etapas (i) y (ii) a lo largo del tratamiento del sujeto, tanto como sea necesario,
- (iv) se deduce la eficacia terapéutica del tratamiento comparando la evolución de las lesiones a lo largo del tratamiento.

Una aplicación particular de este método se refiere al control de la eficacia terapéutica de un tratamiento en una persona o un animal, por ejemplo, un tratamiento antitumoral, por ejemplo, mediante quimioterapia, radioterapia, curieterapia, fototerapia o termoterapia, contra los tumores de pulmón.

En un modo de realización preferente, la presente divulgación se dirige a un método de control de la eficacia terapéutica de un tratamiento antitumoral en una persona o un animal, particularmente un tratamiento de quimioterapia, radioterapia, curieterapia, fototerapia o termoterapia, dirigido contra los tumores de pulmón, comprendiendo dicho método las etapas siguientes:

- (i) se administran al paciente que padece cáncer, al inicio del tratamiento, nanopartículas tales como las definidas en los párrafos previos, particularmente nanopartículas ultrafinas sin núcleo, como agente de contraste, por vía respiratoria, por ejemplo en forma de aerosol,
- (ii) se capturan las imágenes mediante una técnica de formación de imágenes adecuada para detectar los tumores,
- (iii) se repiten las etapas (i) y (ii) a lo largo del tratamiento del paciente con un agente antitumoral,

(iv) se deduce la eficacia terapéutica del agente antitumoral comparando las imágenes de los tumores obtenidas a lo largo del tratamiento.

Así, se puede seguir la evolución de los tumores, particularmente el tamaño de los tumores a lo largo del tiempo, su número y su distribución, antes, durante y después del tratamiento del paciente. Se seleccionarán naturalmente nanopartículas que permitan una vectorización específica hacia los tumores tal como se ha descrito anteriormente.

Ventajosamente, en los métodos descritos previamente, las nanopartículas pueden ser usadas a la vez como agente de contraste, debido a su propiedad multimodal en formación de imágenes, por ejemplo como agente de contraste IRM T₁, y como agente radiosensibilizador, fotosensibilizador o radioactivo para el tratamiento de tumores.

Así, en el método descrito anteriormente, en un modo de realización particular, las nanopartículas usadas como agente de contraste son las mismas que las usadas como agente antitumoral.

Otra aplicación interesante de acuerdo con la presente divulgación se refiere al control de la eficacia terapéutica de afecciones pulmonares, en particular de patologías pulmonares inflamatorias tales como el asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o, incluso, las bronconeumopatías crónicas obstructivas, u otras patologías caracterizadas por un aumento del área de los vasos en la pared bronquial (angiogénesis) y una hiperpermeabilidad de las paredes bronquiales.

Aplicaciones terapéuticas con un aerosol de las nanopartículas

Junto con un agente radiosensibilizador para radioterapia, o radioactivos (y opcionalmente la curieterapia), para la terapia con neutrones, o con agentes para la PDT (terapia fotodinámica), las nanopartículas administradas en las vías respiratorias son particularmente útiles para el tratamiento de tumores y, en particular, para el tratamiento de tumores de pulmón.

Así pues, la presente divulgación tiene por objeto una composición farmacéutica que se puede usar para el tratamiento de tumores de pulmón, mediante quimioterapia, radioterapia, curieterapia, fototerapia o termoterapia, y que comprende nanopartículas como las definidas anteriormente, por ejemplo, nanopartículas ultrafinas sin núcleo, como agente radiosensibilizador, fotosensibilizador o radioactivo, opcionalmente en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable y/u otros principios activos o agentes de contraste que se pueden administrar por vía respiratoria.

Método de administración de un agente de contraste o terapéutico en el torrente sanguíneo

El modo de administración por vía respiratoria permite una administración local en los pulmones, aunque también el paso de las nanopartículas a la circulación sistémica. Así, acoplando moléculas terapéuticas a las nanopartículas (acoplamiento covalente o no covalente), la presente divulgación propone el uso de estas nanopartículas como vector de administración por vía respiratoria, al torrente sanguíneo, de moléculas terapéuticas o de un agente de contraste. Dependiendo del modo de acoplamiento de las moléculas terapéuticas, estos vectores se pueden usar como profármaco, de liberación controlada, prolongada o retardada del principio activo.

La presente divulgación se refiere igualmente a un método de tratamiento de un paciente, que comprende la administración por vía respiratoria en forma de aerosol de una dosis terapéuticamente eficaz de nanopartículas tales como las definidas en los párrafos previos, particularmente nanopartículas ultrafinas sin núcleo, como agente terapéutico.

Descripción de las figuras

Figura 1: a) IRM de los pulmones de un ratón antes (izquierda) y 15 minutos después (derecha) de la administración intratraqueal de nanopartículas SRP (40 microlitros con una concentración 20 mM en ion Gd³⁺). Se observa un realce del 183 % de la intensidad de la imagen después de la administración de las nanopartículas, b) formación de imágenes de fluorescencia 3D del ratón 1 hora después de la nebulización (50 µl) en los pulmones de nanopartículas SRP injertadas con la sonda fluorescente Cy5.5, c) visualización 3D de los pulmones antes (izquierda) y después (derecha) de la nebulización de nanopartículas SRP (50 µl con una concentración 20 mM en ion Gd³⁺) obtenida en microtomografía de rayos X (los "huecos" corresponden a la presencia de nanopartículas), d) realce de la señal IRM en los pulmones en función del tiempo (instilación de 40 µl de solución de SRP con una concentración 20 mM en ion Gd³⁺), la constante del tiempo de detección de las nanopartículas antes de la eliminación por vía renal es de aproximadamente dos horas. Todas las nanopartículas usadas en estos ejemplos se han sintetizado siguiendo el protocolo descrito en el ejemplo 1.

Figura 2: Imágenes de pulmones de ratones obtenidas antes (a) por IRM y (c) por formación de imágenes de fluorescencia óptica y 3 horas después de la administración intratraqueal de una solución de nanopartículas SRP obtenidas según el ejemplo 1 (acopladas a un fluoróforo Cy5.5 para la formación de imágenes de fluorescencia) (40 microlitros con una concentración 20 mM en ion Gd³⁺) (b) por IRM y (d) por formación de imágenes de

fluorescencia óptica. Las imágenes destacan la eliminación de las nanopartículas por vía renal (K (*kidney*): riñón; L (*lung*): pulmón). No se detectó ninguna eliminación hepática.

Figura 3: Evolución temporal del realce de la señal IRM en los riñones tras la administración intratraqueal de una solución de agente de contraste (50 mM Gd³⁺) obtenida según el ejemplo 1. La presencia de nanopartículas en los riñones aún se puede detectar 24 horas después de la administración de la solución.

Figura 4: Imagen IRM de alta resolución de la biodistribución del agente de contraste en los pulmones de un ratón después de la administración selectiva de la solución (50 mM Gd³⁺) en el pulmón izquierdo (a la derecha de la imagen). Las nanopartículas usadas se han obtenido según el ejemplo 1. Los principales parámetros de adquisición son: un tiempo de eco de 276 μ s, un espesor de corte de 0,5 mm, un campo de visión de 2,5 cm y un tiempo total de adquisición de 4 minutos.

Figura 5: Biodistribución de las SRP Cy5.5 24 h después de la nebulización intrapulmonar o la inyección intravenosa de una suspensión de partículas 10 mM de iones Gd³⁺. Las nanopartículas se obtienen según el ejemplo 1 con el acoplamiento de un fluoróforo de tipo Cy5.5 a la nanopartícula.

Figura 6: Vectorización pasiva hacia tumores pulmonares H358-Luc ortotópicos tras la inyección intravenosa o la nebulización intrapulmonar de una suspensión de nanopartículas. Las nanopartículas se obtienen según el ejemplo 1 con el acoplamiento de un fluoróforo de tipo Cy5.5 a la nanopartícula.

Figura 7: Curvas de control (Kaplan-Meier) obtenidas en ratones portadores de tumores pulmonares ortotópicos H358 tratados mediante irradiación única de 10 Gy o tratados mediante irradiación de 10 Gy efectuada 24 h después de la administración intrapulmonar de una suspensión de nanopartículas 20 mM de iones Gd³⁺.

Ejemplos

Productos químicos

El cloruro de gadolinio hexahidrato ([GdCl₃, 6H₂O], 99 %), el hidróxido de sodio (NaOH, 99,99 %), el tetraetoxisilano (Si(OC₂H₅)₄, TEOS, 98 %), el aminopropil-trietoxisilano (H₂N(CH₂)₃-Si(OC₂H₅)₃, APTES, 99 %), la trietilamina (TEA, 99,5 %), el hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC, > 98,0 %), la N-hidroxisuccinimida (NHS, > 97,0 %), el dianhídrido dietilentriaminopentaacético (DTPADA) y el anhídrido dimetilsulfóxido (DMSO, 99,5 %) se obtuvieron en Aldrich Chemicals (Francia). La Cy5.5 mono-NHS-éster se encargó a GE Healthcare. El dietilenglicol (DEG, 99 %) procede de SDS Carlo Erba (Francia) mientras que la acetona procede de Sodipro (Francia). El 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-anhídrido glutárico-4,7,10-ácido triacético (DOTAGA) lo suministró CheMatech SAS. CheMatech SAS. El tripéptido cíclico cRGD (Arg-Gly-Asp) procede de Genecust, Luxemburgo. La 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-trifenilclorina (TPC) procede de Frontier Scientific (Logan, Utah).

Caracterizaciones

Los tamaños medios de las nanopartículas indicadas se midieron mediante PCS (*Photon Correlation Spectroscopy* o espectroscopía de correlación fotónica) y corresponden a su diámetro hidrodinámico. Estas mediciones se efectuaron en un aparato de tipo Zetasizer Nano-S (el láser que se utiliza en la PCS es un láser He-Ne 633 nm). Las mediciones de zetametria se efectuaron en el mismo equipo diluyendo previamente las partículas en una solución 0,01 M de NaCl. El pH se ajustó *a posteriori*. Mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) se obtienen los datos estructurales y morfológicos de las muestras. Se efectúa utilizando un microscopio de tipo JEOL 2010 que opera a 200 kV. Las muestras se preparan mediante depósito sobre una rejilla de carbono. La relaxometría a 1,4 T (60 MHz) se mide mediante un equipo de tipo Bruker Minispec MQ60. La espectrometría de masas se efectúa mediante un espectrómetro de tipo LTQ (Thermo Fisher Scientific, San José, CA). Los análisis elementales se llevaron a cabo en el centro de análisis del CNRS en Solaise mediante ICP-MS y han hecho posible determinar las tasas de C, N, Si y Gd con una precisión mínima del 0,3 %. Los análisis de fluorescencia se obtuvieron en un espectrofluorímetro de tipo Varian Carry Eclipse. La liofilización de las partículas se efectuó en un equipo de tipo liofilizador Alpha 1,2 de Christ.

Animales

Los animales empleados para la prueba de concepto en IRM son ratones hembra de tipo Balb/c de 6 semanas de edad y que pesan entre 20 y 22 gramos. Estos ratones se adquirieron al criador Janvier (Le Genest, Saint-Isle, Francia). Los animales empleados para la prueba de concepto en formación de imágenes de fluorescencia y tomografía de rayos X son ratones hembra de tipo NMRI desnudos de 6 semanas de edad y que pesan aproximadamente 25 gramos. Estos ratones se adquirieron al criador Janvier (Le Genest, Saint-Isle, Francia). Antes del experimento, los ratones se aclimatan a su nuevo entorno en una sala a la temperatura controlada durante 1 semana. Los experimentos con animales se efectúan respetando las directrices del INSERM (Instituto nacional de salud e investigación médica) relativas al bienestar animal.

Herramientas de formación de imágenes:**IRM**

5 Las imágenes IRM se adquirieron en un espectrómetro Brucker Biospec 47/50 con un campo a 4,7 T (Brucker, Ettlingen, Alemania), utilizando una bobina emisora/receptora con un diámetro inferior a 25 mm (Rapid Biomedical, Rimpf, Alemania). Se colocaron los ratones sobre su vientre en un soporte de plástico y se mantuvieron anestesiados con una máscara de gas que liberaba un 2 % de isoflurano contenido en una mezcla de gas N₂/O₂ (80:20). La temperatura del cuerpo se mantiene constante mediante la circulación de agua caliente y el ciclo respiratorio se controla constantemente.

Para cada animal, se adquieren 6 cortes axiales de 1 mm de espesor. La adquisición se efectúa en respiración libre sin sincronización respiratoria o cardíaca mediante una secuencia de tipo UTE (*ultra short echo time* o tiempo de eco ultracorto) 2D multicortes. Los principales parámetros son: un tiempo de eco de 276 μ s, un tiempo de repetición de 84 ms, un ángulo de basculación de 60°, un campo de visión de 3 cm y un tiempo total de adquisición de 1 minuto.

Formación de imágenes de fluorescencia

Para efectuar la formación de imágenes de fluorescencia 2D o 3D *in vivo*, se anestesian los ratones (isoflurano/oxígeno: 3,5-4 % para la inducción y 1,5-2 % para el mantenimiento).

El sistema de formación de imágenes 2D está compuesto por un sistema de excitación compuesto por diodos que emiten a una longitud de onda de 660 nm. Las imágenes de fluorescencia así como las imágenes "en blanco y negro" se adquieren con una cámara CCD enfriada a -80 °C (ORCAII-BT-512G, Hamamatsu, Massy, Francia), equipada con un filtro de paso alto RG 9 (Schott, Jena, Alemania). La adquisición de imágenes así como el análisis se efectúan con el software Wasabi (Hamamatsu, Massy, Francia). 24 h después de la inyección los ratones se sacrifican y se obtienen imágenes de los órganos. Se obtiene una semicuantificación de la fluorescencia de los órganos dibujando regiones de interés (ROI) alrededor de los órganos.

La tomografía de fluorescencia se efectúa mediante un sistema de formación de imágenes 3D fDOT. El sistema está compuesto por una caja negra, una luz de excitación procedente de un láser (690 nm, 26 mW, Powertech, St Nom La Bretche, Francia) y de una cámara CCD (ORCA ER, Hamamatsu) equipada con un filtro de paso alto RG 9 (Schott, Jena, Alemania). La cartografía 3D de la fluorescencia en el ratón se calcula por medio de un algoritmo de reconstrucción.

Formación de imágenes de rayos X

Para efectuar la formación de imágenes de rayos X y la formación de imágenes de fluorescencia 2D o 3D *in vivo*, se anestesian los ratones (isoflurano/oxígeno: 3,5-4 % para la inducción y 1,5-2 % para el mantenimiento).

Las imágenes de tomografía de rayos X se adquieren con el Scanco, viva CT 40 (Scanco Medical, Inc., Bassersdorf, Suiza) empleando una energía de 65 keV y un tiempo de integración de 200 ms. Las reconstrucciones 3D de los pulmones materializan la presencia de aire en los pulmones. La presencia de partículas, por tanto, está representada como un "hueco" en las reconstrucciones, ya que las partículas ocupan en parte el lugar del aire.

Los presentes autores poseen igualmente un lecho que se adapta al escáner de rayos X y al tomógrafo de fluorescencia, que permite la superposición de las imágenes y la visualización de las colocalizaciones.

Ejemplo 1: Síntesis de nanopartículas híbridas de gadolinio de tipo Gd-Si-DOTA: SRP (Small Rigid Platforms o nanoplataformas rígidas)

Las nanopartículas se obtienen mediante una síntesis en 3 etapas tal como la descrita en el documento WO2011/135101. En primer lugar, se sintetizan los núcleos de óxidos en el dietilenglicol antes de un crecimiento de la capa de polisiloxano seguido de un injerto covalente de complejantes en la superficie de la nanopartícula; el núcleo de óxido de gadolinio se disuelve durante el paso por el agua lo que conlleva una fragmentación de las partículas que permite obtener partículas pequeñas de menos de 5 nanómetros compuestas únicamente por polisiloxano, especies orgánicas y complejantes útiles en la formación de imágenes.

La ventaja de esta vía de arriba a abajo (*top down*) es que permite obtener partículas muy pequeñas que poseen características multimodales que presentan a la vez la ventaja de poder ser eliminadas fácilmente por vía renal.

Descripción detallada de la síntesis**Núcleos de óxidos**

Se prepara una primera solución disolviendo 5,58 g de cloruro de gadolinio hexahidratado en 500 ml de dietilenglicol

(DEG) anhidro a temperatura ambiente. A esta primera solución se le añade una segunda solución de 500 ml de DEG que contiene 4,95 ml de hidróxido de sodio 10 M. La adición se efectúa a temperatura ambiente durante 24 h. Se obtiene una solución coloidal transparente con un tamaño medio para los núcleos de óxidos de 3,5 nm de diámetro (mediciones obtenidas en PCS y en microscopio TEM).

5

Encapsulación

El crecimiento de la capa de polisiloxano se efectúa mediante una reacción de sol-gel añadiendo dos precursores de silano (APTES y TEOS) en una proporción de 60/40 y trietilamina como catalizador. Para tal fin, se añaden 1050 μ l de APTES y 670 μ l de TEOS a la solución anterior con agitación vigorosa a 40 °C. Con el fin de obtener una fluorescencia en el IR cercano, se puede acoplar una cantidad variable de APTES a la Cy5.5 mono-NHS-éster mediante creación de un enlace amida entre el APTES y el fluoróforo. Tras 1 h de reacción, se añaden 2550 μ l de una solución de DEG que contiene trietilamina (0,1 M de TEA, 10 M de agua). La reacción de sol-gel anteriormente descrita se repite tres veces, cada vez con un intervalo de 24 h. Al final de estas diferentes etapas, la solución se deja en agitación a 40 °C durante 48 h. La solución coloidal final presenta partículas con un tamaño medio de 4,5 nm.

10

15

Funcionalización de la superficie

Por último, se añade un gran exceso de DOTAGA (2 DOTAGA por átomo de Gd) a las partículas haciendo posible la formación de un enlace peptídico entre las funciones amina disponibles de la superficie y una función ácido carboxílico del ligando. Se dispersan 13,76 g de DOTAGA en 200 ml de DMSO. Después de añadir la solución de partículas a la solución que contiene el DOTAGA, la mezcla se deja con agitación durante 48 horas más. Las nanopartículas se precipitan a continuación en 9 l de acetona. La acetona se retira y las partículas se lavan con 3 l de acetona adicionales y se recuperan mediante centrifugación. Las partículas se redispersan después en 200 ml de agua destilada, el exceso de acetona se evapora y seguidamente la solución se mantiene en agitación durante 24 h más. La purificación se lleva a cabo mediante centrifugación tangencial a través de membranas de tipo Vivaspin® (tamaño de poro: 5 kDa). Finalmente, las soluciones purificadas resultantes se liofilizan y luego se conservan en el refrigerador durante varios meses sin modificación del producto. Para obtener partículas más fluorescentes, también es posible añadir la Cy5.5 después del injerto, es decir, después de obtener las partículas por reacción directa de la Cy5.5 mono-NHS-éster con las funciones amina libres de la partícula. El análisis por fluorescencia de las partículas ha permitido demostrar que es posible injertar aproximadamente una Cy5.5 por partícula. El tamaño de estas nanopartículas se ha obtenido por espectroscopía de correlación de fluorescencia y se ha permitido obtener un diámetro hidrodinámico de 4 nm, ligeramente superior al obtenido sin fluoróforo

20

25

30

35

40

45

Las nanopartículas sin fluoróforo tiene un radio hidrodinámico de $3 \pm 0,1$ nm una vez rediluido en solución acuosa. La masa de las partículas se ha estimado en $8,5 \pm 1$ kDa después de un análisis de espectrometría de masas. La relaxividad longitudinal r_1 es de $11,4 \text{ mmol}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 60 MHz. A campo elevado (300 MHz), la relaxividad obtenida a 300 MHz es de $6 \text{ mmol}^{-1}\text{s}^{-1}$. El análisis elemental combinado con el tamaño de las partículas permite obtener un total de 10 DOTA, 27 Si y 7 Gd por partícula. Estos datos han sido confirmados mediante dosificación potenciométrica y fluorescencia del número de DOTA libres presentes por partícula. Antes del uso de las partículas para las aplicaciones biológicas, los DOTA libres se usan para quelar otros iones Gd^{3+} a fin de maximizar la r_1 por elemento ($114 \text{ mmol}^{-1}\text{s}^{-1}$ por elemento de media) o para quelar iones activos en cintigrafía SPECT o PET. Este método está descrito en la bibliografía (Lux *et al.*, *Ange. Chem. Int. Ed.*, 2011, 50, 12299). Se prepara una solución de inyección de estas nanopartículas diluyendo las partículas en una solución salina con un tampón HEPES a fin de fijar el pH. Una inyección intravenosa al nivel de la cola de roedores (ratas o ratones) ha permitido mostrar una eliminación renal de las partículas combinada con una vida útil plasmática dos veces mayor que el DOTAREM®.

Ejemplo 2: Funcionalización de nanopartículas para una vectorización activa hacia tumores: SRP-cRGD

50

55

60

Las nanopartículas usadas para el injerto son similares a las descritas en el ejemplo 1. Poseen, por tanto, un conjunto de DOTA libres (y, de este modo, funciones ácido carboxílico disponibles) para el injerto del cRGD, que es conocido por ser un vectorizador de la integrina $\alpha_v\beta_3$. El injerto del cRGD a la partícula se efectúa mediante un acoplamiento peptídico entre una función ácido carboxílico de una unidad DOTA y la función amina primaria del péptido cRGD. Las nanopartículas obtenidas en el ejemplo 1 se diluyen en agua (concentración próxima a 100 mM de Gd^{3+}). Se añade una mezcla de EDC y NHS (3,4 EDC y 3,4 NHS por Gd) a las partículas, el pH se ajusta a 5 y la mezcla se mantiene con agitación durante 30 minutos. El cRGD (2,3 cRGD por Gd) se disuelve aparte en DMSO anhidro. Después se añade a la solución anterior y el pH de la mezcla se ajusta a 7,1 antes de dejarla en agitación durante 8 horas. Por último, la solución se purifica mediante filtración tangencial a través de una membrana de 3 kDa antes de ser liofilizada. El análisis elemental permite subir a una tasa de cRGD de aproximadamente 2,5 por partícula. Se emplea el mismo protocolo para injertar el cRAD a las nanopartículas. Estas nanopartículas servirán de control durante los ensayos de vectorización activa efectuados con el cRGD.

Ejemplo 3: Análisis de la interacción de nanopartículas SRPcRGD obtenidas según el ejemplo 2 con células que expresan la integrina $\alpha_v\beta_3$ mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia.

65

Análisis por microscopía de fluorescencia

Se cultivan células HEK293 ($\beta 3$), que sobreexpresan la integrina $\alpha_v\beta_3$, sobre portaobjetos en placas de 12 pocillos (100 000 células por pocillo) durante una noche a 37 °C. Se enjuagan una vez con PBS 1X, después con PBS 1X que contiene CaCl_2 1 mM y MgCl_2 1 mM. A continuación se incuban durante 30 minutos a 4 °C (análisis de la fijación) o 30 minutos a 37 °C (análisis de la internalización), en presencia de SRP (nanopartículas según el ejemplo 1) con un fluoróforo de tipo Cy5.5, de SRP-cRGD (obtenidas según el ejemplo 2) Cy5.5 o de SRP-cRAD (obtenidas según el ejemplo 2 y que sirven de testigo negativo) Cy5.5 con una concentración 0,1 mM de iones Gd^{3+} . Después se enjuagan con PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (1 mM) y se fijan (10 minutos con paraformaldehído al 0,5 %). Los núcleos se marcan con Hoechst 33342 (5 μM durante 10 minutos) (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Francia). Tras un lavado con PBS 1X, los portaobjetos se montan con Mowiol. Las imágenes se adquieren con un microscopio Apotome (Carl Zeiss, Jena, Alemania).

Análisis por citometría de flujo

Antes del análisis de la fijación, las células adherentes (HEK293 ($\beta 3$)) se tratan con tripsina, luego se enjuagan una vez con PBS 1X frío (4 °C) y una segunda vez con PBS 1X $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (1 mM) frío. Se resuspende un millón de células en un volumen final de 200 μl en una solución de SRP Cy5.5, de SRP-RGD Cy5.5 o de SRP-RAD Cy5.5 con una concentración 0,1 mM de iones Gd^{3+} y se incuban durante 30 minutos a 4 °C. Tras dos enjuagues con PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (1 mM), las células se analizan rápidamente por citometría de flujo (LSR II, Becton Dickinson, Francia).

Para el análisis de la internalización, el protocolo es similar con reactivos a 37 °C y una incubación de 30 minutos a 37 °C.

Los resultados obtenidos, en citometría de flujo y en microscopía, han permitido destacar una fijación y una internalización específica de las SRP-RGD Cy5.5 en las células HEK293 ($\beta 3$), fijación que no se observa con las SRP Cy5.5 y las SRP-RAD Cy5.5 (resultados no presentados).

Ejemplo 4: Formación de imágenes IRM del pulmón empleando nanopartículas SRP sintetizadas de acuerdo con el ejemplo 1

Se efectuó un estudio de concentración a fin de determinar la concentración de inyección más adecuada para observar el mejor contraste en IRM. Los ratones se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal empleando 50 $\mu\text{g/g}$ de ketamina (Panpharma, Francia) y 5 $\mu\text{g/g}$ de xilazina (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, Francia). Tras la adquisición de las imágenes sin agente de contraste, los ratones se intubaron por vía intratraqueal con un catéter intravenoso de calibre 22 de teflón. Se introdujo un volumen de 50 μl de la solución de SRP en los pulmones a través del catéter. Se ensayaron 7 concentraciones diferentes de Gd^{3+} (2, 5, 10, 20, 33, 50 y 100 mM) mientras que se inyectó una solución salina a un ratón control. Después de finalizar la intubación, se efectuó la adquisición de imágenes de los pulmones a intervalos regulares durante un periodo comprendido entre 5 minutos y varias horas tras la instilación de la solución. Entre todas estas concentraciones, la concentración de 50 mM es la que presentó el mejor realce de señal ($235 \pm 15 \%$), siendo el realce de señal un poco menor en el caso de la concentración de 100 mM ($171 \pm 10 \%$). El realce de señal se define como la diferencia entre la relación entre la señal y el ruido en los pulmones antes y después de la administración, normalizada a la relación entre la señal y el ruido en los pulmones antes de la administración del agente de contraste.

Se conservó, por tanto, la concentración de 50 mM para realizar estudios posteriores de biodistribución por IRM. Se efectuó otro estudio empleando esta concentración óptima de 50 mM en 3 ratones. Para estos animales, la formación de imágenes IRM de los pulmones, el hígado, los riñones y la vejiga se efectuó a intervalos regulares entre 5 minutos y 2 días tras la administración del agente de contraste. Estas operaciones permitieron demostrar que el tiempo de semivida del agente de contraste excretado por vía renal es de 149 ± 51 minutos. Esta eliminación por vía renal de las nanopartículas es debida a su pequeño tamaño y representa una ventaja real en términos de toxicidad del agente de contraste. Igualmente, será importante para una aplicación original descrita en el ejemplo 10.

Ejemplo 5: Formación de imágenes de rayos X y de fluorescencia 2D y 3D del pulmón empleando nanopartículas SRP sintetizadas de acuerdo con el ejemplo 1

Las SRP Cy5.5 liofilizadas obtenidas según el ejemplo 1 se solubilizan en un volumen adecuado de agua para obtener una preparación inyectable durante al menos 30 minutos, a fin de obtener una solución 100 mM de iones Gd^{3+} . La suspensión de las partículas se diluye después en una solución que contiene un tampón HEPES y una solución salina. La preparación obtenida presenta un pH de 7,4 y una osmolaridad adecuada para la administración a un animal.

La nebulización intrapulmonar se efectúa empleando un Microsprayer® (PennCentury®). Cada ratón se anestesia (mezcla Domtor/ketamina, inyección intraperitoneal) y recibe 50 μl de suspensión de nanopartículas por vía intrapulmonar. Los ratones empleados para la prueba de concepto en formación de imágenes de fluorescencia son ratones NMRI desnudos de 6 semanas que pesan aproximadamente 25 gramos (Janvier, Le Genest Saint Isle,

Francia).

Los resultados obtenidos por formación de imágenes de rayos X y fluorescencia 2D y 3D han demostrado una distribución de las nanopartículas fluorescentes en los dos pulmones después de la nebulización. Estos resultados, presentes en la figura 1, son perfectamente congruentes con los obtenidos en IRM.

Ejemplo 6: Síntesis de nanopartículas para un efecto radiosensibilizador en tumores de pulmón

Este ejemplo describe la síntesis de nanopartículas empleadas para un uso como agente de radiosensibilización en el contexto del tratamiento del glioblastoma (G. Le Duc *et al.*, *ACS Nano*, 2011, 5, 9566). Estas nanopartículas son nanopartículas de óxido de gadolinio rodeadas de una capa de polisiloxano funcionalizada con DTPA (complejo quelante también de un ion gadolinio). Se contemplan para un tratamiento de radiosensibilización de tumores pulmonares debido a sus características, que son muy similares a las nanopartículas descritas en el ejemplo 1 (tanto desde el punto de vista del tamaño como de la morfología).

La síntesis del núcleo de óxido de gadolinio se efectúa disolviendo la sal de cloruro de gadolinio hexahidratado (5,576 g) en 100 ml de DEG a temperatura ambiente y con agitación vigorosa. La suspensión se calienta a 140 °C hasta que se completa la disolución de la sal (aproximadamente 1 hora). Cuando la solución es transparente, se añade gota a gota hidróxido de sodio (4 ml, 3,38 M) a la solución manteniendo la agitación vigorosa. Al finalizar esta adición, se mantienen la agitación y el calentamiento durante 3 horas. Se obtiene entonces una solución coloidal transparente de núcleos de óxido de gadolinio que se puede conservar a temperatura ambiente durante varias semanas sin alteración.

La funcionalización por la capa de polisiloxano se efectúa en presencia de precursores de silano (APTES (10,1 ml) y TEOS (6,4 ml)) y de una solución de hidrólisis (trietilamina en DEG (0,1 M en TEA y 10 M en agua)). Estas soluciones se añaden en varias etapas a 400 ml de la solución previamente preparada que contiene los núcleos de óxido de gadolinio ($[Gd^{3+}] = 45 \text{ mM}$) con agitación a 40 °C. Se selecciona una tasa 4 veces superior de silicio con respecto al gadolinio para esta síntesis (la mezcla de precursores está compuesta por un 60 % de APTES y un 40 % de TEOS). La adición de los diferentes precursores se efectúa en 6 etapas sucesivas. Cada etapa consiste en añadir una parte de la solución que contiene la mezcla de precursores (un 5 % de la solución para la primera etapa, un 15 % para la segunda y un 20 % para las siguientes). El tiempo entre cada adición se fija en 1 hora. Después de la última adición, la solución se deja en agitación durante 48 horas a 40 °C. Para facilitar su estabilidad coloidal en medio biológico, las nanopartículas se funcionalizan con DTDTPA mediante un enlace peptídico entre una de las funciones ácido carboxílico activada y una función amina procedente del APTES presente en la superficie de las nanopartículas. Se añaden 100 ml de la solución coloidal de nanopartículas previamente obtenida a 4,25 g de DTDTPA disueltos en 20 ml de DMSO.

Las nanopartículas se precipitan a continuación en 500 ml de acetona y el sobrenadante se retira mediante centrifugación. El polvo blanco obtenido se lava después con una mezcla de etanol/acetona (85/15) y se retira de nuevo el sobrenadante mediante centrifugación (esta operación se repite 3 veces). Seguidamente, las nanopartículas se dispersan en agua y se purifican mediante centrifugación (a través de membranas Vivaspín® de 5 kDa).

Tras una purificación por un factor de 1000, las partículas se liofilizan. Después se inyectan directamente empleando un tampón HEPES y una solución salina con buena osmolaridad, estando el pH ajustado a 7,4. Estas nanopartículas presentan un diámetro hidrodinámico de 2 nm y una r_1 a 60 MHz de $9,4 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (la relación entre r_1 y r_2 es de 1,13). Se pueden usar, por tanto, como agentes de contraste T_1 a fin de visualizar su biodistribución y su acumulación en el tumor (G. Le Duc *et al.*, *ACS Nano*, 2011, 5, 9566). Este seguimiento en formación de imágenes es importante para determinar el tiempo óptimo en el que se ha de iniciar la radioterapia. Estos agentes terapéuticos ya han demostrado su poder radiosensibilizador *in vitro* en células cancerosas humanas de cerebro de tipo U87 (P. Mowat *et al.*, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2011, 11, 7833-7839). El uso de estas nanopartículas o de las descritas en los ejemplos 1 y 2 parece ser particularmente adecuado en el contexto de la lucha contra el cáncer de pulmón procediendo a una terapia (en este caso, radioterapia) guiada por formación de imágenes.

Ejemplo 7: Protocolo previsto para una aplicación de radiosensibilización de estas nanopartículas inyectadas por vía respiratoria

Las nanopartículas sintetizadas según el ejemplo 1 se inyectan por vía respiratoria. Su acumulación en la zona tumoral se detecta después mediante IRM (ejemplo 4), formación de imágenes de fluorescencia acoplada a tomografía de rayos X (ejemplo 5) o también mediante cintigrafía después de quelar un isótopo radioactivo usado en PET o en SPECT. Una vez detectada la concentración de nanopartículas óptima en la zona tumoral (relación de contraste entre la zona sana y la zona tumoral), se puede activar el tratamiento de radioterapia. Las nanopartículas son eliminadas luego por vía renal después de su paso a la sangre. La administración por vía respiratoria permite inyectar una cantidad menor de nanopartículas al paciente. Puesto que el tratamiento de radioterapia se efectúa de manera fraccionada en condiciones clínicas, será posible realizar una nueva administración de partículas antes de cada una de las sesiones debido a las posibilidades de eliminación de las partículas y a las cantidades relativamente

pequeñas inyectadas. Los diferentes ensayos realizados anteriormente en tumores de tipo U87 radiorresistentes hacen prever resultados interesantes en radiosensibilización del pulmón.

Ejemplo 8: Teranóstica para el asma

Ninguna técnica de formación de imágenes no invasiva permite actualmente evaluar la gravedad y extensión del remodelado bronquial en asmáticos severos. El remodelado bronquial corresponde a una evolución anormal de los tejidos bronquiales y peribronquiales que continua con inflamaciones bronquiales repetidas. Este remodelado se manifiesta en diferentes evoluciones histológicas: engrosamiento de la membrana subepitelial, aumento de los depósitos de matriz extracelular, neoangiogénesis, hipertrofia de las glándulas de moco y aumento de masa de los músculos bronquiales lisos. El remodelado bronquial en asmáticos severos se evidencia por un pronóstico desfavorable, una morbilidad elevada y una degradación marcada de la función respiratoria y los pacientes, además, no responden a las terapias habituales. Los asmáticos severos representan el 10 % de la población asmática, es decir, 350 000 pacientes en Francia, y más de la mitad de los costes asociados a esta patología. Para el desarrollo de tratamientos eficaces, es crucial disponer de una técnica de formación de imágenes no invasiva que permita evaluar precisamente la gravedad del remodelado y la respuesta a los tratamientos. El uso de aerosoles de nanopartículas injertadas con moléculas de vectorización (por ejemplo el tripéptido cRGD para la integrina $\alpha_v\beta_3$, tal como el descrito en el ejemplo 2) debería permitir la formación de imágenes de la angiogénesis asociada al remodelado bronquial para el diagnóstico y la evaluación de la eficacia terapéutica del tratamiento del asma severa. Para este fin, se podrá implementar un modelo murino de asma crónica. Estos ratones (hembra de tipo Balb/c y de 6 semanas de edad) recibirán inyecciones intraperitoneales de ovoalbúmina (100 μ g) o de *Dermatophagoides pteronyssinus* (*D.pter*) (100 μ g) para la sensibilización después de las instilaciones intranasales de los mismos compuestos a intervalos regulares (los días 14, 27, 28, 29, 47, 61, 73, 74 y 75) para la aparición de un remodelado bronquial 15 semanas después del inicio de la sensibilización.

Ejemplo 9: Síntesis de nanopartículas para un efecto de fototerapia dinámica en tumores de pulmón

La adición de un fotosensibilizador a las nanopartículas permite proporcionar a las mismas un efecto tóxico bajo la acción de la luz. No obstante, la luz no puede penetrar en el cuerpo más allá de unos pocos centímetros y esto incluso con los cromóforos más adecuados (absorción en la ventana de transparencia de los tejidos, es decir, la zona próxima al infrarrojo). El principal interés del enfoque por vía respiratoria es el de poder obtener una concentración en los tumores pulmonares. Estos últimos se pueden iluminar después mediante la fibra óptica de un endoscopio (evitando así problemas de penetración de los tejidos por la luz).

La síntesis de las nanopartículas que son activas en la PDT y que se pueden inyectar por vía respiratoria se puede implementar de la siguiente manera:

El cloruro de gadolinio hexahidratado (3,346 g) se añade a 60 ml de DEG a temperatura ambiente. La suspensión se calienta a continuación a 140 °C con agitación vigorosa a fin de asegurar la disolución completa de la sal de gadolinio. Después se añaden gota a gota 4 ml de una solución de hidróxido de sodio 2,03 M manteniendo la agitación vigorosa. La solución se deja entonces en agitación a 180 °C durante 3 horas. Se obtiene una solución coloidal de núcleos de óxido de gadolinio que se puede conservar a temperatura ambiente durante varias semanas sin riesgo de degradación.

La adición de un fotosensibilizador derivado de la clorina (TPC) se puede efectuar gracias a la activación de la función ácido carboxílico de la TPC con una mezcla EDC/NHS para obtener el 5,10,15-tri-(p-tolil)-20-(p-carboxilfenil)clorina-succinimidil éster (TPC-NHS) siguiendo el protocolo descrito por C. Frochot *et al.* (*Bioorganic Chemistry*, 2007, 35, 205-220). Se acoplan 20 mg de TPC-NHS mediante enlace peptídico con 12,3 μ l de APTES en 4,2 ml de DMSO anhidro durante 1 noche.

Los precursores de silano (APTES (1,5 ml) y TEOS (1,0 ml)) y la solución de hidrólisis (solución acuosa de trietilamina en DEG (0,015 M en TEA y 1,5 M en agua)) se añaden en etapas a los 60 ml de DEG que contiene las partículas con agitación a 40 °C. La adición total se realiza en 6 etapas. Cada etapa consiste en añadir una parte de la solución de precursores a la solución coloidal en DEG (un 5 % para la primera etapa, un 15 % para la siguiente y un 20 % para las últimas). La solución que contiene la TPC acoplada al APTES se añade durante la primera etapa al mismo tiempo que los otros precursores. El tiempo entre cada adición es de una hora. Después de la última adición, la mezcla se mantiene en agitación durante 48 horas a 40 °C.

Las nanopartículas se funcionalizan después con DTDTPA mediante un enlace peptídico entre las aminas del APTES y la función ácido carboxílico activada del complejante. A la solución anterior se añaden 2,5 g de DTDTPA en 12 ml de DMSO anhidro. La mezcla resultante se agita entonces durante 1 hora. Las nanopartículas se precipitan a continuación en 300 ml de acetona y el sobrenadante se retira mediante centrifugación. El polvo obtenido se lava 3 veces con una mezcla de etanol/acetona (85/15). Por último, el polvo se redispersa en agua y se purifica mediante centrifugación tangencial sobre una membrana de 5 kDa (Vivaspin®). Este procedimiento se repite varias veces a fin de alcanzar una tasa de purificación de al menos 100. La solución purificada de coloides se liofiliza después.

Ejemplo 10: Vectorización pasiva hacia un tumor subcutáneo tras la administración intrapulmonar de

nanopartículas

Las partículas cianina 5.5 liofilizadas se solubilizan en un volumen adecuado de agua para preparación inyectable durante al menos 30 minutos, a fin de obtener una solución 100 mM de iones Gd^{3+} . La suspensión de partículas se diluye después en una solución que contiene un tampón HEPES y una solución salina. La preparación obtenida presenta un pH de 7,4 y una osmolaridad adecuada para la administración a un animal.

Los ratones han recibido previamente un injerto subcutáneo de células tumorales en el costado. Cuando el tumor alcanza un tamaño de 5 x 5 mm, los ratones reciben una inyección intrapulmonar de nanopartículas (50 μ l por ratón). La nebulización se efectúa empleando un Microsprayer® (PennCentury®).

Los resultados obtenidos mostraron un paso muy rápido de las partículas al torrente sanguíneo (15-20 minutos) a partir de los pulmones, asociado a una eliminación renal.

A partir de 5 h desde la nebulización se detecta una señal en el tumor subcutáneo. La señal aumenta hasta 24 h después de la administración.

La biodistribución es comparable a la obtenida para la administración de una cantidad equivalente de iones Gd^{3+} por vía intravenosa (inyección en la vena caudal), aunque con una acumulación tumoral pasiva ligeramente menor (figura 5). Las nanopartículas inyectadas por vía respiratoria presentan la ventaja de asegurar una menor captación renal.

Ejemplo 11: Vectorización pasiva hacia un tumor pulmonar ortotópico tras la administración intravenosa o intrapulmonar de nanopartículas

Las partículas cianina 5.5 liofilizadas se solubilizan en un volumen adecuado de agua para preparación inyectable durante al menos 30 minutos, a fin de obtener una solución 100 mM de iones Gd^{3+} . La suspensión de las partículas se diluye después en una solución que contiene un tampón HEPES y una solución salina. La preparación obtenida presenta un pH de 7,4 y una osmolaridad adecuada para la administración a un animal.

Los ratones han recibido previamente un injerto ortotópico de células tumorales (H358) en el pulmón. Las células tumorales expresan el gen de la luciferasa de forma estable, lo que permite seguir el crecimiento tumoral por formación de imágenes de bioluminiscencia *in vivo*. Cuando el tumor está bien establecido y es detectable por formación de imágenes de bioluminiscencia *in vivo*, los ratones reciben una inyección intravenosa (200 μ l por ratón) o una inyección intrapulmonar (50 μ l por ratón) de nanopartículas. La nebulización se efectúa empleando un Microsprayer® (PennCentury®).

Los resultados obtenidos muestran que, tras la administración intravenosa, las partículas se distribuyen por la totalidad del organismo del ratón y son eliminadas por vía renal. A partir de 5 h desde la administración se detecta una señal por formación de imágenes de fluorescencia 3D en el tumor pulmonar H358 implantado de forma ortotópica en el pulmón. La señal es estable hasta 24 h postadministración.

En cuanto a la administración intrapulmonar, los resultados muestran que, tras la administración, las partículas pasan muy rápidamente al torrente sanguíneo (15-20 minutos) a partir de los pulmones, y son eliminadas por vía renal. A partir de 5 h desde la nebulización la mayor parte de las partículas se eliminan del pulmón y se detecta una señal en el tumor pulmonar implantado de forma ortotópica en el pulmón. La señal es estable hasta 24 h postadministración.

Las técnicas de formación de imágenes de fluorescencia *in vivo* muestran una buena colocalización de la fluorescencia con la presencia del tumor (tomografía de rayos X efectuada antes de la administración de las partículas, véase la figura 6).

Las técnicas de formación de imágenes de fluorescencia y bioluminiscencia *ex vivo* en los pulmones muestran una colocalización de la señal de bioluminiscencia (correspondiente a las células tumorales) y de fluorescencia (correspondiente a las partículas - Cy5.5) (véase la figura 6).

Las partículas, por tanto, son capaces de acumularse de manera pasiva en tumores pulmonares implantados de forma ortotópica e independientemente de cuál sea la vía de administración (intravenosa o intrapulmonar).

Ejemplo 12: Efecto radiosensibilizador de las nanopartículas en tumores pulmonares tras la administración intrapulmonar

Las partículas liofilizadas se solubilizan en un volumen adecuado de agua para preparación inyectable durante al menos 30 minutos, a fin de obtener una solución 100 mM de iones Gd^{3+} . La suspensión de las partículas se diluye después en una solución que contiene un tampón HEPES y una solución salina. La preparación obtenida presenta un pH de 7,4 y una osmolaridad adecuada para la administración a un animal.

Los ratones han recibido previamente un injerto ortotópico de células tumorales (H358) en el pulmón. Las células tumorales expresan el gen de la luciferasa de forma estable, lo que permite seguir el crecimiento tumoral por formación de imágenes de bioluminiscencia *in vivo*. Cuando el tumor está bien establecido y es detectable por formación de imágenes de bioluminiscencia *in vivo*, los ratones reciben una inyección intrapulmonar (50 µl por ratón) de nanopartículas. La nebulización se efectúa empleando un Microsprayer® (PennCentury®). Veinticuatro horas postadministración, los ratones son irradiados (rayos X) con una dosis única en un irradiador convencional.

Los resultados obtenidos muestran que la administración intrapulmonar de las nanopartículas antes de la irradiación mejora la supervivencia de los ratones, en comparación con solo una radiación (véase la figura 7). Las partículas presentan, por tanto, un efecto radiosensibilizador para los tumores pulmonares.

REIVINDICACIONES

1. Nanopartículas para su uso como agente terapéutico para el tratamiento de tumores de pulmón, dichas nanopartículas **estando caracterizadas por que**

- a. presentan un diámetro hidrodinámico medio comprendido entre 1 y 5 nm medido mediante espectroscopía de correlación fotónica,
 - b. comprenden al menos un agente radiosensibilizador para radioterapia,
 - c. se administran a una persona o a un animal por vía respiratoria, particularmente intranasal o intratraqueal,
- y **por que** son nanopartículas híbridas que comprenden:

- una matriz de poliorganosiloxano (POS) que incluye, como agente de radiosensibilización, cationes de tierras raras M^{n+} , siendo n un número entero comprendido entre 2 y 4, opcionalmente asociado a cationes dopantes D^{m+} , siendo m un número entero comprendido entre 2 y 6, siendo D preferentemente una tierra rara o un elemento de transición;
- un agente quelante injertado en la matriz POS mediante enlaces covalentes -Si-C-, en cantidad suficiente para poder complejar todos los cationes M^{n+} y, si se requiere, D^{m+} .

2. Nanopartículas para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizadas por que** tienen una relaxividad r_1 por partícula comprendida entre 50 y 5000 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

3. Nanopartículas para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizadas por que** el agente quelante se selecciona entre los agentes complejantes de los lantánidos, particularmente el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), el ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triaacético (NOTA) o derivados de los mismos.

4. Nanopartículas para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizadas por que** dichas nanopartículas comprenden cada una un agente radiosensibilizador seleccionado entre los lantánidos.

5. Nanopartículas para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizadas por que** el lantánido se selecciona entre Dy, Lu, Gd, Ho, Eu, Tb, Nd, Er, Yb o mezclas de los mismos.

6. Nanopartículas para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizadas por que** la matriz de POS de cada nanopartícula se obtiene a partir de una nanopartícula precursora que comprende:

- un núcleo que comprende un óxido y/o un oxihidróxido metálico de tierras raras, al menos en parte en forma catiónica M^{n+} , siendo n un número entero comprendido entre 2 y 4, opcionalmente dopado con un dopante D presente, al menos en parte, en forma catiónica D^{m+} , siendo m un número entero comprendido entre 2 y 6, preferentemente una tierra rara o un elemento de transición;
- al menos una capa de revestimiento que comprende poliorganosiloxanos (POS);
- y, un subrevestimiento que comprende un agente quelante C1 adecuado para complejar los cationes M^{n+} ;

estando sometida dicha nanopartícula precursora a una disolución del núcleo mediante un agente modificador del pH y/o un agente quelante C2, idéntico o diferente a C1, adecuado para complejar la totalidad o una parte de los cationes M^{n+} y D^{m+} de modo que el diámetro hidrodinámico medio de la nanopartícula así obtenida, y tal como se mide mediante espectroscopía de correlación fotónica, se reduzca a un valor comprendido entre 1 y 5 nm.

7. Nanopartículas para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizadas por que** tienen atrapado un isótopo radioactivo que se puede usar en cintigrafía y seleccionado preferentemente entre el grupo constituido por isótopos radioactivos de In, Tc, Ga, Zr, Y, Cu o Lu, por ejemplo ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{89}Zr , ^{90}Y o ^{177}Lu .

8. Nanopartículas para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizadas por que** las nanopartículas comprenden cada una un agente radiosensibilizador seleccionado entre un lantánido, un óxido y/o un oxihidróxido de lantánido, siendo el lantánido el gadolinio.

9. Nanopartículas para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizadas por que** tienen una relación másica de gadolinio comprendida entre un 5 % y un 50 %.

10. Nanopartículas para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizadas por que** se usan a la vez como agente de contraste IRM T_1 para la formación de imágenes de tumores de pulmón y como agente radiosensibilizador para el tratamiento de tumores de pulmón.

11. Uso de las nanopartículas tales como las definidas de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9 como agente de contraste para la formación de imágenes del pulmón, **caracterizado por que** las nanopartículas se administran al paciente por vía respiratoria, por ejemplo intranasal o intratraqueal.

12. Uso de las nanopartículas de acuerdo con la reivindicación 11, como agente de contraste T₁ para la formación de imágenes por resonancia magnética.
- 5 13. Uso de las nanopartículas de acuerdo con una de las reivindicaciones 11 a 12, como agente de contraste multimodal adecuado para la formación de imágenes IRM T₁, y una o varias técnicas de formación de imágenes diferentes seleccionadas entre:
 - i. cintigrafía PET o SPECT,
 - 10 ii. fluorescencia en el infrarrojo cercano,
 - iii. tomografía de rayos X.
14. Método de formación de imágenes médicas no invasivo en una persona o un animal, que comprende las etapas siguientes:
 - 15 i. se administra una composición que comprende nanopartículas, tales como las definidas en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, como agente de contraste IRM T₁, por vía respiratoria, por ejemplo en forma de aerosol,
 - ii. se capturan las imágenes IRM mediante una secuencia IRM apropiada.
- 20 15. Nanopartículas tales como las definidas de acuerdo con la reivindicación 6, para su uso en un método de diagnóstico de una patología pulmonar cancerosa en una persona o un animal, comprendiendo dicho método las etapas siguientes:
 - 25 i. se administra al paciente por diagnosticar una composición que comprende nanopartículas ultrafinas sin núcleo basadas en gadolinio, tales como las definidas en la reivindicación 6, como agente de contraste IRM T₁, por vía respiratoria, por ejemplo en forma de aerosol,
 - ii. se capturan las imágenes IRM mediante una secuencia IRM apropiada,
 - iii. se detecta la presencia o la ausencia de tumor pulmonar para establecer el diagnóstico.

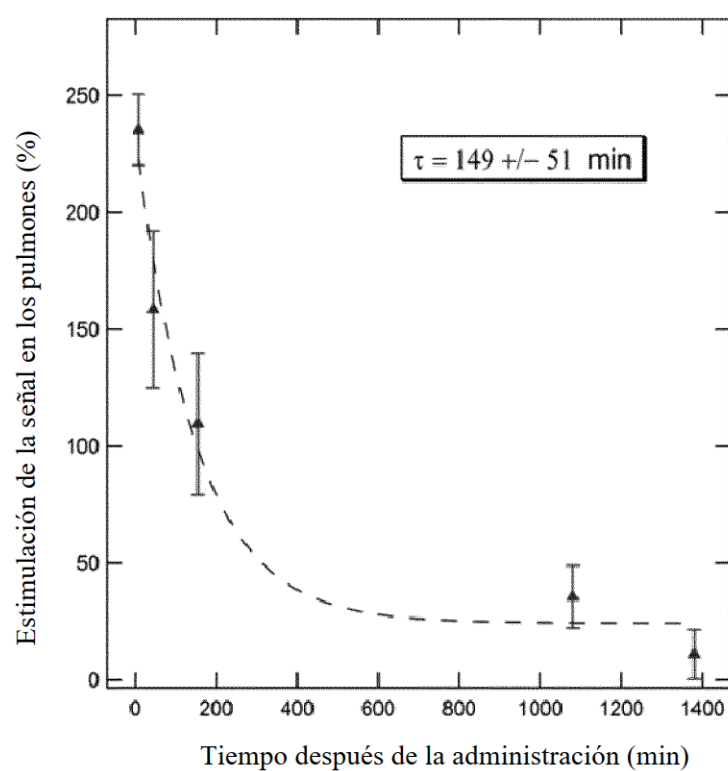
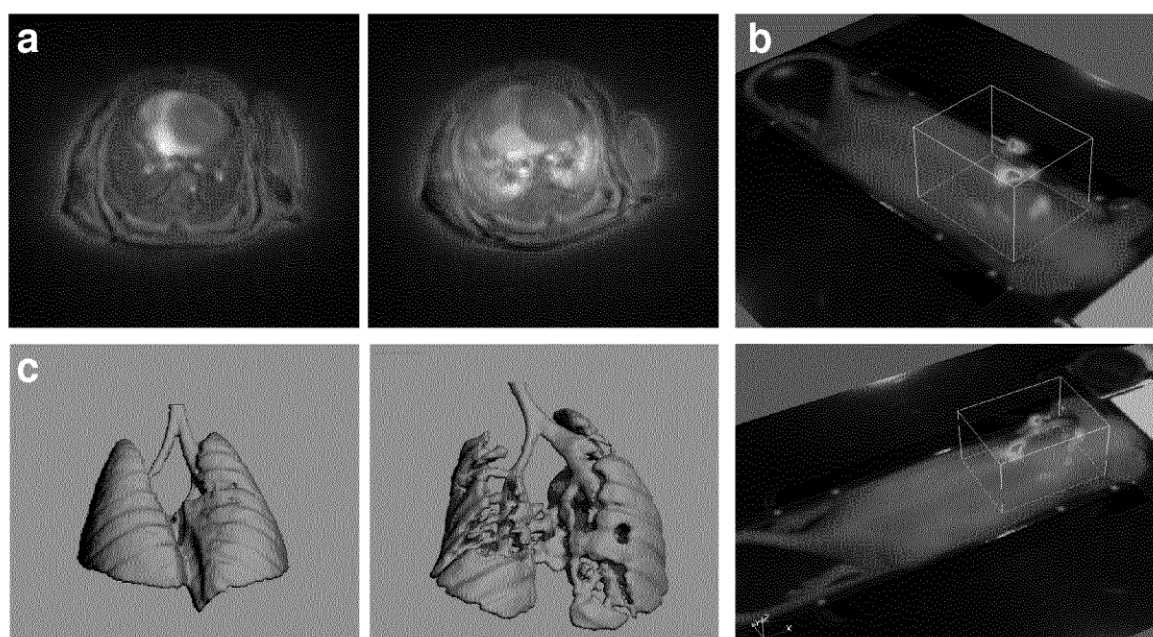


FIGURA 1

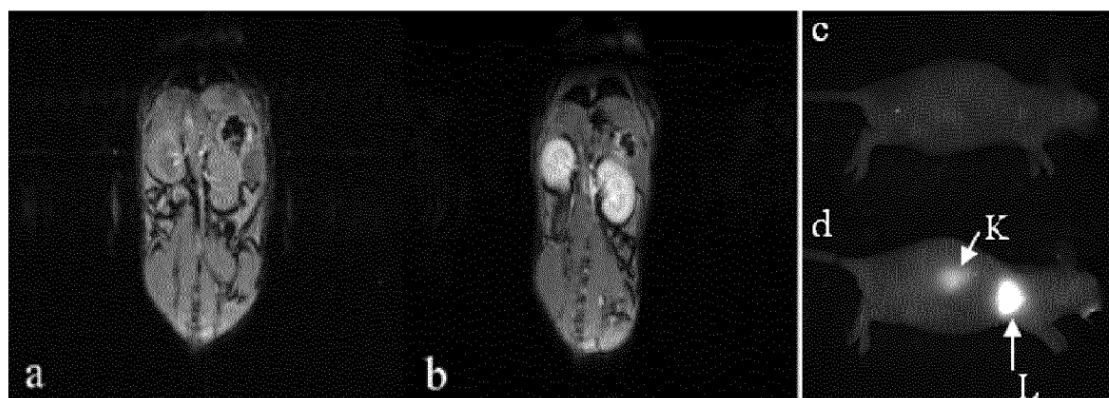


FIGURA 2

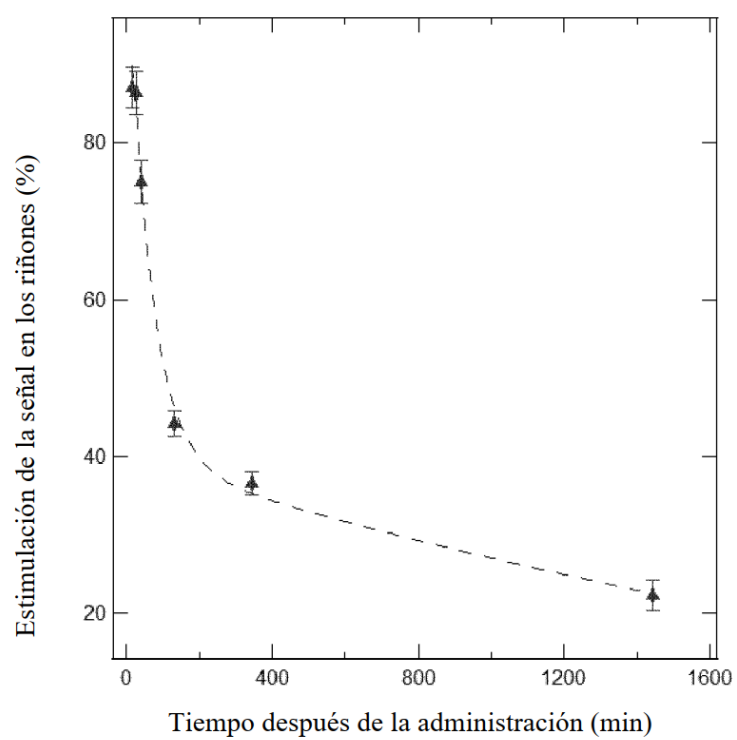


FIGURA 3

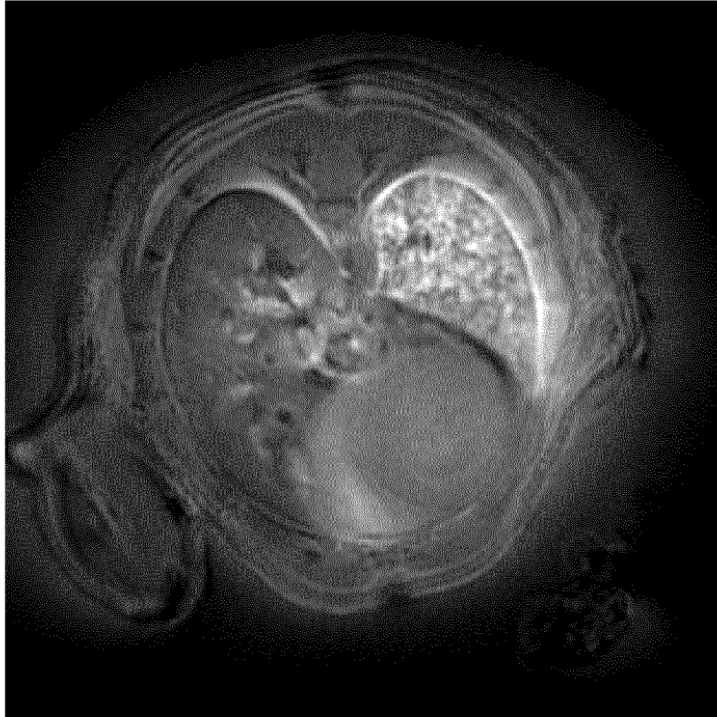


FIGURA 4

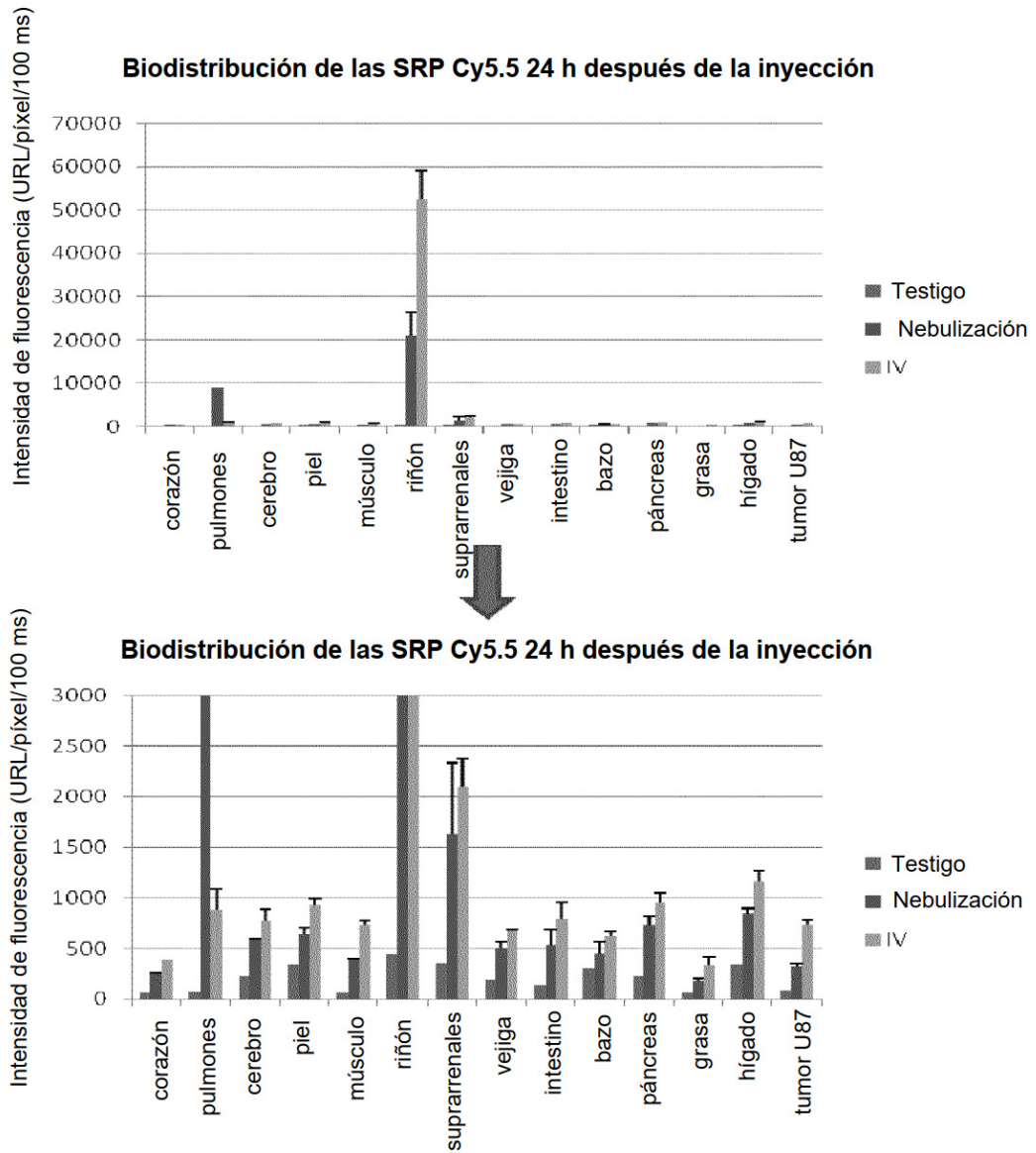


FIGURA 5

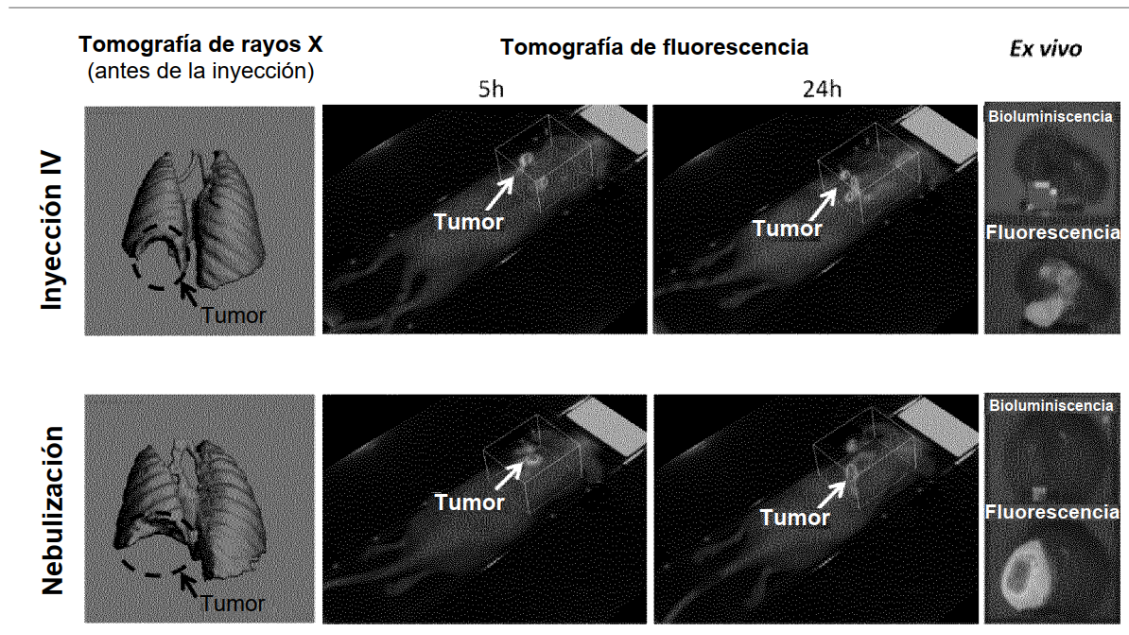


FIGURA 6

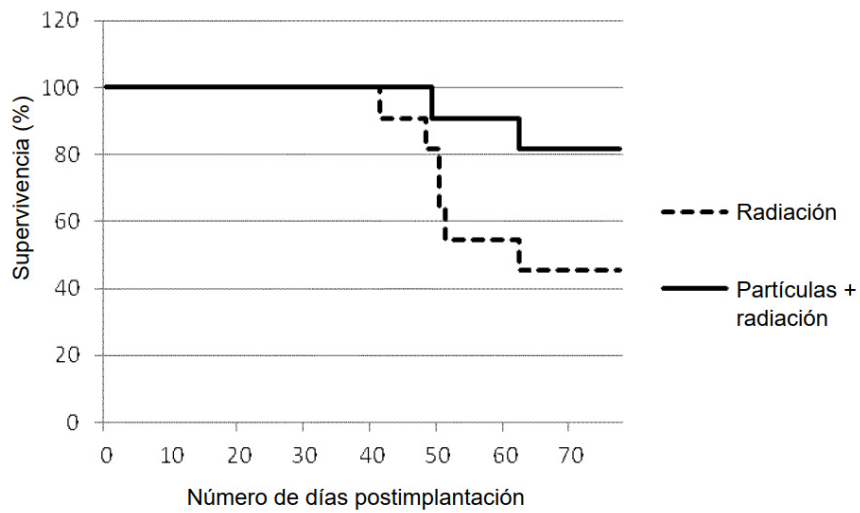


FIGURA 7