



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 324 003**

21 Número de solicitud: 200702051

51 Int. Cl.:

H01F 1/00 (2006.01)

H01F 1/42 (2006.01)

A61K 33/26 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 49/18 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **23.07.2007**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **28.07.2009**

Fecha de la concesión: **13.05.2010**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **31.05.2010**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
31.05.2010

73 Titular/es: **Universidad de Granada
Hospital Real - Cuesta del Hospicio, s/n
18071 Granada, ES**

72 Inventor/es: **Arias Mediano, José Luis;
Gallardo Lara, Visitación;
Ruiz Martínez, María Adolfina y
López-Viota Gallardo, Margarita**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

54 Título: **Nanopartículas constituidas por un núcleo magnético y un recubrimiento polimérico.**

57 Resumen:

Nanopartículas constituidas por un núcleo magnético y un recubrimiento polimérico.

Dichas nanopartículas tienen un diámetro medio inferior a 1 micrometro y comprenden un recubrimiento y un núcleo magnético, en la que dicho recubrimiento comprende un látex de etilcelulosa y dicho núcleo magnético comprende, al menos, una partícula de un metal sensible a campos magnéticos con un diámetro inferior a 0,95 micrometros. Dichas nanopartículas pueden ser utilizadas como sistemas transportadores de fármacos, entre otras aplicaciones.

ES 2 324 003 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas constituidas por un núcleo magnético y un recubrimiento polimérico.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nanopartículas, un método para su producción y sus aplicaciones.

Antecedentes de la invención

10

La tecnología de los transportadores magnéticos se originó en la década de 1940 a partir de estudios sobre el tratamiento de aguas residuales, donde se pretendía absorber materia orgánica en pequeñas partículas de magnetita para lograr su separación del resto de líquido procesado. Dentro de las aplicaciones biológicas de esta tecnología destacan el tratamiento de aguas residuales, la inmovilización enzimática, la separación magnética por afinidad de biomoléculas, la selección de un tipo de células de entre una población celular, el transporte de fármacos y los biosensores.

15

Con el desarrollo de los métodos físicos y químicos para la caracterización del óxido de hierro coloidal, durante la década de los 60, comenzaron a aparecer las primeras aplicaciones biomédicas de los fluidos magnéticos en radiodiagnóstico y emboloterapia. La aparición de microcápsulas magnéticas como soportes de moléculas biológicas dio lugar al uso de matrices y de numerosos recubrimientos poliméricos biológicos y sintéticos, para ser utilizados como transportadores magnéticos en dispositivos biomédicos, agentes de contraste superparamagnéticos orales e intravenosos, y transportadores de fármacos.

20

La encapsulación de partículas inorgánicas por polímeros orgánicos, dota a las partículas recubiertas de nuevas propiedades. El recubrimiento incrementa la compatibilidad de las partículas inorgánicas con compuestos orgánicos, reduce su susceptibilidad a la coagulación o precipitación, y las protege contra la oxidación superficial. Por lo tanto, la encapsulación incrementa la dispersabilidad y la estabilidad química, y reduce al mismo tiempo la toxicidad de estos materiales (Tartaj P., Morales M.P., Veintemillas-Verdaguer S., González-Carreño T., Serna C.J., J. Phys. D: Appl. Phys., 36, R182, 2003).

25

En esta línea, las patentes US 5.705.222 y US 6.045.925 proponen la obtención de partículas de entre 1 y 100 nanómetros (nm) con una distribución de tamaños muy dispersa, constituidas por un núcleo de óxido metálico y un recubrimiento polimérico de diversa naturaleza (ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, polivinilalcohol, poliamida o polipéptido), mediante contacto en suspensión entre ambos materiales.

30

La patente US 5.952.131 describe un método de obtención, mediante polimerización en emulsión a 80°C, de partículas constituidas por un núcleo y un recubrimiento de diferente naturaleza polimérica (alquilmacrilatos, etc.), con un tamaño de hasta 2 micrómetros (μm).

35

Sin embargo, materiales de esta naturaleza carecen de especial interés biomédico ya que no presentan una respuesta magnética adecuada a campos y gradientes magnéticos alcanzables técnicamente, por ejemplo a la velocidad de flujo presente en los sistemas fisiológicos. Además, el tamaño de estos sistemas generalmente es demasiado elevado como para poder utilizarse en aplicaciones biomédicas, por ejemplo en el diseño de sistemas transportadores de fármacos que precisan de una distribución a nivel capilar y una perfusión uniforme al lugar deseado. Además, carecen de máxima biocompatibilidad y mínima antigenicidad, y sus productos de degradación son tóxicos y no biodegradables. Por otro lado, su reproducibilidad a gran escala es complicada y costosa.

40

La patente US 5.814.687 describe un método de obtención de partículas constituidas por magnetita, ferrita de cobalto o ferrita de manganeso, como núcleo magnético, y un recubrimiento constituido por polímeros y copolímeros de metacrilatos, mediante la polimerización en emulsión o en suspensión del monómero en presencia de los núcleos. Las partículas obtenidas poseen un tamaño entre 0,5 y 30 μm y se sugiere su aplicación al diagnóstico inmunológico, a la purificación y el aislamiento, y al transporte de fármacos.

50

La patente US 4.871.716 propone la dispersión de núcleos de magnetita en partículas poliméricas (albúmina, polilisina, poliarginina o polihistidina) para la obtención de nanopartículas con un tamaño entre 0,05 y 500 μm .

55

Algunos de estos materiales no presentan una magnetización elevada, por lo que es preciso utilizar campos y gradientes magnéticos elevados para lograr, por ejemplo, su direccionabilidad en los sistemas fisiológicos. En otros su elevado tamaño, al menos 1 μm , no permite una adecuada aplicación, por ejemplo, como sistemas transportadores de fármacos ya que difícilmente se lograría una adecuada distribución a nivel capilar. Las partículas quedarían retenidas en la red de vasos sanguíneos pequeños, pudiendo incluso producir un colapso de la red capilar. Además, los fenómenos de extravasación, necesarios para un óptimo efecto terapéutico del principio activo, desde el capilar hasta el tejido u órgano diana sólo se han observado en partículas de tamaño inferior a 1 μm (Gupta A.K., Gupta M., Biomaterials, 26, 3995, 2005). Para aplicaciones biológicas es necesario estudiar las características de biocompatibilidad y toxicidad de estos materiales y sus productos de degradación y algunos son inadecuados para estas aplicaciones. Finalmente, algunas de las técnicas de obtención de estos materiales compuestos pueden no ser lo suficientemente baratas y simples para su reproducción a gran escala.

60

65

ES 2 324 003 B1

Por otro lado, estos sistemas compuestos no poseen exclusivamente aplicaciones biomédicas. Por ejemplo, la patente US 6.232.026 describe un procedimiento de obtención de partículas en las que el recubrimiento está constituido por ferritas, mientras que el núcleo tiene una naturaleza polimérica (polivinilideno, resina silicónica o polimetacrilato) para electrografía; mientras que la patente US 5.998.076 describe la obtención de partículas de óxidos metálicos recubiertas con polímeros de diferente naturaleza (poliestireno, polivinilacetato, polietileno, polimetacrilato, etc. o copolímeros de éstos), con un tamaño entre 30 y 100 μm , para su empleo en la obtención de imágenes xerográficas.

La principal aplicación biomédica de los látex de etilcelulosa es el diseño de formas farmacéuticas de diferente naturaleza. Destaca su uso en la formulación de inyectables y preparados oftálmicos, aportando a éstos últimos un mayor tiempo de contacto ocular. Es importante también su aplicación en la elaboración de formas farmacéuticas orales para la obtención de películas de recubrimiento de principios activos y comprimidos matriciales, que constituyen formas farmacéuticas de liberación modificada. Este recubrimiento polimérico puede también permitir enmascarar sabores desagradables, mejorar la estabilidad del fármaco o separar físicamente componentes que son incompatibles en estado sólido. Además, son numerosas las formulaciones líquidas y los aerosoles elaborados utilizando estos sistemas. Por ejemplo, las patentes US 7.074.430, US 7.108.865, US 7.097.851 y ES 2.206.047, entre otras, describen la utilización de este tipo de látex de etilcelulosa en el diseño de formas farmacéuticas orales de acción controlada que permiten el transporte de fármacos.

Sin embargo, el látex de etilcelulosa bajo esas condiciones de uso, ve enormemente mermadas sus aplicaciones biomédicas, las cuales quedan limitadas casi exclusivamente al diseño de formas farmacéuticas y sistemas transportadores de fármacos. Además, y en este sentido, las formas de dosificación convencionales (comprimidos, jarabes, etc.) de las que forma parte, presentan el inconveniente de precisar una administración crónica para mantener una concentración de fármaco que garantice y mantenga el efecto terapéutico. Esta pauta de tratamiento puede provocar un bajo índice de cumplimiento terapéutico o generar considerables fluctuaciones en las concentraciones plasmáticas de fármaco entre dosis, lo que dará lugar a una respuesta subterapéutica o a reacciones adversas. Otra posible causa de aparición de efectos secundarios es la distribución de una proporción importante del fármaco en regiones no deseadas del organismo. Además, esta distribución sistémica o una pobre absorción provoca que la concentración de fármaco en el lugar de acción sea baja y no produzca el efecto terapéutico deseado.

En la patente US 4.177.177 se describe la producción de partículas poliméricas que comprenden etilcelulosa en las que no se incorporan metales magnéticos.

Escasos han sido los intentos de mejorar las utilidades biomédicas de estos polímeros. La patente US 4,177,253 describe un procedimiento de obtención, mediante deposición electrofítica o adhesión, de partículas constituidas por núcleos de etilcelulosa y un recubrimiento de material orgánico o inorgánico, para el diseño de material para inmuensayos. Con respecto a la aplicación del látex de etilcelulosa en el diseño de sistemas transportadores de fármacos, la patente US 4.833.060 describe un procedimiento de obtención de partículas constituidas por un núcleo de magnetita y un recubrimiento de etilcelulosa, con un tamaño de 5,9 a 14 μm . Sin embargo, como ya se ha comentado, este tamaño de partícula resulta inadecuado para esta aplicación ya que puede inducir fenómenos de embolización de la red capilar, y, además, no permite una extravasación adecuada de las partículas al tejido u órgano diana. Por otro lado, conviene remarcar que los principales beneficios terapéuticos de un sistema transportador magnético coloidal de fármacos son la eliminación de reacciones adversas que frecuentemente derivan de la distribución sistémica de estos principios activos y la posibilidad de reducir la dosis precisa de fármaco por peso corporal, disminuyendo los efectos adversos derivados de las dosis tradicionales. Además, y como consecuencia de su concentración exclusiva en el lugar de acción, se solucionan los problemas de inestabilidad en los fluidos biológicos o *in vivo* del fármaco, se prolonga su acción terapéutica e, incluso, en el caso de los fármacos antitumorales, pueden minimizarse los fenómenos de resistencia celular. La incorporación de los núcleos magnéticos a la matriz polimérica del látex de etilcelulosa, mediante la emulsión en su presencia del polímero preformado, permite acrecentar el tipo de aplicaciones biosanitarias de este sistema.

Compendio de la invención

Ahora se ha encontrado, sorprendentemente, un método reproducible para la producción de nanopartículas, con un tamaño inferior a 1 micrometro, que comprenden un núcleo de partículas de un metal sensible a los campos magnéticos recubierto por un recubrimiento que comprende un látex de etilcelulosa que resuelve la totalidad o parte de los problemas del estado de la técnica mencionados previamente.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con una nanopartícula con un diámetro medio inferior a 1 micrometro que comprende un recubrimiento y un núcleo magnético, en la que dicho recubrimiento comprende un látex de etilcelulosa y dicho núcleo magnético comprende, al menos, una partícula de un metal sensible a campos magnéticos con un diámetro inferior a 0,95 micrometros. Dichas nanopartículas constituyen un sistema coloidal de estructura heterogénea, que comprende un núcleo magnético y un recubrimiento que comprende un látex de etilcelulosa, con capacidad para responder a campos magnéticos externos aplicados.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la producción de dichas nanopartículas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un sistema transportador de fármacos que comprende, al menos, una de dichas nanopartículas, y, al menos, un fármaco.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende dicho sistema transportador de fármacos junto con, al menos, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición que comprende al menos una de dichas nanopartículas y un vehículo.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dichas nanopartículas en el tratamiento de aguas residuales, en la fabricación de biosensores, en la inmovilización de enzimas, en la separación magnética por afinidad de biomoléculas, en la selección de un tipo de células de entre una población celular, en xerografía o en electrografía.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dichas nanopartículas como agente de contraste por resonancia magnética o en la elaboración de un agente de contraste por resonancia magnética.

Breve descripción de las figuras

En las Figuras 2, 3, 4 y 5 la letra “A” corresponde al hierro carbonilo, la “B” al látex de etilcelulosa y la “C” a las nanopartículas obtenidas en el Ejemplo 1 (ilustrativas de las nanopartículas de la invención).

Figura 1. (a) Fotografía de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución en campo oscuro de nanopartículas de la invención; (b) fotografía de microscopía electrónica de barrido de nanopartículas de la invención; y (c) fotografía de microscopía electrónica de barrido de las partículas de látex de etilcelulosa. Longitud de barra: 500 nm.

Figura 2. Espectro de infrarrojos de las partículas de hierro carbonilo (A), látex de etilcelulosa (B) y nanopartículas de la invención (C).

Figura 3. (a) Potencial zeta de las partículas de hierro carbonilo (A), látex de etilcelulosa (B) y nanopartículas de la invención (C) en función del pH para una concentración 10^{-3} M de NaNO_3 ; y (b) potencial zeta de las partículas de hierro carbonilo (A), látex de etilcelulosa (B) y nanopartículas de la invención (C) en función de la concentración de NaNO_3 a un pH = 5,5.

Figura 4. Valores de ΔG_{SLS} y carácter hidrófobo/hidrófilo de las partículas de hierro carbonilo (A), látex de etilcelulosa (B) y nanopartículas de la invención (C).

Figura 5. Ciclo de histéresis de las partículas de hierro carbonilo (A) y nanopartículas de la invención (C).

Figura 6. Fotografías de microscopio óptico (magnificación 63.0X) de una suspensión de nanopartículas de la invención en ausencia (a) o bajo la influencia de un campo magnético externo ($B = 0,2$ T) (b), que tiene la dirección que indica la flecha.

Figura 7. Gráfica que muestra la densidad de adsorción ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$), $-\Gamma_s$, de diclofenaco sódico por unas nanopartículas de la invención, en función de la concentración de dicho fármaco en el equilibrio.

Figura 8. Gráfica que muestra la densidad de absorción ($\mu\text{mol}/\text{g}$), Γ_m , de diclofenaco sódico absorbido por unas nanopartículas de la invención en función de la concentración de dicho fármaco en el equilibrio.

Descripción detallada de la invención

Nanopartículas

En un aspecto, la invención se relaciona con una nanocápsula o nanopartícula (también denominadas en esta descripción “nanopartícula(s) de la invención”) con un diámetro medio inferior a 1 micrometro que comprende un recubrimiento y un núcleo magnético, en la que dicho recubrimiento comprende un látex de etilcelulosa y dicho núcleo magnético comprende, al menos, una partícula de un metal sensible a campos magnéticos con un diámetro inferior a 0,95 micrometros.

Metal sensible a campos magnéticos

Tal como aquí se utiliza, la expresión “metal sensible a campos magnéticos”, “metal sensible a los campos magnéticos” o “metal magnético” incluye a los metales con propiedades magnéticas, en particular, se considera que un metal es sensible a los campos magnéticos si tiene una susceptibilidad inicial χ_i igual o superior a 0,1, preferiblemente igual o superior a 0,5, más preferiblemente comprendida entre 1 y 30, todavía más preferiblemente comprendida entre 1 y 20, más preferiblemente entre 2 y 15. Prácticamente cualquier metal con propiedades magnéticas puede ser utilizado para la puesta en práctica de la presente invención. Dichos metales magnéticos y sus características magnéticas forman parte del conocimiento general común de un experto en la materia, el cual seleccionará el metal magnético con las propiedades magnéticas más adecuadas para el uso al que vayan destinadas las nanopartículas de la invención. En aplicaciones biomédicas, los campos magnéticos que se utilizan son generalmente de 0,2 a 2,0 Teslas (T), aunque no puede descartarse el uso de campos magnéticos más potentes.

ES 2 324 003 B1

En general, los metales magnéticos utilizados en la presente invención tienen una imanación de saturación igual o superior a 10 kA/m, preferiblemente igual o superior a 50 kA/m, más preferiblemente comprendido entre 100 y 3.000 kA/m.

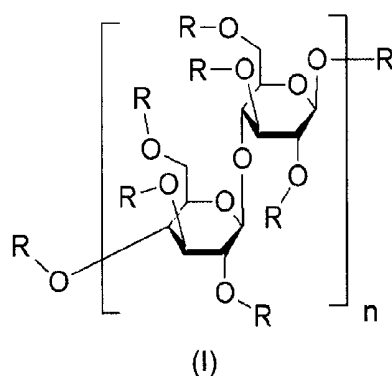
5 La determinación de los valores de susceptibilidad inicial y de imanación de saturación se puede realizar a partir de la curva de primera imanación y de los tramos lineales de la curva del ciclo de histéresis (campos bajos) del material, medidos ambos parámetros con un magnetómetro Manics DSM-8 (Francia) a temperatura ambiente ($25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$). Tanto la susceptibilidad inicial como la imanación de saturación se encuentran definidos en los siguientes textos de consulta: "Introduction to magnetism and magnetic materials", segunda edición, 1998; David C. Jiles; editorial: Chapman & Hall/CRC; "Introduction to magnetic materials", segunda edición, 2007; B.D. Cullity y C.D. Gram; editorial: Wiley-IEEE Press; y en la siguiente dirección electrónica: www.irm.umn.edu/hg2m/hg2m_b/hg2m_b.html

De acuerdo con una realización preferida, dicho metal magnético se selecciona entre el grupo que consiste en hierro carbonilo, magnetita, maghemita, ferritas de níquel, ferritas de cobalto, ferritas de cadmio, ferritas de hierro, ferritas de níquel-zinc-cobre, ferritas de bario, ferritas de estroncio, ferritas de cobalto-níquel, y mezclas de los mismos. Preferiblemente, dicho metal magnético es hierro carbonilo, el cual presenta una elevada saturación y susceptibilidad magnéticas, así como una forma y tamaño controlados. El hierro carbonilo puede obtenerse mediante tratamiento del hierro con monóxido de carbono, bajo calor y presión, obteniéndose hierro pentacarbonilo que posteriormente es descompuesto en condiciones controladas produciendo polvo de hierro extremadamente puro en forma de esferas casi perfectas. Además, a nivel fisiológico, la toxicidad del hierro carbonilo es considerablemente baja (LD_{50} : 50 g/kg) (Whittaker P., Ali S.F., Imam S.F., Dunkel V.C., Regul. Toxicol. Pharmacol., 36(3), 280, 2002; Huebers H.A., Brittenham G.M., Csiba E., Finch C.A., J. Lab. Clin. Med., 108(5), 473, 1986; Devathali S.D., Gordeuk V.R., Brittenham G.M., Bravo J.R., Hughes M.A., Keating L.J., Eur. J. Haematol., 46, 272, 1991; Chua-anusorn W., Macey D.J., Webb J., de la Motte Hall P., St. Pierre T.G., Biometals, 12, 103, 1999) y su eliminación se realiza principalmente mediante filtración renal (Okon E., Pouliquen D., Okon P., Kovaleva Z.V., Stepanova T.P., Lavit S.G., Kudryavtsev B.N., Jallet P., Lab. Invest., 71(6), 895, 1994).

Látex de etilcelulosa

30 El recubrimiento de las nanopartículas de la invención comprende como elemento principal un látex de etilcelulosa, es decir, un polímero hidrófobo ampliamente utilizado en tecnología farmacéutica, químicamente estable en almacenamiento y caracterizado por no presentar toxicidad a nivel fisiológico (Zinutti C., Kedzierewicz F., Hoffamn M., Benoit J.P., Maincent P., Int. J. Pharm., 133, 97, 1996; Kato T., Sato K., Sasaki R., Kakinuma H., Moriyama M., Cancer Chemother. Pharmacol., 37, 289, 1996). En este sentido, la inclusión de las partículas de metal magnético en otros sustratos poliméricos, tales como polímeros de la familia de los polialquilcianoacrilatos (PACA) (por ejemplo (p.ej.), polietil-2-cianoacrilato, polibutilciano-acrilato, polihexilcianoacrilato, polioctilcianoacrilato), polímeros poli-lactida (PLA) y poli-lactida-co-glicolida (PLGA), no afecta a la toxicidad de éstos últimos, como ya se ha estudiado en ensayos clínicos en fase I realizados con estos sistemas [Ibrahim A., Couvreur P., Roland M., Speiser P., J. Pharm. Pharmacol., 35, 59, 1983; Lübbe A.S., Bergemann C., Riess H., Schriever F., Reichardt P., Possinger K., Matthias M., Doerken B., Herrmann F., Guertler R., Hohenberger P., Haas N., Sohr R., Sander B., Lemke A.J., Ohlendorf D., Huhnt W., Huhn D., Cancer Res., 56(20), 4686, 1996; Lübbe A.S., Bergemann C., Huhnt W., Fricke T., Riess H., Brock J.W., Huhn D., Cancer Res., 56(20), 4694, 1996].

45 Un látex de etilcelulosa es un polímero de celulosa en el que un número variable de grupos hidroxilo están sustituidos con grupos etilo. Generalmente sigue la fórmula (I)



65 en donde cada grupo R se selecciona independientemente entre hidrógeno y etilo, estando el grado de etoxilación (porcentaje de grupos R que están sustituidos con etilo) comprendido entre el 10% y el 90%, preferiblemente entre el 30% y el 70%, más preferiblemente entre el 40% y el 60%; y "n" suele estar comprendido entre 20 y 50.

ES 2 324 003 B1

Existen diferentes variantes de la etilcelulosa disponibles comercialmente con distinto grado de etoxilación o con distintas características físicas, por ejemplo, con distintas viscosidades; todas ellas son adecuadas para los propósitos de la presente invención. En una realización particular, el látex de etilcelulosa usado en la presente invención es un látex de una etilcelulosa con el número CAS 9004-57-3 (grado de etoxilación de entre 48 y 49,5%; viscosidad en tolueno o alcohol de 45 cPs).

Caracterización de las nanopartículas de la invención

Aparte de la biocompatibilidad y de la capacidad de respuesta a campos magnéticos, la versatilidad biomédica de las nanopartículas de la invención se fundamenta en su pequeño tamaño (diámetro medio inferior a 1 micrometro). De acuerdo con una realización preferida, las nanopartículas de la invención tienen un diámetro medio de entre 200 y 950 nm, más preferiblemente entre 250 y 800 nm, más preferiblemente entre 275 y 700 nm, todavía más preferiblemente entre 300 y 600 nm. La determinación del tamaño de partícula se puede realizar por métodos convencionales. En una realización particular, el tamaño de partícula de las nanopartículas de la invención se determina mediante el análisis de las fotografías de microscopía electrónica de alta resolución de campo oscuro (Dark-Field HRTEM, realizadas con un microscopio electrónico de transmisión de alta resolución STEM PHILIPS CM20, Holanda) y confirmación mediante el estudio de las fotografías de microscopía electrónica de barrido (SEM), realizadas con un microscopio electrónico de barrido Zeiss DSM 950 (Alemania). En ambos casos, y antes de su observación, una suspensión diluida de las nanopartículas de la invención [en torno al 0,1% (p/v)] fue sonicada durante 5 minutos y se depositaron unas gotas en rejillas de cobre con película de formvar. A continuación, se secaron a 35°C en un horno de convección. La determinación del tamaño se realizó mediante medida directa sobre 250 partículas. El diámetro medio y la desviación típica se obtuvieron ajustando al histograma de tamaños obtenido una distribución logarítmica.

Preferiblemente, la proporción en peso látex de etilcelulosa:metal magnético está comprendida entre 6:1 y 1:6, más preferiblemente entre 4:1 y 1:4, más preferiblemente es aproximadamente 4:2. Con estas proporciones se aprecia que todas las partículas de metal magnético están recubiertas por una capa polimérica de entre 10 y 40 nm de grosor, normalmente de aproximadamente 30 nm (Figuras 1a y 1b).

Adicionalmente, las nanopartículas de la invención se pueden obtener con una excelente polidispersión, generalmente inferior a 1, más preferiblemente entre 0,05 y 0,7, todavía más preferiblemente entre 0,05 y 0,1.

El estado de la técnica incluye distintos métodos para obtener partículas del metal magnético con una forma, tamaños medios y heterogeneidad de tamaños adecuados, por ejemplo, métodos que comprenden someter distintas suspensiones de metal magnético [por ejemplo, 0,3% (p/v)] a (i) filtración y agitación en una célula de filtración con una membrana de 1 μm ; (ii) ultracentrifugación con una velocidad mínima de centrifugación de 100 rpm; (iii) separación magnética con un imán permanente; o (iv) separación por gravedad. Por tanto, para obtener unas partículas de metal magnético con una forma, tamaños medios y heterogeneidad de tamaños adecuados se puede utilizar cualquier método conocido en el estado de la técnica.

De acuerdo con una realización preferida, antes de su uso para la preparación de las nanopartículas de la invención, las partículas de metal magnético se someten a un proceso de separación por gravedad para conseguir la forma, tamaños medios y heterogeneidad de tamaños adecuados. Las variables de este método analizadas incluyen la influencia del tiempo de sedimentación y la cantidad de sobrenadante tomado de la suspensión. Los resultados obtenidos permitieron comprobar cómo se pasa de un diámetro medio de 700 ± 400 nm y un 30% de núcleos con un tamaño superior a 1 μm , en las muestras sin tratar, a un tamaño medio de entre 150 y 600 nm, típicamente unos 400 ± 200 nm, y ausencia de núcleos con un tamaño superior a 1 μm , si el tiempo de sedimentación es superior a 60 minutos, preferiblemente comprendido entre 60 y 180 minutos, más preferiblemente entre 60 y 100 minutos, y el volumen de sobrenadante retirado no supera los 100 mililitros (mL), preferiblemente entre 10 y 100 mL, más preferiblemente entre 40 y 80 mL. El volumen de sobrenadante retirado normalmente no supera el 10% del volumen total de la suspensión de partículas de material magnético, y, preferiblemente, se retira entre el 1% y el 10%, más preferiblemente entre el 4% y el 8%, de sobrenadante.

A modo ilustrativo, la separación de las partículas del material magnético mediante sedimentación por gravedad puede realizarse según el siguiente procedimiento: se sonica en un baño de ultrasonidos una suspensión al 0,3% (p/v) de material magnético, durante 5 minutos; a continuación, se deja sedimentar por gravedad la suspensión durante 60 minutos; tras este periodo de tiempo, se toman 100 mL de sobrenadante. Para este proceso, se puede utilizar un frasco de 1 litro que posee un diámetro interno de unos 90 mm. La conductividad del sobrenadante es de 1 $\mu\text{S}/\text{cm}$ aproximadamente y no se detectó otro material en éste que no fuera el material magnético. Las partículas fueron secadas a 60°C y almacenadas hasta su uso. Mediante el método mencionado previamente, se obtuvieron unas partículas de metal magnético con un tamaño medio de 420 ± 160 nm y ausencia de núcleos con un tamaño superior a 1 μm .

Las nanopartículas de la invención presentan un valor mínimo de susceptibilidad inicial (X_i) igual o superior a 0,1, preferentemente igual o superior a 0,5, más preferiblemente comprendida entre 1 y 30, todavía más preferiblemente comprendida entre 1 y 20, más preferiblemente entre 2 y 15. Asimismo, las nanopartículas de la invención presentan una imanación de saturación igual o superior a 10 kA/m, preferiblemente igual o superior a 50 kA/m, más preferiblemente comprendido entre 100 y 3.000 kA/m.

ES 2 324 003 B1

La determinación de dichos valores de susceptibilidad inicial y de imanación de saturación se puede realizar a partir de la curva de primera imanación y de los tramos lineales de la curva del ciclo de histéresis (campos bajos) del material, medidos ambos parámetros con un magnetómetro Manics DSM-8 (Francia) a temperatura ambiente ($25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$), tal como se ha mencionado previamente en relación con las características de los metales sensibles a campos magnéticos.

Método de producción de las nanopartículas

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la producción de las nanopartículas de la invención, en adelante método de la invención, que comprende:

- a) preparar una fase orgánica mediante disolución de etilcelulosa en un disolvente inmiscible en agua, adición de un disolvente seleccionado del grupo formado por alcanos $\text{C}_1\text{-C}_{20}$ lineales o ramificados hasta una concentración comprendida entre el 0,5% y el 5% en peso con respecto al peso total de la disolución, y calentamiento a una temperatura comprendida entre 50°C y 90°C ;
- b) preparar una fase acuosa que comprende una suspensión acuosa de partículas de un metal sensible a campos magnéticos, con un diámetro medio inferior a 0,95 micrometros, comprendiendo dicha suspensión acuosa, además, un ácido o una base inorgánica en una concentración comprendida entre 10^{-5} N y 10^{-1} N, y, al menos, un tensioactivo en una concentración comprendida entre 0,01% y 5% en peso con respecto al peso total de dicha suspensión, mediante la mezcla de los distintos componentes en las cantidades apropiadas;
- c) calentar dicha fase acuosa a una temperatura comprendida entre 50°C y 90°C ; y
- d) mezclar dicha fase orgánica y dicha fase acuosa, bajo agitación;

en donde la etapa b) puede realizarse antes o después de la etapa a), o de forma simultánea.

El método de la invención es reproducible, sencillo y económicamente asequible. Como puede apreciarse, dicho método consiste en un proceso de emulsión, con evaporación del disolvente, a partir de un polímero preformado, utilizando una fase acuosa donde se encuentran los núcleos magnéticos en suspensión, y una fase orgánica que comprende el látex de etilcelulosa. Dicho método posibilita que el látex de etilcelulosa recubra los núcleos de los metales magnéticos en las nanopartículas de la invención.

Aunque prácticamente cualquier disolvente, o mezcla de disolventes, inmiscible en agua puede ser utilizado, en una realización particular, el disolvente inmiscible en agua utilizado en la etapa a) es una mezcla de benceno y etanol, preferiblemente en una proporción benceno:etanol comprendida entre 10:1 y 3:1 en peso, más preferiblemente entre 8:1 y 4:1 en peso. Se deja reposar la disolución resultante, que comprende etilcelulosa y disolvente inmiscible en agua, durante un periodo de tiempo apropiado, típicamente comprendido entre 12 y 48 horas, generalmente durante unas 24 horas aproximadamente, a temperatura ambiente, antes de adicionarla el alcano $\text{C}_1\text{-C}_{20}$, lineal o ramificado.

A continuación, se añade a dicha disolución un disolvente orgánico, tal como un alcano $\text{C}_1\text{-C}_{20}$, lineal o ramificado, o una mezcla de dichos disolventes. Prácticamente cualquier alcano $\text{C}_1\text{-C}_{20}$, lineal o ramificado, puede utilizarse como disolvente en la etapa a); no obstante, en una realización particular, dicho disolvente orgánico se selecciona entre n-butano, i-butano, 2,2-dimetilbutano, 2,3-dimetilbutano, n-pentano, i-pentano, 2-metilpentano, 3-metilpentano, n-hexano, 2-metilhexano, 3-metilhexano, n-heptano, 2-metilheptano, n-octano, 2-metiloctano, n-nonano, 2-metilnonano, n-decano, n-undecano, n-duodcano, metilciclohexano y sus mezclas. Dicho disolvente orgánico se añade hasta una concentración comprendida entre 0,5% y 5% en peso con respecto al peso total de dicha disolución de etilcelulosa en el disolvente inmiscible en agua, preferentemente, hasta alcanzar una concentración comprendida entre 0,5% y 2%, más preferiblemente de 1% aproximadamente, en peso, respecto al peso total de dicha disolución de etilcelulosa en disolvente inmiscible en agua.

La concentración de látex de etilcelulosa generado en la etapa a), presente en dicha fase orgánica, puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, dicha fase orgánica comprende un látex de etilcelulosa de concentración comprendida entre 15% y 20% en peso respecto al peso total de dicha fase orgánica.

La etapa b) comprende la mezcla, en un medio acuoso, de partículas de un metal sensible a campos magnéticos, con un diámetro medio determinado, un ácido o una base inorgánica y, al menos, un tensioactivo, para obtener una fase acuosa que comprende una suspensión acuosa de partículas de un metal sensible a campos magnéticos, un ácido o una base inorgánica, y, al menos, un tensioactivo.

En concreto, para la realización de la etapa b), se utilizan partículas de metal sensible a campos magnéticos con un diámetro medio inferior a 0,95 micrometros (μm), preferentemente, inferior a $0,8 \mu\text{m}$, más preferentemente inferior a $0,7 \mu\text{m}$, aún más preferentemente con un diámetro medio comprendido entre $0,1 \mu\text{m}$ y $0,6 \mu\text{m}$, preferiblemente entre

ES 2 324 003 B1

0,2 μm y 0,55 μm . Ventajosamente, antes de preparar la suspensión acuosa de dichas partículas de metal sensible a campos magnéticos, dichas partículas se someten a un procedimiento seleccionado entre (i) filtración y agitación en una célula de filtración con una membrana de 1 μm ; (ii) ultracentrifugación con una velocidad mínima de centrifugación de 100 rpm; (iii) separación magnética con un imán permanente; y (iv) separación por gravedad, con el fin de seleccionar las partículas de metal sensible a campos magnéticos más apropiadas para la puesta en práctica del método de la invención. En una realización particular, las partículas de metal sensible a los campos magnéticos se someten a un procedimiento de separación por gravedad con un tiempo de sedimentación superior a 60 minutos y un volumen de sobrenadante retirado inferior al 10% del volumen total de la suspensión de partículas de metal sensible a los campos magnéticos.

Para la realización de la etapa b), las partículas de metal sensible a campos magnéticos se mezclan en un medio acuoso con un ácido o una base inorgánica y con, al menos, un tensioactivo.

Aunque prácticamente cualquier ácido o base inorgánica, en una concentración comprendida entre 10^{-5} N y 10^{-1} N, puede ser utilizado para la puesta en práctica de la etapa b) del método de la invención, en una realización particular, dicho ácido inorgánico es ácido nítrico (HNO_3); en otra realización particular, dicha base inorgánica es hidróxido sódico (NaOH). Una de las variables de la síntesis de las nanopartículas de la invención estudiadas ha sido el pH de la suspensión acuosa de metal sensible a campos magnéticos que constituye la fase acuosa. En una realización particular, dicha fase acuosa comprende un ácido inorgánico, preferentemente, HNO_3 , a una concentración comprendida entre 10^{-5} N y 10^{-1} N, preferentemente entre 10^{-4} N y 10^{-2} N, más preferentemente alrededor de 10^{-3} N.

Entre los tensioactivos que pueden utilizarse en la etapa b) se encuentran los tensioactivos habitualmente utilizados en el campo farmacéutico. Ejemplos ilustrativos de tales tensioactivos incluyen la familia de los dextranos (p.ej., dextrano-70); la familia de los polisorbatos o ésteres de polioxietilensorbitano, por ejemplo, los comercializados con la marca Tween (p.ej., Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 y Tween 85); la familia de los ésteres de sorbitano, por ejemplo, los comercializados con la marca Span (p.ej., Span 20, Span 60, Span 80 y Span 85); la familia de los polietilenglicoles (p.ej., PEG 300, PEG 400, PEG 2000, PEG 3350, PEG 4000, PEG 6000 y PEG 8000), el laurilsulfato sódico (LSNa) o el cetiltrimetil amonio. Dicha suspensión acuosa puede contener uno o varios tensioactivos diferentes. Dicho tensioactivo puede estar presente en dicha suspensión acuosa (fase acuosa) en una concentración comprendida entre 0,01% y 5% en peso con respecto al peso total de dicha suspensión acuosa, preferentemente, en una concentración comprendida entre 0,1% y 2%, más preferentemente, entre 0,4% y 1% en peso respecto al total de dicha suspensión acuosa.

Aunque no se desea estar vinculado por ninguna teoría, se cree, en base a los estudios realizados, que los tensioactivos no tienen una influencia directa sobre el tamaño de las nanopartículas obtenidas. Sin embargo, la proporción de los tensioactivos sí influye sobre la formación de residuos sólidos inservibles y sobre las características de la superficie de las partículas.

En una realización particular y preferida, la suspensión acuosa comprende como tensioactivo LSNa, PEG 4000 o mezclas de ambos, preferentemente, LSNa y PEG 4000 en una proporción LSNa:PEG 4000 comprendida entre 4:0 y 0:4 en peso, más preferiblemente en una proporción de aproximadamente 1:3.

La velocidad de agitación de la suspensión acuosa puede variar dentro de un amplio intervalo, típicamente entre 5.000 y 15.000, más preferiblemente entre 7.000 y 11.000 rpm, más preferiblemente alrededor de 8.000 rpm aproximadamente.

Una vez obtenida dicha fase acuosa, y antes de su mezcla con la fase orgánica, dicha fase acuosa se calienta (etapa c)) a una temperatura comprendida entre 50°C y 90°C, preferentemente, entre 60°C y 70°C, durante un periodo de tiempo comprendido entre 5 y 100 minutos.

Una vez formadas dichas fases orgánica y acuosa, y calentadas a la temperatura adecuada, se procede a su mezcla, bajo agitación, para obtener las nanopartículas de la invención (etapa d)). Para ello, la mezcla formada por dicha fase orgánica y por dicha fase acuosa se agita por métodos convencionales, por ejemplo, mediante agitación mecánica, con una velocidad de agitación que puede variar dentro de un amplio intervalo, típicamente entre 8.000 y 20.500 rpm. Dicha mezcla se realiza preferiblemente incorporando la fase orgánica sobre la fase acuosa.

Adicionalmente, si se desea, el método de la invención comprende una etapa adicional opcional (etapa e)) consistente en eliminar el disolvente utilizado en la etapa a) con el fin de eliminar la toxicidad asociada a dicho disolvente orgánico y, además, incrementar el contenido en sólidos del sistema. Prácticamente cualquier método o técnica que permita retirar dicho disolvente puede ser utilizado; no obstante, en una realización particular, dicha etapa e) comprende evaporar el disolvente orgánico añadido en la etapa a) bajo agitación mecánica, preferiblemente a una velocidad de agitación comprendida entre 1.000 y 3.000 rpm, más preferiblemente a aproximadamente 2.000 rpm. Dicha agitación puede realizarse, en una realización particular, durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 48 horas, preferentemente durante 24 horas aproximadamente, dependiendo del disolvente o mezclas de disolventes utilizados en la etapa a).

Adicionalmente, si se desea, el método de la invención comprende una etapa adicional opcional e') por la cual la mezcla obtenida en las etapas d) o e) se somete a un campo magnético. Esta etapa adicional opcional e') tiene como

objetivo eliminar los residuos de la síntesis de las nanopartículas de la invención y limpiar la mezcla resultante. Esta etapa e') comprende la repetición sucesiva de las siguientes operaciones: (i) re-dispersión en un baño de ultrasonidos durante el periodo de tiempo necesario para alcanzar una re-suspensión uniforme de la materia sólida, típicamente entre 2 y 10 minutos, (ii) sedimentación sobre imán permanente, preferiblemente de entre 0,35 y 0,45 T, por ejemplo de 0,42 T, (iii) extracción del sobrenadante, y (iv) sustitución con agua. Este proceso de limpieza se controla midiendo la conductividad del sobrenadante y se considera finalizado cuando la conductividad eléctrica es inferior a 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$, y el sobrenadante es transparente.

10 Usos y composiciones

Las nanopartículas de la invención presentan numerosas aplicaciones potenciales, tanto aplicaciones relacionadas con terapia o diagnóstico, como aplicaciones no terapéuticas.

Entre las aplicaciones no terapéuticas ni de diagnóstico se incluye el empleo de las nanopartículas de la invención en el tratamiento de aguas residuales, en la fabricación de biosensores, en la inmovilización de enzimas, en la separación magnética por afinidad de biomoléculas, en la selección de un tipo de células de entre una población celular, en xerografía, en electrografía, etc. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de las nanopartículas de la invención en el tratamiento de aguas residuales, en la fabricación de biosensores, en la inmovilización de enzimas, en la separación magnética por afinidad de biomoléculas, en la selección de un tipo de células de entre una población celular, en xerografía o en electrografía.

Entre las aplicaciones relacionadas con el diagnóstico se incluye el empleo de las nanopartículas de la invención como agentes de contraste en resonancia magnética (RM) debido a sus propiedades magnéticas, escasa toxicidad y tamaño adecuado que posibilita su administración, absorción y excreción sin riesgo para el metabolismo humano. Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con el empleo de las nanopartículas de la invención como agentes de contraste en resonancia magnética, mientras que, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de las nanopartículas de la invención en la elaboración de un agente de contraste por resonancia magnética. En una realización particular, las nanopartículas de la invención actúan como agentes de contraste por RM *per se* debido al propio efecto que genera el metal sensible a campos magnéticos que constituye su núcleo (actúa como contraste "negativo", al reducir la señal de RM "T2-weighted"); a modo ilustrativo, dichas nanopartículas de la invención son especialmente útiles cuando se quiere resaltar las diferencias de contraste del hígado o bazo, debido a que en ausencia de un campo magnético externo aplicado, tienen una especial tendencia a acumularse en estos órganos del sistema retículoendotelial - (Ito A., Shinkai M., Honda H., Kobayashi T., J. Biosci. Bioeng., 100(1), 1, 2005). Evidentemente, la utilización de un campo magnético externo aplicado, permitiría focalizar la localización de las nanopartículas de la invención, y, por lo tanto, su acción como agentes de contraste por RM. No obstante, en otra realización particular, las nanopartículas de la invención pueden incorporar algún compuesto/ligando como agente de contraste por RM, por ejemplo, un complejo de gadolinio (Gd), etc.

Entre las aplicaciones relacionadas con la terapia se incluye el empleo de las nanopartículas de la invención como sistemas transportadores de fármacos. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un sistema transportador de fármacos, en adelante sistema transportador de fármacos de la invención, que comprende, al menos, una nanopartícula de la invención y, al menos, un fármaco. Dicho fármaco puede estar "atrapado" o "encapsulado" en el interior de las nanopartículas de la invención y/o "adsorbido" sobre la superficie exterior de las nanopartículas de la invención.

Tal como aquí se utiliza, el término "fármaco" se refiere a cualquier sustancia que se administra a un sujeto, preferentemente un ser humano, con fines profilácticos o terapéuticos; es decir, cualquier sustancia que puede ser utilizada en el tratamiento, cura o prevención de una enfermedad o para mejorar el bienestar físico y mental de humanos y animales. Las nanopartículas de la invención pueden incorporar uno o más fármacos diferentes.

La naturaleza química del fármaco puede ser muy variada, incluyendo desde moléculas pequeñas hasta compuestos macromoleculares (p.ej., péptidos, polinucleótidos, etc.). Numerosos fármacos presentan estas características, y, por tanto, pueden ser utilizados en la puesta en práctica de la presente invención.

Prácticamente cualquier fármaco de cualquier grupo terapéutico puede ser utilizado en el sistema transportador de fármacos de la invención. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de fármacos que pueden estar presentes en el sistema transportador de fármacos proporcionado por esta invención incluyen agentes antibióticos, antifúngicos, antiinflamatorios, antiparkinsonianos, antitumorales, antivirales, inmunosupresores, neuroprotectores, fármacos para emboloterapia, fármacos para el catabolismo de tumores mediante hipertermia, etc.

En una realización particular, dicho fármaco presente en el sistema transportador de fármacos de la invención es un agente antitumoral (antineoplásico o anticancerígeno), por ejemplo, doxorubicina, mitomicina C, 5-fluorouracilo, ftorafur, metotrexato, citarabina, 6-mercaptopurina, daunorubicina, bleomicina, mecloretamina, ciclofosfamida, estramustina, melfalán, carmustina, lomustina, vincristina, vinblastina, vindesina, vinorebina, paclitaxel, taxol, cisplatino, carboplatino, etopósido, tenipósido, procarbazona, etc., cuya distribución sistémica es la responsable de las graves reacciones adversas asociadas a su utilización. La administración de dichos fármacos anticancerígenos con la ayuda de este tipo de sistemas transportadores de fármacos basado en unas nanopartículas que comprenden un núcleo

de una partícula de un metal sensible a campos magnéticos y la aplicación de un campo magnético externo, permite localizar todo el fármaco en el lugar de acción deseado, minimizando la distribución sistémica, y, por tanto, las graves reacciones adversas derivadas de ésta. Además, el hecho de que todo el fármaco pueda estar localizado en el lugar de acción, posibilita la administración al sujeto (paciente) de una menor dosis de dicho fármaco para obtener el efecto terapéutico deseado, con todo lo que ello implica desde un punto de vista farmacoeconómico y de seguridad.

En otra realización particular, dicho fármaco presente en el sistema transportador de fármacos de la invención es un agente antiinflamatorio y/o un fármaco utilizado en el tratamiento de la artrosis o artritis.

Asimismo, en otra realización particular, dicho fármaco presente en el sistema transportador de fármacos de la invención es un agente antiparkinsoniano, p.ej., levodopa, ya que dicho sistema transportador facilita el paso del agente antiparkinsoniano (p.ej., levodopa) a través de la barrera hematoencefálica, para poder llegar a su lugar de acción en el cerebro y evitar su degradación al distribuirse en el resto del organismo.

En otra realización particular, dicho fármaco presente en el sistema transportador de fármacos de la invención es un fármaco útil para emboloterapia o para el catabolismo de tumores mediante hipertermia.

En una realización particular, el sistema transportador de fármacos de la invención comprende un único fármaco. En otra realización particular, el sistema transportador de fármacos de la invención comprende dos o más fármacos diferentes constituyendo de este modo un sistema transportador de fármacos bivalente o multivalente; en este caso, las nanopartículas de la invención pueden contener distintos fármacos pertenecientes a un mismo grupo terapéutico o, alternativamente, distintos fármacos pertenecientes a distintos grupos terapéuticos, por ejemplo, agentes antiinflamatorios, antiparkinsonianos, antitumorales, etc.

El sistema transportador de fármacos de la invención puede ser obtenido por métodos convencionales, por ejemplo, mediante la adición del fármaco en el momento en que se forman las nanopartículas, quedando dicho fármaco atrapado en dichas nanopartículas, o, alternativamente, mediante la adsorción del fármaco por las nanopartículas de la invención tras la formación e incubación de las nanopartículas de la invención con una disolución de dicho fármaco.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición, en adelante composición de la invención, que comprende al menos una nanopartícula de la invención y un vehículo. El experto en la materia conoce los vehículos y, opcionalmente, componentes auxiliares adicionales necesarios para formular la composición de la invención en base a la función a la que está destinada.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica, en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende, al menos, un sistema transportador de fármacos de la invención junto con, al menos, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El término “farmacéuticamente aceptable” se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y que normalmente no producen una reacción no deseada alérgica o similar, tal como molestias gástricas, mareos y similares, cuando se administra a un ser humano. Preferiblemente, tal como aquí se utiliza, el término “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o de un estado o enumerado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales y más particularmente en seres humanos.

La composición farmacéutica de la invención puede ser administrada por cualquier vía de administración conocida, por ejemplo, por vía oral, parenteral (p.ej., subcutánea, intramuscular, intravenosa, etc.), rectal, bucal, sublingual, nasal, pulmonar, percutánea, oftálmica, ática, uretral o vaginal.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de composiciones farmacéuticas de la invención incluyen:

- composiciones sólidas, p.ej., cápsulas magnéticas de las nanopartículas de la invención cargadas con el fármaco o fármacos (es decir, el sistema transportador de fármacos de la invención), para administración oral; la elaboración de cápsulas magnéticas para la administración oral de fármacos ya ha sido propuesta con otro tipo de materiales (aleaciones de hierro-cobalto-cromo-molibdeno) (Richert H., Surzhenko O., Wangemann S., Heinrich J., Görnert P., *J. Magn. Magn. Mater.*, 293, 497, 2005); o
- composiciones líquidas, p.ej., suspensiones o dispersiones de las nanopartículas de la invención cargadas con el fármaco o fármacos (es decir, el sistema transportador de fármacos de la invención), para su administración por cualquier vía de administración conocida, por ejemplo, para su administración por vía oral, parenteral (p.ej., subcutánea, intramuscular, intravenosa, etc.), rectal, bucal, sublingual, nasal, pulmonar, percutánea, oftálmica, ótica, uretral o vaginal. En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención se administra por vía parenteral.

ES 2 324 003 B1

Para ello, la composición farmacéutica de la invención incluirá los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables, adecuados para la forma de administración elegida. A modo ilustrativo, las composiciones farmacéuticas pueden ser adaptadas para su administración parenteral, en forma de, por ejemplo, soluciones, suspensiones o productos liofilizados, estériles, en la forma de dosificación apropiada; en este caso, dichas composiciones farmacéuticas incluirán los vehículos o excipientes adecuados, tales como agua para inyectables, tampones, tensioactivos, conservantes, etc. En una realización particular, dichos vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen líquidos estériles, tales como agua o aceites, incluyendo los aceites de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, p.ej., aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Preferentemente, se emplean agua o disoluciones acuosas salinas y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos, particularmente para soluciones inyectables. Ejemplos ilustrativos de vehículos farmacéuticos adecuados para las distintas formas farmacéuticas de administración se describen en los tratados habituales de Farmacia Galénica, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin.

En cualquier caso, los excipientes se elegirán en función de la forma farmacéutica de administración seleccionada. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos, vías de administración y procedimientos para su producción puede encontrarse en "Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems (8ª edición)", L. V. Allen, N. G. Popovich, H. C. Ansel, Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, 2004; "Farmacia. La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas", M. E. Aulton, Elsevier España S.A., Barcelona, 2003; "Tecnología Farmacéutica: Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas (Vol. I)", J. L. Vila Jato, Síntesis, Madrid, 1997; "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 10 Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

La proporción de fármaco incorporado en la nanopartícula de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo; a modo ilustrativo, la proporción de fármaco incorporado en la nanopartícula de la invención puede ser de hasta un ... % en peso respecto al peso total de la nanopartícula de la invención, dependiendo, entre otros factores, del fármaco a incorporar.

La composición farmacéutica de la invención puede obtenerse por métodos convencionales, mezclando el sistema transportador de fármacos de la invención con el vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de las nanopartículas de la invención en la elaboración de un sistema transportador de fármacos.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados en sentido limitativo, sino ilustrativo, de la misma.

Ejemplo 1

Producción y caracterización de nanopartículas que comprenden un núcleo de hierro carbonilo y una capa de recubrimiento que comprende un látex de etilcelulosa

Producción de las nanopartículas

Para la producción de nanopartículas constituidas por un núcleo de hierro carbonilo y una capa de recubrimiento que comprende un látex de etilcelulosa se siguieron los siguientes pasos:

1. Preparación de la fase polimérica: se preparó una disolución de 4,68 g de etilcelulosa (CAS Number: 9004-57-3) en una mezcla de disolventes orgánicos (benceno y etanol) en una proporción benceno:etanol de 5,6:1 en peso, es decir, 22,57 g de benceno y 4 g de etanol; y se dejó en reposo durante 24 horas, a temperatura ambiente.
2. Preparación de la fase acuosa: se prepararon 94 g de una suspensión acuosa de partículas de hierro carbonilo al 0,266% (p/v) (con un diámetro medio de 420 ± 160 nm); esta suspensión contenía, además, HNO_3 10^{-3} N, 0,125% (p/v) de laurilsulfato sódico y 0,375% (p/v) de polietilenglicol 4000.
3. Transcurridas 24 horas, se adicionaron 0,31 g de n-decano a la fase polimérica.
4. A continuación, se calentó la fase acuosa durante 30 minutos a 67°C , en un baño termostático.
5. Seguidamente, se procedió a mezclar ambas fases (polimérica y acuosa) bajo agitación mecánica a una velocidad de agitación de 8.000 rpm, incorporando la fase acuosa sobre la fase polimérica, previamente calentada a la misma temperatura que la fase acuosa (67°C), para evitar cambios bruscos de temperatura durante la interposición; la agitación se mantuvo durante 5 minutos.
6. Finalmente, se dejó evaporar el disolvente orgánico bajo agitación mecánica a 2.000 rpm durante 24 horas.

7. Con el objetivo de eliminar los residuos de la síntesis, se realizó una limpieza de la suspensión de látex magnético utilizando un imán permanente. La técnica utilizada consistió en la repetición sucesiva de las siguientes operaciones: re-dispersión en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos, sedimentación sobre imán permanente de 0,42 T, extracción del sobrenadante y sustitución con agua ultrapura. Este proceso de limpieza se controló midiendo la conductividad del sobrenadante y se consideró finalizado cuando la conductividad eléctrica era inferior a $10 \mu\text{S}/\text{cm}$, y el sobrenadante era transparente.

Todos los reactivos químicos utilizados en esta síntesis tenían calidad analítica y fueron adquiridos a Panreac (España), con la excepción del polímero etilcelulosa (CAS Number: 9004-57-3; proporcionado por ICN Biomedical Inc., EE.UU.) y del hierro carbonilo (BASF, Alemania). El agua utilizada es desionizada y filtrada con un dispositivo Milli-Q Academic System (Millipore, Francia).

15 *Caracterización de las nanopartículas*

La caracterización física (estructura, composición química, superficie específica, y propiedades eléctricas y termodinámicas superficiales) de las nanopartículas previamente obtenidas permite apreciar cómo presentan un comportamiento similar al de las partículas puras de látex de etilcelulosa. En concreto, las determinaciones del potencial zeta en función de la fuerza iónica y del pH, muestran una similitud entre las nanopartículas de la invención y las partículas puras de látex de etilcelulosa. Esto sugiere que el recubrimiento que comprende el látex de etilcelulosa recubre eficazmente al hierro carbonilo, obteniéndose unas nanopartículas que, desde el punto de vista de su carga eléctrica superficial, son casi indistinguibles del látex de etilcelulosa. En este sentido, el estudio de la termodinámica superficial demuestra que la naturaleza hidrófila del hierro carbonilo se modifica y las partículas adquieren un carácter hidrófobo, como el polímero, cuando son recubiertas por el látex de etilcelulosa. Este análisis termodinámico coincide con el eléctrico al indicar que el recubrimiento es completo, ya que las componentes de la energía libre superficial coinciden casi completamente con las correspondientes al pseudolatex de etilcelulosa. Las propiedades magnéticas del hierro carbonilo y de las nanopartículas obtenidas también han sido analizadas, apreciándose las similitudes entre ambas, con la única diferencia de que el recubrimiento de látex de etilcelulosa reduce la magnetización de la muestra. Por tanto, esas nanopartículas presentan una superficie comparable a la del látex de etilcelulosa puro y la capacidad de ser magnetizables. De esta manera, se dota al látex de etilcelulosa de la capacidad de responder a campos magnéticos aplicados.

La Figura 1a recoge las fotografías de unas nanopartículas de la invención obtenidas por microscopía electrónica de alta resolución de campo oscuro (Dark-Field HRTEM, realizadas con el microscopio electrónico de transmisión de alta resolución STEM PHILIPS CM20, Holanda) de las nanopartículas obtenidas. Como puede apreciarse, el núcleo de hierro carbonilo está recubierto por una capa de aproximadamente 30 nm de grosor. Las partículas recubiertas constituyen un sistema moderadamente polidisperso ($550 \pm 150 \text{ nm}$). El anillo blanquecino corresponde al látex de etilcelulosa ya que, como puede apreciarse en la microfotografía electrónica de barrido (SEM, realizada con el microscopio electrónico de barrido Zeiss DSM 950, Alemania) de la Figura 1b, la morfología y la superficie de las nanopartículas de la invención es idéntica a la del polímero puro (Figura 1c). Esto demuestra que el recubrimiento de los núcleos magnéticos por el polímero (látex de etilcelulosa) es muy eficaz.

Con respecto a la superficie específica de los materiales, determinada mediante el aparato Quantasorb Jr. (Quantachrome, USA), su reducción en el hierro carbonilo ($1,72 \pm 0,23 \text{ m}^2/\text{g}$), al ser recubierto por el látex de etilcelulosa, constituye una nueva prueba de la eficacia del recubrimiento. De hecho, la similitud entre la superficie específica de las partículas de látex de etilcelulosa ($0,79 \pm 0,17 \text{ m}^2/\text{g}$) y de las nanopartículas obtenidas ($0,86 \pm 0,08 \text{ m}^2/\text{g}$) se explica por el revestimiento de los núcleos de hierro carbonilo por el látex de etilcelulosa, ya que las partículas tienen tamaños similares.

En cuanto a los espectros de infrarrojos (Fig. 2), obtenidos con un espectrómetro de infrarrojos Nicolet 20 SXB (USA), se aprecia cómo todas las bandas de la etilcelulosa están presentes en el espectro de las nanopartículas de la invención, lo que constituye una clara indicación de que el recubrimiento observado en las Figuras 1a y 1b corresponde al látex de etilcelulosa. La reducción en la intensidad de banda del espectro de las nanopartículas de la invención es consecuencia de la menor cantidad relativa de látex de etilcelulosa en este tipo de partículas (Silverstein R.M., Webster F.X., Spectrometric Identification of Organic Compounds, 6th Ed., John Wiley & Sons, New York, 1998).

Para el análisis de las propiedades eléctricas superficiales se utilizó la teoría de O'Brien y White [O'Brien R.W., White L.R., J. Chem. Soc. Faraday Trans., 2(274), 1607, 1978] para la conversión de los valores de movilidad electroforética (obtenidos con el aparato Malvern Zetasizer 2000, Inglaterra) en valores de potencial zeta (ζ). El estudio electrocinético se centró en primer lugar en el análisis del efecto del pH sobre el potencial zeta en presencia de una concentración 10^{-3} M de NaNO_3 (Figura 3a). Esta técnica electrocinética es una herramienta muy útil para realizar una comprobación cualitativa de la eficacia del recubrimiento, debido a las grandes diferencias entre los valores de potencial zeta de los núcleos magnéticos y de las partículas poliméricas. Concretamente, la Figura 3a muestra claramente que la relación ζ -pH en las nanopartículas obtenidas está dominada en gran medida por el recubrimiento de látex de etilcelulosa. Esto indica que el recubrimiento polimérico de las partículas de hierro carbonilo es bastante eficaz, por lo que las nanopartículas obtenidas, desde un punto de vista electrocinético, son cualitativamente similares a las partículas de látex de etilcelulosa. También determinamos el potencial ζ de los tres tipos de partículas en función de

las concentraciones de NaNO_3 a un pH fijo (pH = 5,5 fijo), con el objetivo de confirmar estos resultados (Figura 3b). Como puede observarse, el efecto de la concentración de NaNO_3 es diferente en cada caso no sólo con respecto a los valores medios de ζ , sino también al tener en cuenta su relación con la concentración de electrolito. Nuevamente, se aprecia cómo los valores de potencial ζ en las nanopartículas de la invención están dominados en gran medida por el recubrimiento de látex de etilcelulosa.

La caracterización termodinámica superficial permite analizar la naturaleza del recubrimiento de látex de etilcelulosa, basándose en la determinación de ángulos de contacto de líquidos seleccionados sobre comprimidos elaborados con las partículas, y medidos utilizando un goniómetro Ramé-Hart 100-00 (USA). Los datos de los ángulos de contacto formados por los tres líquidos (agua, formamida y α -bromonaftaleno), a $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$, sugieren diferencias significativas entre las partículas de hierro carbonilo, las de látex de etilcelulosa y las nanopartículas de la invención (ver Tabla 1).

TABLA 1

Ángulos de contacto (grados) de los líquidos utilizados en las determinaciones en comprimidos de hierro carbonilo, látex de etilcelulosa y nanopartículas de la invención

SÓLIDO	LÍQUIDO		
	Agua	Formamida	α -bromonaftaleno
Hierro carbonilo	$27,0 \pm 1,1$	$21,5 \pm 0,7$	$16,7 \pm 0,5$
Látex de etilcelulosa	$65,3 \pm 0,7$	$62,9 \pm 0,8$	$30,1 \pm 3,1$
Nanopartículas obtenidas	$64,1 \pm 1,3$	$60,3 \pm 1,5$	$29,4 \pm 1,2$

Estos cambios determinan las características hidrófobas/hidrófilas de los materiales. De esta manera, puede utilizarse la evaluación de la energía libre de interacción ΔG_{SLS} (sin considerar el componente electrostático), entre las fases sólidas inmersas en el líquido, para determinar cuándo un material es considerado hidrófobo o hidrófilo (van Oss C.J., *Interfacial Forces in Aqueous Media*, Marcel Dekker Inc., New York, 1994). Si el valor de ΔG_{SLS} es negativo, las interacciones interfaciales favorecerán la atracción entre las partículas, siendo consideradas hidrófobas; por el contrario, el carácter hidrófilo corresponderá a valores positivos de $\Delta G_{\text{SLS}}^{\text{TOT}}$. Como puede apreciarse en la Fig. 4, la naturaleza hidrófila del hierro carbonilo se transforma en hidrófoba, al igual que el látex de etilcelulosa, cuando es recubierto por éste.

Otro aspecto de gran importancia es el análisis de las propiedades magnéticas de las nanopartículas obtenidas tras el recubrimiento del metal sensible a los campos magnéticos con el polímero etilcelulosa. El estudio del ciclo de histéresis de los núcleos de hierro carbonilo y de las nanopartículas de la invención (realizado con un magnetómetro Manics DSM-8, Francia) reveló que ambos materiales poseían un carácter magnético blando (Figura 5), ya que efectivamente, las ramas ascendentes y descendentes de este ciclo de histéresis son difícilmente distinguibles. Como se ha observado previamente [Ren J., Hong H.-Y., Ren T.-B., Teng X.-R., *Mater. Lett.*, 59, 2655, 2005; Arias J.L., Gallardo V., Linares-Molinero F., Delgado A.V., *J. Colloid Interf. Sci.*, 299, 599, 2006; Arias J.L., Gallardo V., Gómez-Lopera S.A., Delgado A.V., *J. Biomed. Nanotech.*, 1(2), 214, 2005], el carácter magnético de las nanopartículas obtenidas era similar al de los núcleos sensibles a los campos magnéticos, a excepción de que el recubrimiento de látex de etilcelulosa reduce la magnetización de estas partículas. A partir de los tramos lineales de las curvas (campos bajos) en la Figura 5, se puede estimar la susceptibilidad inicial: $\chi_i = 22,1 \pm 0,2$ para el hierro carbonilo y $\chi_i = 9,1 \pm 0,1$ para las nanopartículas obtenidas. También es significativa la reducción de la magnetización de saturación que provoca el recubrimiento de etilcelulosa: 1.698 ± 5 kA/m para el hierro carbonilo (similar al obtenido en partículas de $6 \mu\text{m}$ de tamaño (Phulé P.P., Mihalcin M.T., Gene S., *J. Mater. Res.*, 14, 3037, 1999) y $703,3 \pm 0,8$ kA/m para las nanopartículas de la invención.

Finalmente, se evaluó la respuesta a campos magnéticos externos de las nanopartículas obtenidas mediante un análisis al microscopio óptico de una suspensión acuosa expuesta a un campo magnético de 0,2 T. Como puede verse en la Figura 6, la distribución inicialmente homogénea de las partículas se modificó totalmente, observándose la formación de agregados en cadena paralelos a las líneas de campo. Esto es debido a que la interacción magnética representa una contribución predominante sobre las interacciones coloidales entre las nanopartículas de la invención (electrostáticas, de van der Waals y de hidratación o ácido-base), a pesar de la presencia del recubrimiento de látex de etilcelulosa.

ES 2 324 003 B1

Ejemplos 2-14

Producción de nanopartículas adicionales que comprenden un núcleo de hierro carbonilo y una capa de recubrimiento que comprende un látex de etilcelulosa

5 Siguiendo el procedimiento sintético descrito en el Ejemplo 1 pero efectuando las variaciones mencionadas en la Tabla 2 se han obtenido distintas nanopartículas constituidas por un núcleo de hierro carbonilo y una capa de recubrimiento que comprende un látex de etilcelulosa. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 2.

TABLA 2

Ejemplos adicionales de producción de nanopartículas

Ejemplo nº	Variación en la síntesis	Tamaño de partícula (nm)	Grosor del recubrimiento
2	Hierro carbonilo: 0,133 % (p/v)	570 ± 120	40 nm
3	Hierro carbonilo: 0,399 % (p/v)	520 ± 130	15 nm
4	Laurilsulfato sódico: 0 % (p/v) Polietilenglicol 4000: 0,5 % (p/v)	520 ± 170	10 nm
5	Laurilsulfato sódico: 0,25 % (p/v) Polietilenglicol 4000: 0,25 % (p/v)	560 ± 160	15 nm
6	Laurilsulfato sódico: 0,375 % (p/v) Polietilenglicol 4000: 0,125 % (p/v)	570 ± 150	15 nm
7	Laurilsulfato sódico: 0,5 % (p/v) Polietilenglicol 4000: 0 % (p/v)	520 ± 180	10 nm
8	HNO ₃ 10 ⁻¹ N	560 ± 300	30 nm
9	HNO ₃ 10 ⁻² N	540 ± 270	30 nm
10	HNO ₃ 10 ⁻⁴ N	520 ± 130	15 nm
11	HNO ₃ 10 ⁻⁵ N	530 ± 140	10 nm
12	Velocidad de agitación en el mezclado de las fases: 12.000 rpm	540 ± 130	15 nm
13	Velocidad de agitación en el mezclado de las fases: 18.000 rpm	520 ± 120	10 nm
14	Velocidad de agitación en el mezclado de las fases: 20.500 rpm	510 ± 130	10 nm

45 Ejemplo 15

Incorporación de fármacos por nanopartículas que comprenden un núcleo de hierro carbonilo y una capa de recubrimiento que comprende un látex de etilcelulosa

50 Como ejemplo ilustrativo de la capacidad de incorporación de fármacos por las nanopartículas de la invención, se aportan los resultados preliminares de la incorporación en superficie (adsorción) y en el interior (absorción) del fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) diclofenaco sódico.

La vehiculización de un fármaco por las nanopartículas de la invención puede realizarse mediante dos métodos:

- 55 - Método (A): comprende la adsorción del fármaco sobre la superficie de las nanopartículas tras la síntesis e incubación de las nanopartículas de la invención en una disolución acuosa de fármaco; o
- 60 - Método (B): comprende la adición del fármaco en el momento en el que se forman las nanopartículas (es decir, el fármaco forma parte de la fase acuosa que comprende una suspensión acuosa de partículas de un metal sensible a campos magnéticos), con lo que el fármaco queda atrapado principalmente en el interior de dichas nanopartículas (absorción).

65 El estudio de la vehiculización superficial del AINE diclofenaco sódico por las nanopartículas de la invención se ha centrado en la evaluación del grado de unión a la superficie de éstas, mediante determinaciones espectrofotométricas (Dynko, Spectrometer 8500 UV-Vis, Dinamarca). Por tanto, para estimar la *adsorción* de este fármaco, se determinó la absorbancia óptica de los sobrenadantes obtenidos tras poner en contacto las nanopartículas de la invención (obtenidas según el Ejemplo 1) con soluciones de concentraciones prefijadas del fármaco, durante 24 horas, a 25,0 ± 0,5°C y bajo

ES 2 324 003 B1

agitación mecánica (50 rpm). Para ello, se prepararon una serie de disoluciones de 5 mL de volumen con diferente concentración molar de diclofenaco sódico (10^{-4} , 5×10^{-4} , 10^{-3} , 5×10^{-3} y 10^{-2} M). Una vez retirada una muestra del medio para la posterior comparación, se procedió a añadir las nanopartículas de la invención en cantidad suficiente como para tener una concentración final del 1% (p/v). Tras 24 horas de contacto se procedió a la separación de los sobrenadantes mediante doble centrifugación a 13.500 rpm durante 20 minutos, para la determinación del espectro de absorción de éstos. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Los resultados obtenidos, muestran un efecto positivo de la concentración de fármaco en el grado de adsorción de éste por las partículas de la invención. La Figura 7 muestra la cantidad de diclofenaco sódico adsorbida por las nanopartículas de la invención, en función de la concentración de fármaco en el equilibrio. Como puede apreciarse, la adsorción de este AINE (diclofenaco sódico) por las nanopartículas de la invención aumenta con la cantidad de fármaco en solución, sugiriéndose una saturación de la adsorción para una concentración superior a 10^{-2} M. La cantidad máxima vehiculizada por las nanopartículas de la invención, en las condiciones estudiadas, fue de $390 \pm 7 \mu\text{mol}/\text{m}^2$.

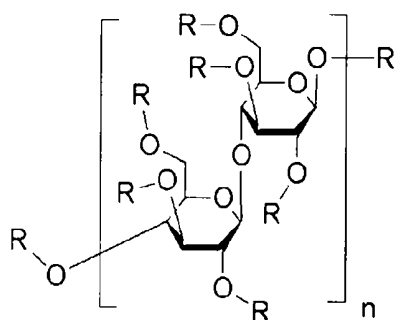
Con respecto al estudio de la *absorción* de fármaco, se analizó la influencia de la concentración de fármaco utilizada en su captación en el interior de las nanopartículas de la invención. Este análisis se realizó siguiendo el procedimiento de determinación espectrofotométrico ya descrito en el estudio de adsorción. Para la obtención de las nanopartículas de la invención conteniendo diclofenaco sódico atrapado mayoritariamente (absorbido) en el interior de dichas nanopartículas se siguió el procedimiento sintético descrito en el Ejemplo 1 pero introduciendo como única variable en la metodología de síntesis de tales nanopartículas la concentración de diclofenaco sódico que forma parte de la fase acuosa (que comprende una suspensión acuosa de partículas de un metal sensible a campos magnéticos). Las concentraciones molares utilizadas fueron: 10^{-4} , 5×10^{-4} , 10^{-3} , 5×10^{-3} y 10^{-2} M. Los experimentos se repitieron tres veces con cada una de las concentraciones molares de diclofenaco sódico.

La Figura 8 muestra la cantidad de diclofenaco sódico absorbido por las nanopartículas de la invención en función de la concentración de este fármaco en el equilibrio. Como puede apreciarse, la absorción aumenta con la concentración de fármaco presente en el medio de polimerización, sugiriéndose una tendencia a la saturación para concentraciones superiores a las ensayadas. De esta manera, los valores de densidad de absorción de diclofenaco sódico obtenidos, pasan de $235 \pm 5 \mu\text{mol}/\text{g}$ para la concentración inicial menor (10^{-4} M), a $780 \pm 15 \mu\text{mol}/\text{g}$ cuando la concentración inicial utilizada es 10^{-2} M.

REIVINDICACIONES

1. Una nanopartícula con un diámetro medio inferior a 1 micrometro que comprende un recubrimiento y un núcleo magnético, en la que dicho recubrimiento comprende un látex de etilcelulosa y dicho núcleo magnético comprende, al menos, una partícula de un metal sensible a campos magnéticos con un diámetro inferior a 0,95 micrometros.

2. Nanopartícula según la reivindicación 1, en la que dicho látex de etilcelulosa es un polímero de celulosa de fórmula (I)



(I)

en donde cada grupo R se selecciona independientemente entre hidrógeno y etilo, estando el grado de etoxilación comprendido entre el 10% y el 90%, preferentemente entre el 30% y el 70%, más preferentemente entre el 40% y el 60%; y "n" está comprendido entre 20 y 50.

3. Nanopartícula según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicho metal sensible a campos magnéticos se selecciona entre el grupo que consiste en hierro carbonilo, magnetita, maghemita, ferritas de níquel, ferritas de cobalto, ferritas de cadmio, ferritas de hierro, ferritas de níquel-zinc-cobre, ferritas de bario, ferritas de estroncio, ferritas de cobalto-níquel, y mezclas de los mismos.

4. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el diámetro medio de las partículas de metal sensible a los campos magnéticos es inferior a 0,8 micrometros, preferentemente inferior a 0,7 micrometros, más preferentemente comprendido entre 0,1 y 0,6 micrometros, aún más preferentemente entre 0,2 y 0,55 micrometros.

5. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, cuyo diámetro medio está comprendido entre 200 y 950 nanometros, preferentemente entre 250 y 800 nanometros, más preferentemente entre 275 y 700 nanometros, aún más preferentemente entre 300 y 600 nanometros

6. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la proporción en peso (látex de etilcelulosa):(metal sensible a campos magnéticos) está comprendida entre 6:1 y 1:6, preferentemente entre 4:1 y 1:4, más preferentemente 4:2 aproximadamente.

7. Un método para la producción de nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende:

- preparar una fase orgánica mediante disolución de etilcelulosa en un disolvente inmisible en agua, reposo de la disolución resultante, adición de un disolvente seleccionado del grupo formado por alcanos C_1 - C_{20} lineales o ramificados hasta una concentración comprendida entre el 0,5% y el 5% en peso con respecto al peso total de la disolución y calentamiento a una temperatura comprendida entre 50°C y 90°C;
- preparar una fase acuosa que comprende una suspensión acuosa de partículas de un metal sensible a campos magnéticos, con un diámetro medio inferior a 0,95 micrometros, comprendiendo dicha suspensión acuosa, además, un ácido o una base inorgánica en una concentración comprendida entre 10^{-5} N y 10^{-1} N, y, al menos, un tensioactivo en una concentración comprendida entre 0,01% y 5% en peso con respecto al peso total de dicha suspensión, mediante la mezcla de los distintos componentes en las cantidades apropiadas;
- calentar dicha fase acuosa a una temperatura comprendida entre 50°C y 90°C; y
- mezclar dicha fase orgánica y dicha fase acuosa, bajo agitación;

en donde la etapa b) puede realizarse antes o después de la etapa a), o de forma simultánea.

ES 2 324 003 B1

8. Método según la reivindicación 7, en el que el disolvente inmiscible en agua utilizado en la etapa a) es una mezcla de benceno y etanol.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, en el que dicho alcano C₁-C₂₀ lineal o ramificado se selecciona del grupo formado por n-butano, i-butano, 2,2-dimetilbutano, 2,3-dimetilbutano, n-pentano, i-pentano, 2-metilpentano, 3-metilpentano, n-hexano, 2-metilhexano, 3-metilhexano, n-heptano, 2-metilheptano, n-octano, 2-metiloctano, n-nonano, 2-metilnonano, n-decano, n-undecano, n-duodecano, metilciclohexano y sus mezclas.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que la concentración del látex de etilcelulosa en la fase orgánica (etapa a)) está comprendida entre 15% y 20% en peso respecto al peso total de dicha fase orgánica.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que dicho ácido inorgánico es ácido nítrico (HNO₃).

12. Método según la reivindicación 11, en el que dicho ácido nítrico (HNO₃) está presente en una concentración comprendida entre 10⁻⁵ N y 10⁻¹ N, preferentemente entre 10⁻⁴ N y 10⁻² N, más preferentemente alrededor de 10⁻³ N.

13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que dicha base inorgánica es hidróxido sódico (NaOH).

14. Método según la reivindicación 7, en el que dicho tensioactivo se selecciona entre un dextrano, un éster de polioxietilensorbitano, un éster de sorbitano, un polietilenglicol, laurilsulfato sódico (LSNa), cetiltrimetil amonio y sus mezclas.

15. Método según la reivindicación 14, en el que dicho tensioactivo se selecciona entre LSNa, polietilenglicol 4000 y sus mezclas.

16. Método según la reivindicación 7, que comprende, además, la eliminación del disolvente utilizado en la etapa a).

17. Método según la reivindicación 7 ó 16, que comprende, además, someter la mezcla obtenida a un campo magnético.

18. Un sistema transportador de fármacos que comprende, al menos, una nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y, al menos, un fármaco.

19. Sistema según la reivindicación 18, en el que dicho fármaco es un agente antitumoral, antineoplásico o anticancerígeno, un agente antiinflamatorio, un fármaco utilizado en el tratamiento de la artrosis o artritis, un agente antiparkinsoniano, un fármaco útil para emboloterapia o un fármaco para el catabolismo de tumores mediante hipertermia.

20. Sistema según la reivindicación 18, que comprende un único fármaco.

21. Sistema según la reivindicación 18, que comprende dos o más fármacos diferentes.

22. Una composición farmacéutica que comprende, al menos, un sistema transportador de fármacos según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, junto con, al menos, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

23. Una composición que comprende al menos una nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un vehículo.

24. Empleo de nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el tratamiento de aguas residuales, en la fabricación de biosensorés, en la inmovilización de enzimas, en la separación magnética por afinidad de biomoléculas, en la selección de un tipo de células de entre una población celular, en xerografía o en electrografía.

25. Empleo de nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, como agente de contraste por resonancia magnética o en la elaboración de un agente de contraste por resonancia magnética.

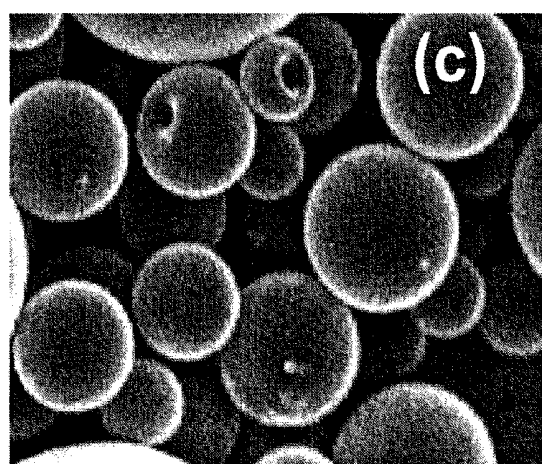
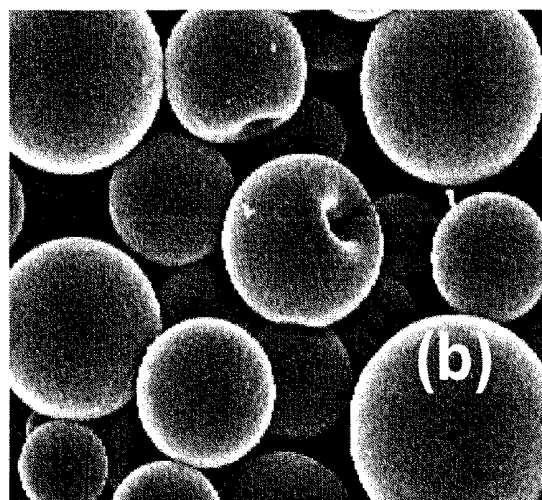
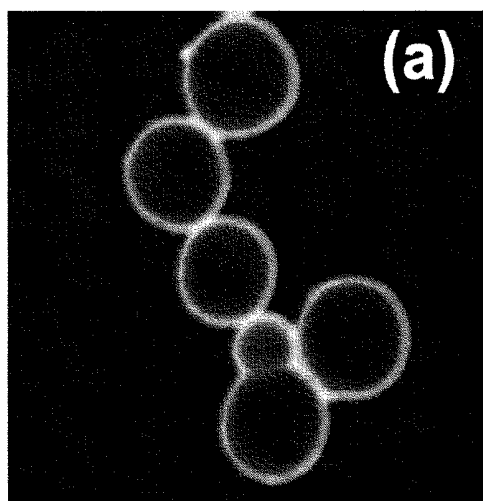


FIGURA 1

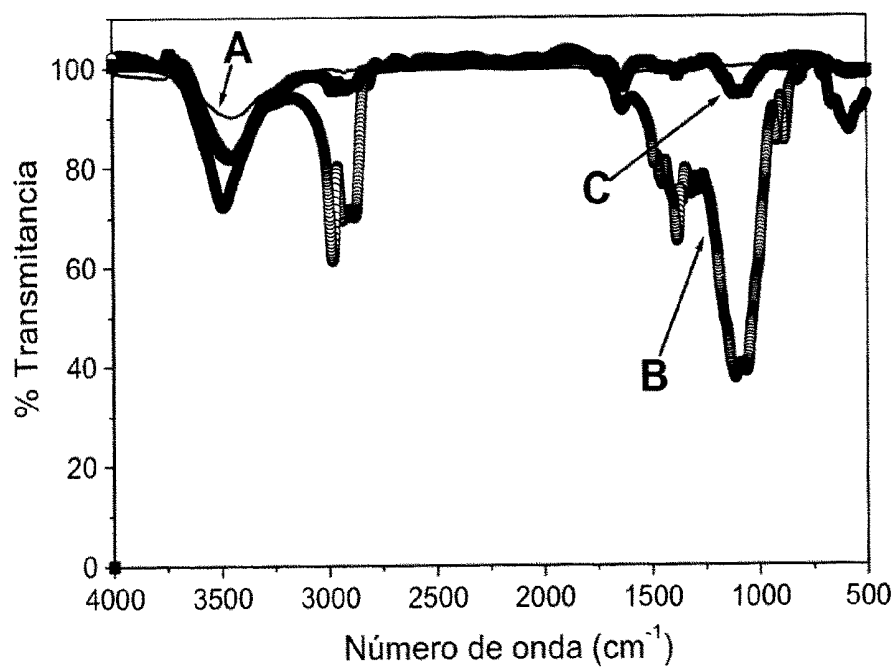


FIGURA 2

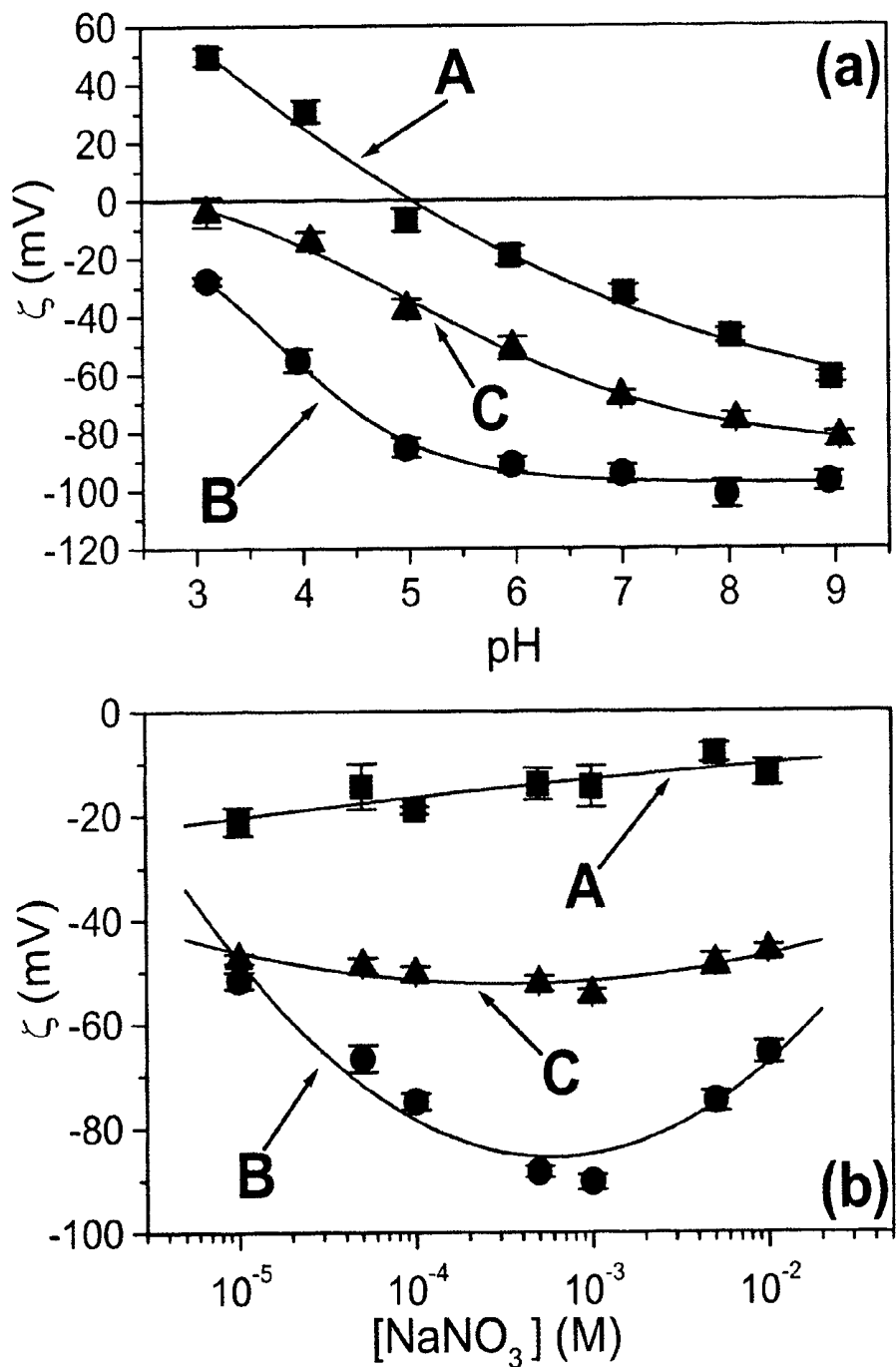


FIGURA 3

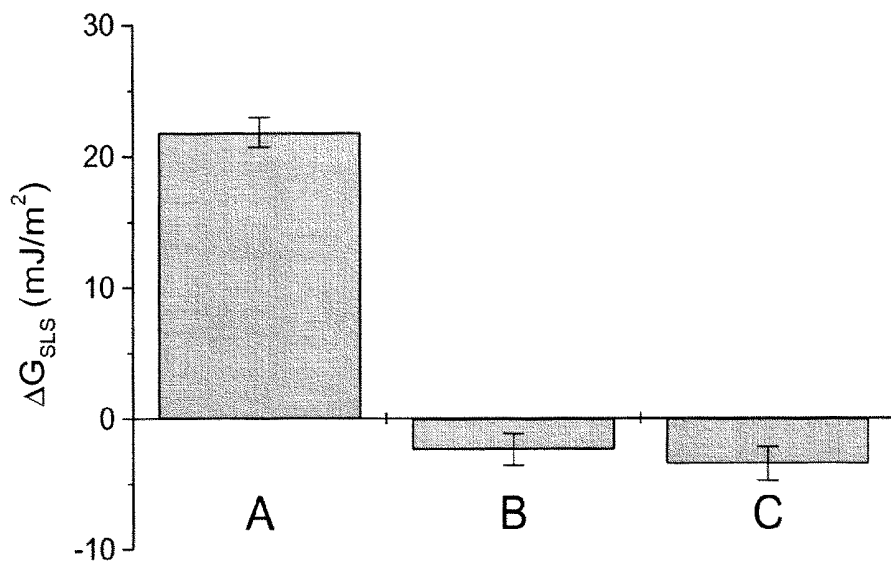


FIGURA 4

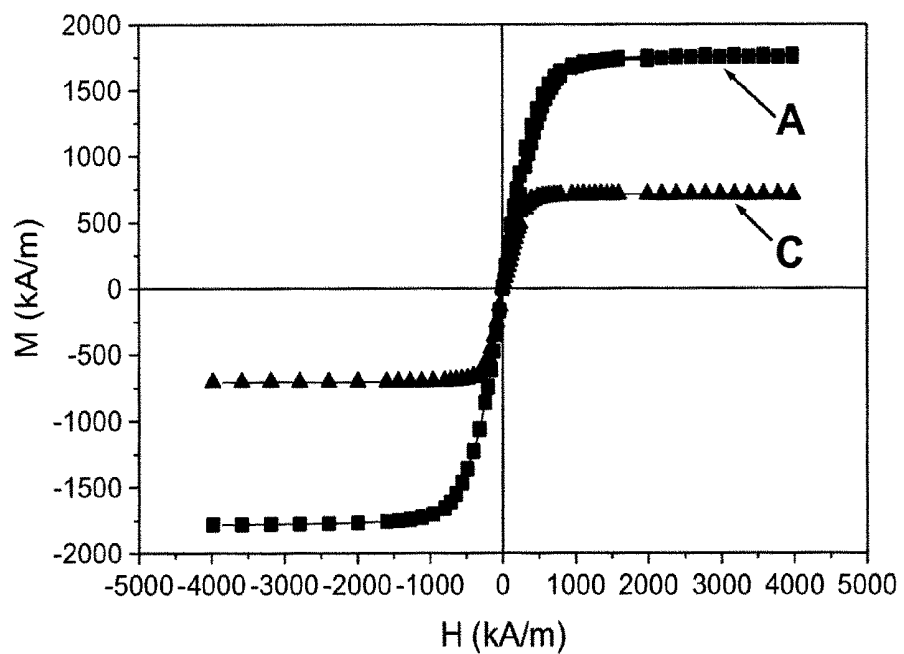


FIGURA 5

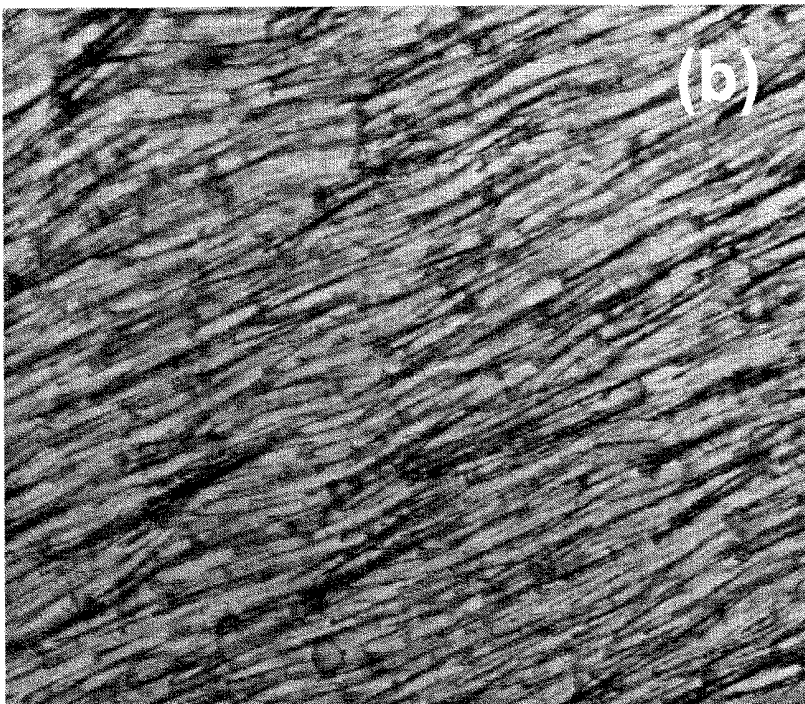
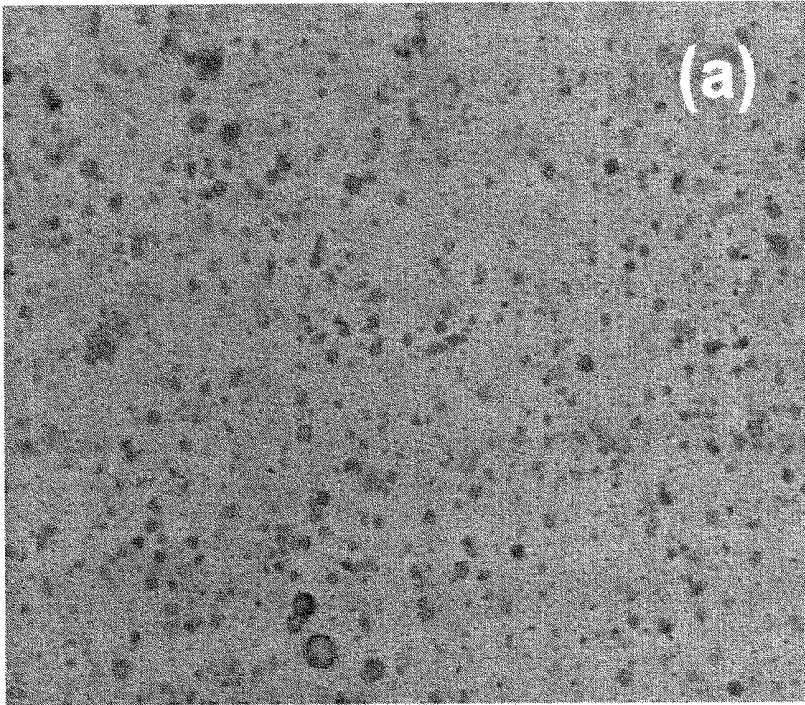


FIGURA 6

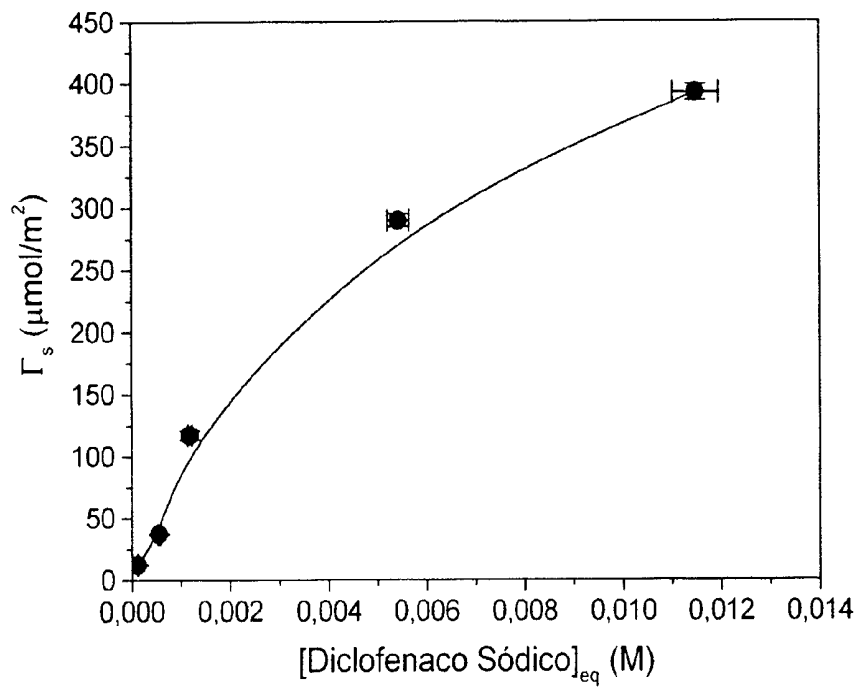


FIGURA 7

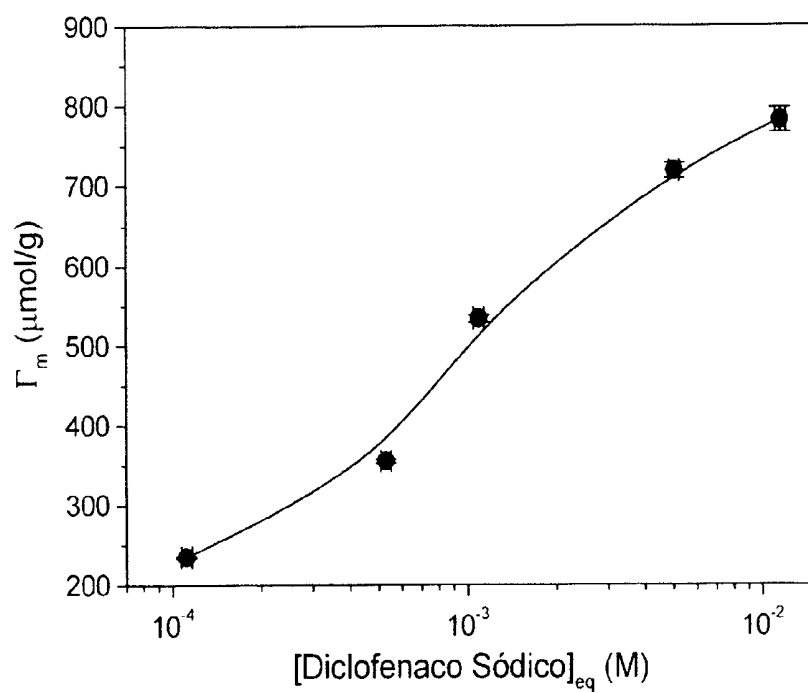


FIGURA 8



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 324 003

② Nº de solicitud: 200702051

② Fecha de presentación de la solicitud: **23.07.2007**

③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ARIAS, J.L. et al. "Development of carbonyl iron/ethylcellulose core/shell nanoparticles for biomedical applications" International Journal of Pharmaceutics 18-07-2007 Vol. 339, páginas 237-245; apartados 1, 2.2.1, 3.1 y 4.	1-25
A	XIANQAO LIU et al. "Synthesis and characterization of highly-magnetic biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres" Journal of Controlled Release. Mayo 2007 Vol. 119, páginas 52-58; apartados 1,3,4.	1-25
A	ARRUEBO, M. "Magnetic nanoparticles for drug delivery" Nanotoda Junio 2007 Vol. 2, Nº 3, páginas 22-32; todo el documento.	1-25
A	WO 2005013897 A2 (TRITON BIOSYSTEMS, INC.) 17.02.2005, párrafos [0018],[0019],[0048]-[0061], reivindicaciones 1-3,12-19,29-38,42,43.	1-25

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

03.06.2009

Examinador

V. Balmaseda Valencia

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

H01F 1/00 (2006.01)

H01F 1/42 (2006.01)

A61K 33/26 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 49/18 (2006.01)

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

H01F, A61K

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

INVENES, EPODOC,WPI, XPESP,NPL,HCAPLUS, ISI-WEB

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 03.06.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-25	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-25	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 ha sido publicada.

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	International Journal of Pharmaceutics Vol.339 páginas 237-245	18.07.2007
D02	ARRUEBO, M. "Magnetic nanoparticles for drug delivery"	17.02.2005

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

El objeto de la presente invención son nanopartículas que comprenden un recubrimiento con látex de etilcelulosa y un núcleo magnético (hierro carbonilo, magnetita, maghemita, etc.) con un diámetro inferior a 0,95 micrómetros. Así como su método de obtención y su uso como transportador de fármacos, tratamientos de aguas residuales, fabricación de biosensores, inmovilización de enzimas,...

El documento de D01 describe en método de preparación de nanopartículas que comprenden un núcleo de hierro carbonilo (con un diámetro medio de 520nm) y un recubrimiento de látex de etilcelulosa (apartado 1.). Dicho método comprende la preparación de una fase orgánica mediante de disolución de etilcelulosa en una mezcla de benceno/etanol y una fase acuosa de hierro carbonilo en HNO₃ (10-3N), la eliminación del disolvente de la fase orgánica (mediante evaporación y agitación a 2000 r.p.m. a temperatura ambiente), la adición de polietilenglicol y dodecil sulfato de sodio, el calentamiento a 67°C (8000 rpm) y su mezcla bajo agitación (apartado 2.2.1). A su vez, describe la preparación de un fármaco mediante su disolución bien en la fase acuosa o bien en la fase orgánica. Se destaca el uso de las partículas resultantes como transportador de fármacos gracias a su tamaño, biocompatibilidad y capacidad de respuesta a campos magnéticos (apartado 4). Así por tanto, las características técnicas recogidas en las reivindicaciones 1-25 derivan directamente y sin equívoco del documento citado. En consecuencia, se considera que el objeto de dichas reivindicaciones carece de novedad y actividad inventiva (Art.6.1 y 8.1 de la L.P.)