

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 367 190**

21 Número de solicitud: 200930845

51 Int. Cl.:

A61K 49/14 (2006.01)

A61K 51/08 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

A61B 5/055 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

14.10.2009

43 Fecha de publicación de la solicitud:

31.10.2011

Fecha de la concesión:

10.01.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

22.01.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE GRANADA
CUESTA DEL HOSPICIO S/N
18071 GRANADA (GRANADA) ES y
UNIVERSIDAD DE CÁDIZ**

72 Inventor/es:

**DOMINGUEZ VERA, Jose Manuel;
GALVEZ RODRIGUEZ, Natividad;
FERNANDEZ LOPEZ, Belen;
VALERO ROMERO, Elsa;
CALVINO GAMEZ, Jose Juan y
TRASOBARES LLORENTE, Susana**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **NANOESTRUCTURAS MULTIFUNCIONALES COMO AGENTES DE DIAGNOSIS BIMODAL MRI-SPECT.**

57 Resumen:

Nanoestructuras multifuncionales como agentes de diagnóstico bimodal MRI-SPECT.

Nanoestructuras multifuncionales que consisten en magnetoferritina superparamagnética, que además puede comprender cadenas de un polímero biocompatible covalentemente unidas su superficie. La invención también se refiere a un método para obtener dichas nanoestructuras, así como a su uso como medicamento y más preferiblemente para la diagnosis de cáncer o como agente de contraste.

ES 2 367 190 B1

DESCRIPCIÓN

Nanoestructuras multifuncionales como agentes de diagnóstico bimodal MRI-SPECT.

5 La presente invención se refiere a una nanoestructura multifuncional, concretamente a una magnetoferritina superparamagnética, además de su aplicación como agente de contraste en MRI o SPECT. Por tanto, la invención se podría encuadrar dentro del campo de la biomedicina.

Estado de la técnica

10 La integración de la Nanotecnología en la Biotecnología ha hecho florecer una nueva disciplina: la Nanomedicina. En este campo, se diseñan y preparan nanopartículas metálicas para obtener bioimágenes mediante el uso simultáneo de varias técnicas, distribución efectiva de fármacos o técnicas de terapias tan prometedoras como la hipertermia originada localmente por nanopartículas magnéticas. Es un área de tremendo potencial sujeta al desarrollo de nuevas nanoestructuras para su avance.

15 Las nanopartículas magnéticas han atraído la atención principalmente por su uso potencial como agentes de contraste en Imagen por Resonancia Magnética (MRI). Esta técnica se basa en la resonancia magnética de los protones de tejidos del cuerpo (agua, membranas, lípidos, proteínas, etc) y es actualmente el método más potente de diagnóstico.

20 El contraste en MRI puede mejorarse con sustancias paramagnéticas. La capacidad de un compuesto para incrementar la velocidad de relajación de los espines de protón de las moléculas de agua del entorno se llama relajación y se define como $R1 \sim 1/T1$ o $R2 \sim 1/T2$. Las nanopartículas superparamagnéticas son candidatas para actuar como agentes de contraste en MRI. Al igual que las sustancias paramagnéticas, pierden su magnetización cuando se elimina el campo magnético externo, pero a diferencia de éstas, su magnetización es sensiblemente mayor. Por lo tanto, la relajación que producen es mucho más alta que las de los clásicos complejos paramagnéticos de Gd(III). El efecto de las nanopartículas superparamagnéticas se puede describir en base a la heterogeneidad del intenso campo magnético que afecta a los protones del alrededor, induciendo un desfase del momento magnético y dando lugar a un acortamiento del tiempo de relajación T2. De este modo, las nanopartículas superparamagnéticas son unos buenos candidatos para el desarrollo de nuevos y elegantes agentes de contraste, permitiendo una detección temprana de patologías severas y de gran impacto social.

25 Un enfoque dentro de la Nanomedicina es el uso de nanopartículas que puedan combinar simultáneamente diferentes técnicas de bioimagen. Cada modalidad de bioimagen tiene sus propios méritos pero también ciertas desventajas y por lo tanto los métodos de imagen multimodales presentan mayor capacidad para obtener una imagen integral y más detallada.

30 MRI, probablemente la técnica de imagen más potente en la actualidad, tiene una alta resolución espacial pero sin embargo no presenta gran sensibilidad (10^{-5} M, con la tecnología actual) y requiere acumular concentraciones significativas del agente de contraste, lo que incrementa el riesgo de toxicidad. Sin embargo, OI tiene una extraordinaria sensibilidad (10^{-12} M) pero por el contrario presenta problemas de resolución espacial y baja penetración en tejidos. En definitiva, el reto es combinar los puntos fuertes de cada técnica de imagen en un único agente de contraste, que permita la obtención de imágenes paralelas mediante varias técnicas. Aunque al día de hoy no existen todavía agentes de contraste multimodales para uso clínico de rutina, han sido publicados un buen número de ellos, especialmente bimodales MRI-OI.

35 Un punto clave para la aplicación biomédica *in vivo* de las nanopartículas metálicas es que no pueden ser tóxicas y deben permanecer en el torrente sanguíneo el tiempo suficiente para alcanzar un blanco biológico. El sistema inmunológico a través de los componentes opsoninas, macrófagos y anticuerpos (MPS, sistema fagocítico mononuclear) reconoce y elimina las partículas del torrente sanguíneo, con su simultánea concentración en órganos con alta actividad fagocítica (principalmente el hígado). Por lo tanto, una estrategia sensata es el uso de nanopartículas que sean capaces de evadir el ataque por parte del MPS y no sean fagocitadas por los macrófagos, aumentando consecuentemente el tiempo de vida media en plasma y permitiendo alcanzar un órgano o tejido específico.

40 Un agente bimodal ideal para su aplicación clínica debería poseer una alta y específica acumulación en las células adecuadas, lo que tendría como consecuencia la posibilidad de diagnosticar de forma cada vez más precoz una enfermedad aún tratable, además de tener tiempos de vida media en plasma suficientemente altos y poder alcanzar un blanco biológico específico. En este sentido, el uso de nanopartículas metálicas frente a compuestos metálicos clásicos (sales o compuestos de coordinación) tiene la ventaja de poder acumular más fácilmente una mayor cantidad de material metálico activo en un tejido determinado. Esto hace que en definitiva, se optimice el uso del fármaco y que pueda ser disminuida la dosis metálica necesaria, con la consiguiente disminución en el riesgo de toxicidad.

45 Numerosos métodos físicos y químicos han sido utilizados para preparar nanopartículas magnéticas. Puesto que las propiedades magnéticas son muy dependientes del tamaño, es crucial que el método a desarrollar permita la obtención de nanopartículas con tamaños uniformes. Una posible ruta para obtener nanopartículas metálicas sin agregación y con tamaño controlado es el uso de una plataforma molecular preorganizada, con una cavidad que pueda actuar como nanoreactor para el control químico y espacial en la formación de las nanopartículas. Un ejemplo típico de este tipo

de moléculas es la proteína ferritina. La apoferritina consiste en una proteína esférica formada por 24 subunidades rodeando una cavidad acuosa con un diámetro de aproximadamente 8 nm.

La organización de las multisubunidades para formar la apoferritina genera la presencia de canales. Ocho canales hidrofílicos de aproximadamente 4 Å permiten la entrada de iones metálicos y moléculas suficientemente pequeñas al interior de la cavidad de la proteína. Esto ha permitido la introducción de magnetita en el interior de la apoferritina produciendo magnetoferritina, la cual ha sido usada como método de diagnóstico monomodal (MRI) (Journal of Magnetic Resonance Imaging. 4(3):497-505, 1994 May-Jun.).

Por otro lado, el uso de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ para diagnóstico mediante gammagrafía SPECT (Single Photon Emission Computer Tomography) está ampliamente generalizado en Medicina Nuclear. El $^{99m}\text{TcO}_4^-$ tiene un periodo de vida media corto (6 h) y emite radiación gamma de 141 keV. Estos valores reducen su toxicidad y lo hacen un radionúclido idóneo para agente de contraste mediante SPECT. De hecho, en el mercado hay un buen número de fármacos de este radionúclido (Cerotec[®], Tc-MAG[®], Cardiolite[®], etc), la mayoría de los cuales está en forma de complejo de Tc de diferentes estados de oxidación y que son obtenidos *in situ* mediante reacción con diferentes ligandos (Chem. Rev. 1999, 99, 2205; Chem. Rev. 1999, 99, 2235). La mayoría de los compuestos de Tc, son compuestos de coordinación o sales siendo algunos nombres comerciales conocidos: cardiolite[®] (para corazón), Tc-MAG[®] (para riñón), etc. La US 20090035201 describe un ejemplo de un complejo $^{99m}\text{TcO}_4^-$ -Fe₂O₃, pero no trata el tema de la inclusión de este tipo de complejos en la cavidad de la magnetoferritina, y aun menos el uso del producto final como agente de contraste bimodal.

Descripción detallada de la invención

En vista del estado de la técnica un objetivo de la presente invención es proporcionar un agente de contraste bimodal, MRI-SPECT, basado en una magnetoferritina superparamagnética, caracterizada porque el núcleo de magnetita ocluye ^{99m}Tc , a partir de ahora magnetoferritina de la invención.

El nanopartícula superparamagnética de la invención, es decir la magnetoferritina superparamagnética, está constituido por una nanopartícula de magnetita encapsulada en la ferritina que presenta propiedades para comportarse como agente de contraste en MRI.

La magnetoferritina de la invención es biocompatible y presenta una biodistribución en distintos órganos, mejorando significativamente las propiedades de otros agentes de contraste como son la magnetita sola. Esta puede ser usada como agente de contraste bimodal en MRI (i), y gammagrafía-SPECT (iv) y muestra tiempos de vida medio en sangre, especialmente cuando tiene introducidas cadenas de polímero biocompatible como el polietilenglicol (PEG), suficientemente extensos para distribuirse por el sistema circulatorio sin ser fagocitados en un tiempo menor de 3 h.

Otras ventajas de la magnetoferritina de la presente invención es que la preparación de estas nanopartículas $^{99m}\text{TcO}_4^-$ se lleva a cabo a temperatura ambiente en un tiempo óptimo para su inyección en el cuerpo. Además no requiere reducción del Tc(VII) y su incorporación a la nanopartícula es prácticamente total, lo que permite una acumulación óptima del radionúclido. El hecho de que el pertecnato vaya ocluido en la red del mineral de Fe, hace que pueda controlarse la cantidad de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ por partícula y por lo tanto, puedan prepararse fármacos de diferentes dosis de radionúclido, en función de las necesidades.

Las especies de Tc preferidas para su inclusión en la magnetoferritina de la invención es $^{99m}\text{TcO}_4^-$. La concentración de ^{99m}Tc se puede ajustar en función de la necesidad, por ejemplo diagnóstico o terapia pero preferiblemente está comprendida entre 10^{-9} - 10^{-5} M.

Los presentes inventores han logrado obtener partículas de magnetita de alto contenido en Fe en la cavidad de ferritina. El contenido en Fe puede ser modulado hasta 3800 átomos de Fe por unidad de ferritina. Preferiblemente se modula la cantidad de Fe de 3000 a 3800 átomos de Fe por unidad de ferritina, lo cual permite mejora sus propiedades como agente de contraste en MRI.

Durante la preparación de la nanopartícula de magnetita (i), el Tc queda ocluido dentro de la magnetita, lo que es un ventaja frente a los complejos de coordinación de Tc puesto que la concentración de Tc por partícula es mucho mayor (hasta 20 veces mayor) y permite acumular una mayor densidad de átomos de Tc. Esta mayor acumulación redundante en un incremento de la radiación gamma y en una mayor resolución. Asimismo, la acumulación optimiza la concentración del radiomarcador, lo que permite el uso de menores dosis.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención la magnetoferritina superparamagnética tiene cadenas de un polímero biocompatible covalentemente unidas a la superficie de la magnetoferritina. La presencia de este polímero mejora las propiedades de la magnetoferritina de la invención para ser usada como agente de contraste puesto que aumenta su estabilidad general obteniendo tiempos medios de vida en sangre adecuados para su uso. El polímero biocompatible preferido es polietilenglicol (PEG), entre otras razones por su disponibilidad industrial, su facilidad de incorporación a la superficie de la magnetoferritina y su alta biocompatibilidad. El proceso de unir covalentemente el polímero de PEG a otras moléculas, normalmente fármacos o proteínas terapéuticas es conocido como PEGylación (Kohler, N.; Fryxell, G. E.; Zhang, M. J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 7206. Paul, K. G.; Frigo, T. B.;

Groman, J. Y.; Groman, E. V. *Bioconjugate Chem.* 2004, 15, 394.). En nuestro caso, el PEG va unido covalentemente a la magnetoferritina. Este proceso se puede llevar a cabo de forma sencilla, incubando un derivado del PEG reactivo con las nanopartículas. La unión covalente de PEG las enmascara del sistema inmune, aumenta la talla hidrodinámica (talla en solución) lo que aumenta el tiempo de vida media en sangre y reduce su eliminación por el sistema inmune.

5 Este proceso además aumenta la solubilidad en agua de dichas nanopartículas y le confiere de forma general una estabilidad adicional. Se puede además controlar el número de moléculas de PEG que se unen a la superficie de la nanopartícula superparamagnética. Los derivados del PEG de tipo succinimidil éster permiten la formación de un enlace covalente de tipo amida por reacción con los grupos amino en la superficie externa de las nanopartículas superparamagnéticas. En resumen, para conseguir la unión de las cadenas de PEG y la magnetoferritina, el PEG debe de estar derivatizado con grupos funcionales capaces de unirse por sí solos o con la ayuda de un reactivo a

10 la superficie de la magnetoferritina. El PEG se une preferiblemente mediante enlaces amida, siendo por lo tanto los derivados de PEG preferidos, como ya se ha comentado antes, los que contienen el grupo funcional succinimidil éster, que permite una funcionalización directa de las magnetoferritina, ya que este grupo éster activado reacciona con los grupos aminos que rodean las nanopartículas, formando el enlace covalente tipo amida. Uno de los PEG preferidos es PEG1163 MeO-PEG-COO-Su α -Metoxi- ω -ácido carboxílico succinimidil éster poli(etilenglicol) PEG-WM 2,000 Dalton. Los PEG funcionalizados como éster succinimidil son comerciales y su acoplamiento covalente a la partícula superparamagnético se puede llevar a cabo después de la introducción del ^{99m}Tc .

El número de cadenas de PEG introducidas se pueden controlar dependiendo de la estequiometría y del PEG empleados. Por ejemplo, cuando se utilizan derivados de éster activados, dada la alta reactividad de dichos ésteres y de las aminas de la nanopartícula superparamagnética, la reacción es completa, de tal forma que el número de PEG enlazados covalentemente a la superficie de la nanopartícula coincide con el número de moléculas del derivado de PEG/nanopartículas que se utiliza en la reacción. Además el número de cadenas introducidas se comprobó a través del uso de un patrón electroforético, analizando las diferentes magnetoferritinas derivatizadas con PEG y viendo su correspondencia con un aumento escalonado y gradual del peso molecular y por ende de una mayor retención. El PEG puede ser mono- o bifuncionalizado con ésteres activados y se pueden unir PEG con diferente densidad y cristalinidad. La estabilidad de la magnetoferritina de la invención se ve aumentada por la introducción del biopolímero, y en especial cuando este es PEG, pero este mayor aumento de la estabilidad no es proporcional al número de cadenas introducidas. Por lo tanto, aunque se puede introducir entre 1 y 72 cadenas, se pueden dejar grupos amino libre por si se desea realizar subsiguientes derivarizaciones o simplemente para reducir los coste de fabricación. Preferiblemente se incorporan de media entre 3 y 10 cadenas de PEG por magnetoferritina y más preferiblemente entre 4 y 6.

A continuación se detallan algunos de los derivados de PEG útiles para la presente invención:

35 i) MeO-PEG-COOH: PEG1156 MeO-PEG(11)-COOH α -Metoxi- ω -ácido propanoico unde(etilenglicol) PEG-WM 588,7 g/mol, PEG1161 MeO-PEG-COOH α -Metoxi- ω -ácido carboxílico poli(etilenglicol) PEG-WM 750 D, PEG1158 MeO-PEG-COOH α -Metoxi- ω -ácido carboxílico poli(etilen glicol) PEG-WM 2,000 D, PEG1160 MeO-PEG-COOH α -Metoxi- ω -ácido carboxílico poli(etilenglicol) PEG-WM 5,000 D, PEG1157 MeO-PEG-COOH α -Metoxi- ω -ácido carboxílico poli(etilenglicol) PEG-WM 10,000 D, PEG1159 MeO-PEG-COOH α -Metoxi- ω -carboxílico ácido poli(etilenglicol) PEG-WM 20,000 D, PEG1166 MeO-PEG-COO-Su α -Metoxi- ω -ácido carboxílico succinimidil éster poli(etilenglicol) PEG-WM 750 D, PEG1163 MeO-PEG-COO-Su α -Metoxi- ω -carboxílico ácido succinimidil éster poli(etilenglicol) PEG-WM 2,000 D, PEG1165 MeO-PEG-COO-Su α -Metoxi- ω -ácido carboxílico succinimidil éster poli(etilenglicol) PEG-WM 5,000 D, PEG1162 MeO-PEG-COO-Su α -Metoxi- ω -ácido carboxílico succinimidil éster poli(etilenglicol) PEG-WM 10,000 D, PEG1164 MeO-PEG-COO-Su α -Metoxi- ω -ácido carboxílico succinimidil éster poli(etilenglicol) PEG-WM 20,000 D,

50 ii) HOOC-PEG-COOH: PEG1091 HOOC-PEG(12)-COOH α,ω -Bis(propionico ácido) duodeca(etilen glicol) PEG-WM 2,000 690,8 g/mol, PEG1083 HOOC-PEG-COOH α,ω -Bis-carboxi poli(etilen glicol) PEG-WM 2,000 D, 4 PEG1085 HOOC-PEG-COOH α,ω -Bis-carboxi poli(etilen glicol) PEG-WM 3,000 D PEG1086 HOOC-PEG-COOH α,ω -Bis-carboxi poli(etilenglicol) PEG-WM 6,000 D, PEG1082 HOOC-PEG-COOH α,ω -Bis-carboxi poli(etilenglicol) PEG-WM 10,000 D PEG1084 HOOC-PEG-COOH α,ω -Bis-carboxi poli(etilen glicol) PEG-WM 20,000 D,

55 iii) NHS-PEG-NHS: PEG1184 Su-OOC-PEG-COO-Su α,ω -Di-succinimidil éster poli(etilen glicol) PEG-WM 2,000 D, PEG1186 Su-OOC-PEG-COO-Su α,ω -Di-succinimidil éster poli(etilen glicol) PEG-WM 3,000 D, PEG1187 Su-OOC-PEG-COO-Su α,ω -Di-succinimidil éster poli(etilen glicol) PEG-WM 6,000 D, PEG1183 Su-OOC-PEG-COO-Su α,ω -Di-succinimidil éster poli(etilen glicol) PEG-WM 10,000 D, PEG1185 Su-OOC-PEG-COO-Su α,ω -Di-succinimidil éster poli(etilen glicol) PEG-WM 20,000 D,

60 iv) H₂N-PEG-COOH: PEG1096 H₂N-PEG-COOH*HCl α -Amino- ω -carboxi poli(etilen glicol) clorohidrato PEG-WM 3,000 D, PEG1097 H₂N-PEG-COOH*HCl α -Amino- ω -carboxi poli(etilenglicol) clorohidrato PEG-WM 5,000 Dalton PEG1095 H₂N-PEG-COOH*HCl α -Amino- ω -carboxi poli(etilenglicol) clorohidrato PEG-WM 10,000 Dalton.

65 Se eligió preferiblemente el PEG1163 MeO-PEG-COO-Su α -Metoxi- ω -carboxílico ácido succinimidil éster poli(etilen glicol) PEG-WM 2,000 Dalton. El derivado de PEG que contiene el grupo funcional succinimidil éster, permite una funcionalización directa de las magnetoferritinas ya que este grupo éster activado reacciona con los grupos aminos que rodean las nanopartículas, formando un enlace covalente tipo amida.

Los datos experimentales han demostrado que después de 3 h de inyección, las partículas se acumulan de forma significativa en pulmón. Por otra parte, puesto que controlar la cantidad de Tc/partícula (en un rango 0-20, con un 100% prácticamente de incorporación de Tc) permite que se pueda alcanzar de sobra el rango óptimo de concentraciones de Tc (10^{-9} M) y el de MRI (del orden de 10^{-5} M).

Otro de los aspectos es proporcionar un método para la síntesis de las magnetoferritina de la presente invención. Aunque la introducción de la magnetita se puede hacer mediante el proceso descrito por Douglas (Masaki Uchida, Masahiro Terashima, Charles H. Cunningham, Yoriyasu Suzuki, Deborah A. Willits, Ann F. Willis, Philip C. Yang, Philip S. Tsao, Michael V. McConnell, Mark J. Young and Trevor Douglas, *Magnetic Resonance in Medicine* 60:1073-1081 (2008)), los presentes inventores han desarrollado una variación, que proporcionan algunas ventajas. El método de la invención comprende al menos las etapas de:

a) preparar una disolución de apoferritina, preferiblemente de concentración entre 0,1 y 100 mg/ml, y más preferiblemente entre 5 y 20 mg/ml,

b) Preparar una disolución que comprenda Fe(II) y Fe(III) en estequiometría aproximada de 1:2, es decir entre 1:1,8 a 1,8:1

c) preparar una disolución de pertecnectato (^{99m}Tc)

d) adicionar de forma intercalada la disolución preparada en el paso (b) y la disolución preparada en la etapa (c) sobre la preparada en el paso (a).

f) Preferiblemente, se aísla la magnetoferritina superparamagnética dopada con ^{99m}Tc .

La estequiometría inicial de Fe(II) y Fe(III) es determinante para la preparación apropiada de magnetoferritina y por ende de sus propiedades magnéticas. A diferencia del método reportado por Douglas y colaboradores, dónde todo el Fe de partida está en su estado de oxidación Fe(II) y se ha comprobado que con un riguroso control de la extensión de la oxidación, en nuestro método, el balance estequiométrico de partida confiere las condiciones óptimas y no requiere un control exhaustivo de la entrada de aire en el sistema.

Las sales de hierro (II) y (III) útiles para la preparación de la magnetoferritina son conocidas por los expertos en la materia. En una realización preferida la etapa (b) se prepara mezclando una disolución que comprende sulfato de hierro(II) amoníaco hexahidratado con otra que comprende $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ en HCl.

La inclusión de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ se lleva a cabo mediante pequeñas adiciones de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ al mismo tiempo que se hace la red de magnetita. Se puede dializar la disolución resultante en bolsas de diálisis con tamaño de poro adecuado y separar las partículas de todo el material restante. En la disolución que no contiene las partículas se puede medir la concentración de Tc y de esta forma se conoce el porcentaje de Tc incorporado. En algunos casos se ha estudiado el comportamiento del MoO_4^{2-} , porque tiene una química muy similar a del $^{99m}\text{TcO}_4^-$, pero no es radioactivo. Se ha observado que para pequeños contenidos de Mo (0-20 átomos de Mo/magnetoferritina), la incorporación es prácticamente del 100%.

Con objeto de llevar una caracterización más pormenorizada que permita conocer la distribución de Tc en la nanopartícula superparamagnética, se llevó a cabo un estudio mediante Microscopía Electrónica de Transmisión de muestras similares en las que en vez de usar el radiomarcador pertecnectato, se usaron otros aniones del tipo molibdato, vanadato, arseniato y fosfato. La química de estos aniones es similar a la del pertecnectato, especialmente si no hay cambios del estado de oxidación del metal.

El estudio de Microscopía Electrónica de Transmisión es de especial utilidad en el caso de las nanopartículas dopadas con vanadato; esta técnica nos proporciona tanto información sobre la distribución del tamaño de las nanopartículas como sobre la composición química y distribución espacial de los estados de oxidación en nanopartículas individuales. Las imágenes de campo oscuro a alto ángulo son sensibles al número atómico del material, es decir, aquellas zonas en la que estén presentes los elementos más pesados se mostrarán en la imagen como puntos de mayor intensidad. En nuestro caso de estudio, las nanopartículas, al contener elementos de alto número atómico, aparecerán en la imagen con alto contraste, siendo visualizadas directamente y de forma individual. En estas condiciones de registro de la imagen se puede realizar medidas directas del tamaño de las nanopartículas presentes en la muestra, a partir de las cuales se puede establecer una distribución de tamaños de partícula. Adicionalmente se puede determinar la distribución espacial, con resolución sub-nanométrica, de los elementos químicos presentes en las partículas individuales, utilizando la técnica de pérdida de energía de los electrones (EELS). Esta técnica nos permite estudiar directamente las transiciones electrónicas que ocurren en el átomo cuando este es sometido a un haz de electrones de alta energía, 200 kV. En particular esta técnica mide la energía que el electrón incidente pierde cuando interacciona con un átomo. Por ejemplo en el caso de los átomos de Vanadio, se estudian directamente las transiciones L_{2,3} donde los electrones 2p del átomo son transferidos a estados no ocupados sobre el nivel de Fermi. La energía requerida para esta transición es un valor característico para cada átomo y es igual a la energía perdida por el electrón incidente. Así, midiendo la pérdida de energía de los electrones incidentes uno puede identificar los distintos elementos presentes en las nanopartículas, (V 513eV, O 532eV, Fe 708eV). Adicionalmente la estructura fina del espectro EELS de los

metales de transición se caracteriza por la presencia de dos picos intensos (líneas blancas) cuya intensidad y posición en energía varía en función del estado de oxidación del material (Leapman *et al* Phys. Rev. Lett. 45, 397 (1980), Turquat *et al*. International Journal of Inorganic Materials 3 (2001) 1025-1032). El estudio detallado de la estructura fina del pico de absorción refleja información sobre el estado electrónico del material pudiendo estudiar las posibles variaciones del estado de oxidación del hierro o vanadio a través de las nanopartículas.

El estudio de la composición química y los estados de oxidación en nanopartículas individuales fue llevado a cabo combinando las propiedades de las imágenes en campo oscuro a alto ángulo con la espectroscopia de pérdida de energía de los electrones, utilizando el método de adquisición conocido como espectro-imagen (Tence, M. Quartuccio and C. Colliex, Ultramicroscopy 58 (1995) 42, Maigne *et al* Journal of Electron Microscopy 58(3): 99-109 (2009)). Este modo consiste en adquirir simultáneamente la señal de campo oscuro a alto ángulo y los espectros EELS mientras la sonda barre una zona predeterminada, imagen (1D) o espectro línea. En particular utilizando un tiempo de adquisición de 2 segundos se adquirió un espectro EELS, con energía de dispersión de 0,5 eV, cada 0,6 nm a lo largo de una línea de 36,7 nm que pasa a través de las nanopartículas. El análisis de cada uno de los espectros adquiridos (cuantificación y estudio del estado de oxidación) a lo largo de la nanopartícula nos proporciona la composición y estado de oxidación del metal caracterizado a la escala subnanométrica.

Preferiblemente en el método en la disolución de la etapa (a) esta tamponada con AMPSO a un pH entre pH 7,5 y 9,5, preferiblemente entre 8,0 y 9,0.

En una realización particular, las cadenas del polímero biocompatible, preferiblemente PEG, se hacen reaccionar con la magnetoferritina después de la inclusión de la magnetita/Tc.

Otro aspecto se refiere a una composición farmacéutica que comprende las magnetoferritina de la presente invención y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, así como el uso de dicha composición farmacéutica para la preparación de un medicamento.

La magnetoferritina de la presente invención así como la composición farmacéutica que las incluye son útiles para la preparación de un medicamento para la diagnosis de diferentes enfermedades, según la utilización de moléculas que lo confieran especificidad por un tejido u órgano en cuestión, pero en especial cáncer, incluyendo cáncer cervical, de cabeza y cuello, renal y de uréter, de colon, recto y ano, de endometrio, de esófago, de estómago, de hígado, de laringe, de ovario, de páncreas, de piel, de próstata, de pulmón, de cerebro, de testículo, leucemia, melanoma, y linfoma.

Además de para detectar enfermedades también son útiles tanto la magnetoferritina de la presente invención así como la composición farmacéutica que las comprende como agentes de contraste en general y como agente de contraste en MRI o gammagrafía en particular.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Ejemplos

Síntesis de magnetoferritina-^{99m}Tc

Disolución 1. Se preparan 10 ml una disolución de apoferritina (Sigma-Aldrich Ref. A341-1G, lot. 048K7004) de concentración 10 mg/ml en tampón AMPSO pH 8,6 (Sigma A6659). La disolución se desgasifica con una corriente fuerte de argón y en agitación durante 10 min.

Disolución 2. Se preparan dos disoluciones: 5 ml de Sal de Mohr (Amonio de hierro (II) sulfato hexahidratado, Aldrich Chem. 20, 350-5) 0,05 M en HCl 0,01 M y 5 ml de Fe (NO₃)₃ 0,1 M en HCl 0,01 M, se mezclan y se desgasifica con una corriente fuerte de argón y en agitación durante 10 min.

Disolución 3. Una disolución de NaOH 0,1 M se desgasifica con una corriente fuerte de argón y en agitación durante 10 min.

Disolución 4. Una disolución de perteneccato (^{99m}Tc) obtenida a partir de kit comercial se desgasifica con una corriente fuerte de argón y en agitación durante 2 min.

Suspensión 5. Se lleva a cabo la adición lenta de la disolución 2 sobre la disolución 1. Se llevan a cabo adiciones de 0,25 ml cada 2 min hasta completar 1 ml. Antes de la 5 adición de la disolución 2, se adicionan 56 μl de la disolución de ^{99m}Tc (disolución 4).

Disolución 6. A la suspensión 5 se le adiciona lentamente 1 ml de una disolución de citrato sódico 0,1 M para eliminar todo los compuestos metálicos que no hayan quedado encapsulados en la apoferritina. La disolución resultante se cromatografía (10 min) en columna de exclusión por tamaño (Sephadex G-25, lot. 360710, GE Healthcare, PD-

10 Desalting Columns, 17-0851-01), obteniendo la disolución final 6 que contiene magnetita dopada con ^{99m}Tc encapsulada en la cavidad de la apoferritina.

Adición del radioisótopo de Tc a la magnetoferritina

5

Disolución 4. Se usa un generador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ de 12 GBq de actividad calibrada. La elución realizada es analizada en términos de actividad de ^{99m}Tc . Conocida la relación específica $\text{mCi}/\mu\text{g}$ de ^{99m}Tc , es posible controlar la cantidad de Tc utilizada y por ende su actividad radioquímica.

10

Suspensión 5. Se lleva a cabo la adición lenta de la disolución 2 sobre la disolución 1. Se llevan a cabo adiciones de 0,25 ml cada 2 min hasta completar 1 ml. Antes de la 5 adición de la disolución 2, se adicionan 0,5 ml de la disolución de ^{99m}Tc (disolución 4).

15

Para la realización del control de calidad usamos tiras de papel Whatman 3 MM de 10 cm de longitud y 0,5 cm de ancho, en las que depositamos una alícuota (150 μl) del radiofármaco marcado, y para su desarrollo las introducimos en tanques cromatográficos con acetona hasta unos 0,5 mm de la base. Cuando la cromatografía se ha desarrollado la medimos en el Radio Cromatógrafo Minigita Raytest. En el origen de la tira cromatográfica se quedarán los coloides ($R_f=0$), en este caso la magnetoferritina dopada con Tc, y en el frente el pertecnetato libre ($R_f=1$)

20

Acoplamiento de PEG

El derivado de polietilenglicol MeO-PEG-NHS α -Metoxi- ω -carboxílico ácido succinimidil éster poli(etilenglicol) (PEG-MW 2.000 Dalton)/MW 2.000 g/mol se adquirió en Iris Biotech GmbH (PEG1164, lot. 125447).

25

Disolución 7. 1000 moles de PEG (0,0058 g en 0,5 ml de agua bidestilada) fueron añadidos a la disolución 8 y se dejó 30 min en agitación suave y a temperatura ambiente. Se cromatografió (10 min) en una columna de exclusión por tamaño (Sephadex G-25, lot. 360710, GE Healthcare, PD-10 Desalting Columns, 17-0851-01) hasta obtener una disolución pura de nanopartículas de magnetita dopadas con ^{99m}Tc , acopladas covalentemente con un biopolímero de PEG.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una magnetoferritina superparamagnética, **caracterizada** porque el núcleo de magnetita ocluye ^{99m}Tc .
- 5 2. La magnetoferritina superparamagnética según la reivindicación anterior, **caracterizada** porque la especie de Tc es $^{99m}\text{TcO}_4^-$.
3. La magnetoferritina superparamagnética según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada** porque la concentración de la especie ^{99m}Tc está comprendida entre 10^{-9} - 10^{-5} M.
- 10 4. La magnetoferritina superparamagnética según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada** porque tiene cadenas de un polímero biocompatible covalentemente unidas a la superficie de la magnetoferritina.
5. La magnetoferritina superparamagnética según la reivindicación anterior, **caracterizada** porque el polímero biocompatible es polietilén glicol.
- 15 6. La magnetoferritina superparamagnética según la reivindicación anterior, **caracterizada** porque el polietileno-glicol es PEG1163 MeO-PEG-COO-Su α -Metoxi- ω -carboxílico ácido succinimidil éster poli(etilen glicol) PEG-WM 2,000 Dalton.
7. La magnetoferritina superparamagnética según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores, **caracterizada** porque el PEG está unido mediante enlaces covalentes de tipo amida.
- 25 8. La magnetoferritina superparamagnética según cualquiera de las tres reivindicaciones anteriores, **caracterizada** porque tiene entre 3 y 10 cadenas de PEG unidas covalentemente a la superficie de la magnetoferritina.
9. Un método para la síntesis de cualquiera de las magnetoferritina superparamagnética como se definen en las reivindicaciones anteriores que comprende:
 - 30 a) preparar una disolución de apoferritina, preferiblemente de concentración entre 0,1 y 100 mg/mL, y más preferiblemente entre 5 y 20 mg/mL,
 - b) Preparar una disolución que comprenda Fe(II) y Fe(III) en estequiometría aproximada de 1:2.
 - 35 c) preparar una disolución de pertenectato (^{99m}Tc)
 - d) adicionar de forma intercalada la disolución preparada en el paso (b) y la disolución preparada en la etapa (c) sobre la preparada en el paso (a).
 - 40 f) Aislar la magnetoferritina superparamagnética dopada con ^{99m}Tc .
10. El método según la reivindicación anterior en la que la disolución de la etapa (b) se prepara mezclando una disolución que comprende sulfato de hierro (II) amoníaco hexahidratado con otra que comprende $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ en HCl.
- 45 11. El método según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores, donde la disolución de la etapa (a) esta tamponada con AMPSO a un pH entre pH 7,5 y 9,5, preferiblemente entre 8,0 y 9,0.
12. El método según cualquiera de las tres reivindicaciones anteriores para la síntesis de cualquiera de las magnetoferritina superparamagnética como se definen en las reivindicaciones 5 a 8, que comprende hacer reaccionar las magnetoferritina superparamagnética con el polímero biocompatible.
- 50 13. Una composición farmacéutica que comprende la magnetoferritina superparamagnética como se en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 55 14. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación anterior para la preparación de un medicamento.
15. El uso de la composición según la reivindicación anterior para la preparación de un medicamento para la diagnosis de cáncer.
- 60 16. La magnetoferritina superparamagnética según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o de la composición farmacéutica según la reivindicación 13 para la preparación de un medicamento para su uso como agente de contraste.
- 65 17. La magnetoferritina superparamagnética según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o de la composición farmacéutica según la reivindicación 13 para la preparación de un medicamento para su uso como agente de contraste en MRI o SPECT.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 200930845

22 Fecha de presentación de la solicitud: 14.10.2009

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

5 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| A | US 20070258888 A1 (FELDMANN et al.) 08.11.2007, párrafos [0007],[0009],[0012],[0019],[0022],[0035]. | 1-17 |
| A | WO 2008115854 A2 (GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, UNIVERSITY OF OXFORD) 25.09.2008, párrafos [0004],[0005],[0016],[0020],[0028],[0045],[0046]. | 1-17 |
| A | US 5491219 A (MANN) 13.02.1996, columnas 1,2. | 1-17 |
| A | P.E. DICKSON et al. "Properties of magnetoferritin: a novel biomagnetic nanoparticle" NANOSTRUCTURED MATERIALS, vol. 9, 1997, páginas 595-598. | 1-17 |
| A | DOMINIC P.E. DICKSON "Nanostructured magnetism in living systems" JOURNAL OF MAGNETISM AND MAGNETIC MATERIALS, vol. 203, 1999, páginas 46-49. Página 46, apartado 2 y página 48, apartado 3. | 1-17 |
| A | MASAKI UCHIDA et al. "A human ferritin iron oxide nano-composite magnetic resonance contrast agent" MAGNETIC RESONANCE IN MEDICINE, vol. 60, 2008, páginas 1073-1081. Resumen y página 1080, apartado conclusión. | 1-17 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
07.10.2011

Examinador
S. González Peñalba

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K49/14 (2006.01)

A61K51/08 (2006.01)

C07K14/435 (2006.01)

A61B5/055 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, A61B

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 07.10.2011

Declaración

| | | |
|-------------------------------------------------|-----------------------|-----------|
| Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones 1-17 | SI |
| | Reivindicaciones | NO |
| Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986) | Reivindicaciones 1-17 | SI |
| | Reivindicaciones | NO |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| D01 | US 20070258888 A1 (FELDMANN et al.) | 08.11.2007 |
| D02 | WO 2008115854 A2 (GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, UNIVERSITY OF OXFORD) | 25.09.2008 |
| D03 | US 5491219 A (MANN) | 13.02.1996 |
| D04 | P.E. DICKSON et al. "Properties of magnetoferritin: a novel biomagnetic nanoparticle" NANOSTRUCTURED MATERIALS, vol. 9, 1997, páginas 595-598. | 1997 |
| D05 | DOMINIC P.E. DICKSON "Nanostructured magnetism in living systems" JOURNAL OF MAGNETISM AND MAGNETIC MATERIALS, vol. 203, 1999, páginas 46-49. Página 46, apartado 2 y página 48, apartado 3. | 1999 |
| D06 | MASAKI UCHIDA et al. "A human ferritin iron oxide nano-composite magnetic resonance contrast agent" MAGNETIC RESONANCE IN MEDICINE, vol. 60, 2008, páginas 1073-1081. Resumen y página 1080, apartado conclusion | 2008 |

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente, tal y como ha sido redactada, hace referencia a una magnetoferritina superparamagnética caracterizada porque el núcleo de magnetita ocluye ^{99m}Tc (reivindicaciones 1-3). Dicha magnetoferritina superparamagnética tiene además cadenas de un polímero biocompatible covalentemente unidas a la superficie de la magnetoferritina; donde el polímero biocompatible es polietilén glicol (reivindicaciones 4-8). Se reivindica también el método de síntesis de la magnetoferritina superparamagnética (reivindicaciones 9-12); así como una composición que comprende la magnetoferritina de la invención (reivindicación 13) y su uso para la preparación de un medicamento (reivindicación 14) para el diagnóstico de cáncer (reivindicación 15) y como agente de contraste (reivindicación 16), concretamente en MRI o SPECT (reivindicación 17).

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA: L P ARTS. 6 Y 8.

El documento D01 hace referencia a un nuevo agente de contraste apropiado para distintas técnicas de imagen tales como MRI, SPECT, etc (véase párrafos [0007] y [0009]). Dicho agente de contraste comprende partículas que consisten en un núcleo que comprende un óxido, una mezcla de óxidos o hidróxidos de un elemento seleccionado de entre otros Fe (véase párrafos [0012] y [0022]). Además dicho núcleo contiene preferiblemente ^{99}Mo , éste es ventajoso, ya que ^{99}Mo puede ser transformado en ^{99m}Tc mediante técnicas de reactor convencionales (véase párrafo [0019]). Por otro lado, dicho agente de contraste puede contener polietilén glicol en una capa envolvente para proporcionar biocompatibilidad (véase párrafo [0035]).

El documento D02 se refiere a una nanopartícula multifuncional que puede usarse en tres diferentes técnicas de imagen como son: de resonancia magnética, óptica y radioisótopo. Dicha partícula comprende: a) un núcleo metálico, b) una capa envolvente biocompatible y c) una biomolécula conjugada con la capa envolvente biocompatible y un ligando multidentado (véase párrafos [0004] y [0005]).

El núcleo metálico puede ser de entre otros Fe, tales como óxido de hierro superparamagnéticos (véase párrafo [0016]). La capa covalente biocompatible puede ser polietilén glicol (PEG) entre otros (véase párrafo [0020]). La biomolécula puede ser o bien moléculas sintéticas o bien naturales, que tengan cierto papel en el sistema biológico (DNA, inmunoglobulinas etc) (véase párrafo [0028]). Y por último, el ligando multidentado se encuentra conjugado con un agente de imagen que es opcionalmente radioactivo, tales como entre otros ^{99m}Tc (véase párrafos [0045] y [0046]).

El documento D03 describe un método de síntesis de una magnetoferritina superparamagnética útil en técnicas de imagen (véase columna 1 y 2)

El documento D04 trata de las propiedades de una nueva nanopartícula biomagnética: la magnetoferritina.

El documento D05 hace referencia al estudio de la ferritina y su derivado magnetoferritina como sistema modelo superparamagnético (véase página 46, apartado 2); y como material magnético a nivel de nano-fase (véase página 48, apartado 3).

El documento D06 describe el uso como agente de contraste para RMI de una ferritina humana. Se trata de una ferritina de cadena H humana recombinante (rHF_n) que encapsula una magnetita mineralizada (o maghemita) (véase resumen y página 1080, apartado conclusión).

Ninguno de los documentos considerados solos o en combinación revela una magnetoferritina superparamagnética cuyo núcleo de magnetita ocluya ^{99m}Tc . Además en los documentos citados no existen sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en las reivindicaciones 1-17. Por lo tanto el objeto de las reivindicaciones 1-17 cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva de acuerdo con la L P artículos 6 y 8.