

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 955 867**

51 Int. Cl.:

A61K 49/00 (2006.01)

A61N 2/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C01G 49/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.01.2018** **PCT/US2018/015926**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.01.2019** **WO19018004**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2018** **E 18716084 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2023** **EP 3655042**

54 Título: **Nanopartículas de óxido de hierro dopadas con metales alcalinos o alcalinotérreos**

30 Prioridad:

21.07.2017 KR 20170092955

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

07.12.2023

73 Titular/es:

NEO-NANOMEDICS, INC. (100.0%)
577 New Cut Lane
Blythewood, SC 29106, US

72 Inventor/es:

BAE, SEONG TAE y
JANG, JUNG TAK

74 Agente/Representante:

ROEB DÍAZ-ÁLVAREZ, María

ES 2 955 867 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas de óxido de hierro dopadas con metales alcalinos o alcalinotérreos

5 **Antecedentes****1. Campo técnico**

10 La presente invención se refiere a nanopartículas de óxido de hierro capaces de tener características gigantescas de autocalentamiento de CA en un campo magnético de CA biocompatible y su aplicación al tratamiento de hipertermia.

2. Descripción de la técnica relacionada

15 La hipertermia es una modalidad de tratamiento del cáncer que utiliza características de las células cancerosas, que son más sensibles al calor que las células normales debido a ambientes anormales alrededor de las células cancerosas. Esta modalidad de tratamiento mantiene la temperatura circundante alrededor de las células cancerosas en un rango cálido (41 °C a 45 °C) en comparación con la quimioterapia o radioterapia convencional, de modo que esta modalidad de tratamiento tiene ventajas médicas en el sentido de que incluso las células cancerosas extremadamente pequeñas localizadas o profundamente arraigadas en el tejido vivo pueden morir selectivamente
20 mediante calor sin dañar las células normales.

Se requiere el desarrollo de la técnica de autocalentamiento magnético de CA en entornos *in vivo* para lograr un tratamiento eficaz contra el cáncer, y recientemente se han realizado una gran cantidad de esfuerzos de investigación para desarrollar nanopartículas magnéticas de autocalentamiento de CA. En el tratamiento del cáncer mediante
25 hipertermia usando nanopartículas magnéticas, las células cancerosas murieron por el calor generado por nanopartículas magnéticas en el campo magnético de CA.

Además, las nanopartículas magnéticas con superparamagnetismo no tienen agregación de partículas cuando se introducen en un cuerpo vivo. Cuando se aplica un campo magnético de CA a las nanopartículas magnéticas, es
30 posible controlar fácilmente el calor generado por el campo magnético de CA aplicado y las nanopartículas magnéticas pueden introducirse en un cuerpo vivo solo mediante un simple tratamiento de inyección sin cirugía.

Aunque solo los materiales magnéticos de gran tamaño mostraron un efecto de autocalentamiento, existen limitaciones para su aplicación práctica debido a la dificultad para aumentar continuamente la temperatura de autocalentamiento y la dificultad para introducir los materiales magnéticos en un cuerpo vivo. Sin embargo, recientemente, un equipo de investigación colaborativo de la Universidad Nacional de Singapur y la Universidad Nacional de Yokohama de Japón ha publicado un estudio sobre un nuevo tipo de nanopartículas magnéticas que se calientan espontáneamente y su efecto de calentamiento en las células es lo suficientemente eficaz para su aplicación práctica, por lo tanto cabe
40 esperar la consecución de un nuevo tratamiento contra el cáncer.

Un artículo titulado "Applications of NiFe₂O₄ nanoparticles for a hyperthermia agent in biomedicine" en Applied Physics Letters, Vol. 89, 252503 (2006) desvela la eficacia de nanopartículas magnéticas de NiFe₂O₄ como agente de hipertermia *in vivo*.

45 El documento US 2009/081122 A1 se refiere a una formulación inyectable para el tratamiento por hipertermia, cuya formulación comprende un vehículo líquido y nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas generadoras de calor que tienen un diámetro medio no superior a 20 nm. Dicha formulación inyectable es capaz de formar *in situ* un implante hipertérmico sólido o semisólido al entrar en contacto con un fluido o tejido corporal. Dicho implante hipertérmico sólido o semisólido puede ser útil para tratar un tumor o una enfermedad degenerativa del disco mediante
50 hipertermia.

Además, la publicación de patente estadounidense n.º 2005-0090732 desvela el tratamiento de hipertermia orientada a dianas utilizando óxido de hierro. Sin embargo, la mayoría de los tratamientos de hipertermia convencionales se relacionan con nanopartículas de óxido de hierro que muestran un efecto de emisión de calor a altas frecuencias y un
55 alto campo magnético (o un alto campo magnético de CA).

Las nanopartículas de T-Fe₂O₃ se conocen de ADHYAPAK PARAG V ET AL, "Influence of Li doping on the humidity response of maghemite (γ-Fe₂O₃) nanopowders synthesized at room tempera", CERAMICS INTERNATIONAL, ELSEVIER, AMSTERDAM, Países Bajos, vol. 39, n.º 7, 9 de abril de 2013 (09-04-2013), páginas 8153-8158, XP028676422, ISSN 0272-8842, DOI: 10.1016/J.CERAMINT.2013.03.089; Shanmuga R ET AL, "Preparation and Characterization of Mg Doped γ-Fe₂O₃ Prepared by Self-Propagation Method Introduction[1-3]", International Journal of ChemTech Research CODEN (EE.UU., 1 de junio de 2014 (2014-06-01), páginas 2129-2131, XP55789543; y JING ET AL, "Ethanol sensing properties of γ-Fe₂O₃ nanopowder doped with Mg by nonaqueous medium method", MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING: B, ELSEVIER, AMSTERDAM, Países Bajos, vol. 133, n.º 1-3, 25 de
65 agosto de 2006 (25-08-2006), páginas 213-217, XP025100298, ISSN 0921-5107, DOI: 10.1016/J.MSEB.2006.05.006.

Sin embargo, en el tratamiento del cáncer con hipertermia de alta frecuencia, pueden aparecer manchas rojas alrededor de la piel y pueden producirse áreas con alto contenido de grasa, algunas quemaduras, heridas, inflamaciones y necrosis celular. Ante todo, los efectos secundarios debidos a la nocividad de los campos eléctricos de alta frecuencia para los seres humanos son inevitables. Por lo tanto, este tratamiento está prohibido para mujeres embarazadas, pacientes con inflamación severa, pacientes con marcapasos cardíacos implantados y pacientes con derrame pleural severo y ascitis.

Además, ya que es necesario irradiar calor a los tejidos cancerosos durante un tiempo prolongado, los cuerpos de los seres humanos están expuestos a ondas electromagnéticas de alta frecuencia durante mucho tiempo y, por lo tanto, existe el problema de que los tejidos normales también pueden resultar dañados.

Para resolver los problemas antes mencionados, es necesario desarrollar nanopartículas magnéticas capaces de autocalentarse en un campo magnético de CA bajo y biocompatible (o un campo magnético de CA seguro).

Breve resumen

Un objeto de la presente invención es proporcionar nanopartículas de óxido de hierro capaces de autocalentarse lo suficiente incluso en un campo magnético de CA biocompatible bajo (o seguro).

La invención se define por las siguientes reivindicaciones.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, las nanopartículas de óxido de hierro son nanopartículas en las que $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemita) está dopada con un ion de metal alcalino o metal alcalinotérreo, específicamente nanopartículas en las que un sitio vacante de Fe del $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ está dopado con un metal alcalino o alcalinotérreo.

El metal alcalino se selecciona del grupo que consiste en sodio (Na) y potasio (K), y el metal alcalinotérreo se selecciona del grupo que consiste en magnesio (Mg) o calcio (Ca).

Las nanopartículas de óxido de hierro pueden generar un calor gigantesco incluso en un campo magnético de CA bajo y biocompatible de $f_{\text{apl}} \cdot H_{\text{apl}}$ de $3,0 \times 10^9 \text{ Am}^{-1}\text{s}^{-1}$ o menos, y puede tener una potencia de pérdida intrínseca (ILP) de $13,5 \text{ nHm}^2/\text{kg}$ a $14,5 \text{ nHm}^2/\text{kg}$ en un campo magnético AC de $f_{\text{apl}} \cdot H_{\text{apl}} < 1,8 \times 10^9 \text{ Am}^{-1}\text{s}^{-1}$ ($f_{\text{apl}} < 120 \text{ kHz}$, $H_{\text{apl}} < 15,12 \text{ kA/m}$).

Las nanopartículas de óxido de hierro pueden tener un diámetro de partícula promedio de aproximadamente 7 nm a aproximadamente 13 nm, sin limitarse a ello.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, las nanopartículas de óxido de hierro se preparan mediante el método definido en la reivindicación 4.

El precursor de Fe^{3+} y el precursor de M^+ o M^{2+} ($\text{M} = \text{Na}, \text{K}, \text{Mg}$ y Ca) pueden incluir al menos uno seleccionado entre nitrato metálico, sulfato metálico, acetilacetato metálico, fluoroacetato metálico, haluro metálico, perclorato metálico, óxido de alquilo metálico, sulfamato metálico, estearato metálico y compuestos metálicos orgánicos, sin limitarse a ello. Por ejemplo, para las nanopartículas de $\text{Mg}_x\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, se utilizó acetato de magnesio (Mg) tetrahidratado y acetilacetato de hierro (Fe).

El disolvente puede incluir disolventes de benceno, disolventes hidrocarburos, disolventes de éter, disolventes poliméricos, disolventes líquidos iónicos, hidrocarburos halogenados, alcoholes, disolventes de sulfóxido, agua y similares, preferiblemente al menos uno de benceno, tolueno, halobenceno, octano, nonano, decano, bencil éter, fenil éter, éteres de hidrocarburos, disolventes poliméricos, dietilenglicol (DEG), agua y disolventes líquidos iónicos, sin limitarse a ello. Por ejemplo, para las nanopartículas de $\text{Mg}_x\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, se utilizó bencil éter.

En el método según la presente invención, el tensioactivo se puede usar para estabilizar nanopartículas y puede incluir al menos uno de los ácidos orgánicos (C_nCOOH , C_n : hidrocarbano, $7 \leq n \leq 30$) incluido el ácido oleico, ácido láurico, ácido esteárico, ácido mirístico y ácido hexadecanoico, sin limitarse a ello. Por ejemplo, para las nanopartículas de $\text{Mg}_x\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, se utilizó ácido oleico.

De acuerdo con la presente invención, el método de preparación de nanopartículas de óxido de hierro incluye: (a) calentar una solución mezclada de precursor de Fe^{3+} , un precursor de M^+ o M^{2+} ($\text{M} = \text{Na}, \text{K}, \text{Mg}$ y Ca), un tensioactivo y un disolvente a una temperatura inferior al punto de ebullición del disolvente en una atmósfera mixta de oxígeno y argón, seguido del mantenimiento de la solución mezclada a la temperatura durante un cierto período de tiempo; (b) calentar la solución mezclada nuevamente hasta el punto de ebullición del disolvente en una atmósfera mixta de oxígeno y argón, seguido de mantener la solución mezclada en el punto de ebullición durante un cierto período de tiempo; (c) retirar la fuente de calor y enfriar la solución mezclada hasta temperatura ambiente; y (d) realizar la precipitación y separación del polvo de nanopartículas agregando un disolvente polar a la solución mezclada y a continuación realizar una centrifugación.

En el método de preparación de nanopartículas de óxido de hierro según la presente invención, el nivel de dopaje se puede ajustar ajustando una cantidad de precursor de Fe^{3+} o precursor de M^+ o M^{2+} ($\text{M} = \text{Na}, \text{K}, \text{Mg}$ y Ca).

De acuerdo con la presente invención, las nanopartículas de óxido de hierro pueden realizar un autocalentamiento suficiente incluso en un campo magnético de CA bajo y biocompatible. Por lo tanto, las nanopartículas de óxido de hierro pueden utilizarse para el tratamiento del cáncer por hipertermia en un campo magnético de CA bajo.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un diagrama que ilustra un método para preparar nanopartículas de $\text{M}_x\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ ($\text{M} = \text{Li}, \text{Na}, \text{K}, \text{Mg}$ y Ca).

La Fig. 2 muestra imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de nanopartículas de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ preparadas según una realización de la presente invención.

La Fig. 3 son diagramas que ilustran modelos de estructura atómica que describen la configuración de espín de nanopartículas magnéticas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemita) y Fe_3O_4 (magnetita).

La Fig. 4 son diagramas que ilustran la estructura cristalina de nanopartículas magnéticas de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ (maghemita) según una realización de la presente invención. Una imagen ampliada indica que las redes cúbicas de oxígeno están centradas en las caras. Los espines del Fe^{3+} en los sitios T_d se alinean en antiparalelo con espines del Fe^{3+} en los sitios O_h bajo un campo magnético externo. Los iones de Mg^{2+} ocupan predominantemente los sitios vacantes de Fe existentes en los sitios O_h del $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

La Fig. 5 es un gráfico que representa las características de calentamiento inducidas magnéticamente por CA del $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, MgFe_2O_4 , y Fe_3O_4 medida a una $f_{\text{apl.}} = 110 \text{ kHz}$ y $H_{\text{apl.}} = \pm 140 \text{ Oe}$.

La Fig. 6 muestra imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de nanopartículas de MFe_2O_4 ($\text{M} = \text{Mn}, \text{Co}, \text{Ni}, \text{Fe}$) preparadas mediante un método convencional y un gráfico que muestra las características de calentamiento de las mismas inducidas magnéticamente por CA en un campo magnético de CA bajo.

La Fig. 7 muestra gráficos que representan los resultados de medición de la espectroscopía de absorción de rayos X (izquierda: absorción de rayos X cerca de la estructura del borde, derecha: estructura fina de absorción de rayos X extendida) de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, MgFe_2O_4 , y Fe_3O_4 en bruto.

La Fig. 8 es un diagrama que muestra la determinación de la composición de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ mediante espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDS).

La Fig. 9 muestra bucles de histéresis menores de CC medidos en un campo de barrido de $H_{\text{apl.}} = \pm 140 \text{ Oe}$ ($= 11,14 \text{ kAm}^{-1}$) de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, MgFe_2O_4 , y Fe_3O_4 , y

La Fig. 10 es un gráfico que representa una magnetización de nanopartículas de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ dependiente de la temperatura medidas en un campo magnético de excitación de 100 Oe .

La Fig. 11 muestra bucles de histéresis de CA medidos a una $f_{\text{apl.}} = 110 \text{ kHz}$ y $H_{\text{apl.}} = \pm 140 \text{ Oe}$ de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, MgFe_2O_4 , y Fe_3O_4 .

La Fig. 12 muestra gráficos que representan la dependencia de M_s , P_{total} , $P_{\text{pérdida por relajación}}$ y χ'' en la concentración (nivel) (x) de dopaje catiónico de Mg^{2+} de $\text{Mg}_x\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ según una realización de la presente invención.

La Fig. 13 muestra gráficos que representan la dependencia de la energía de anisotropía y el tiempo de relajación de Néel calculado con respecto a la concentración (x) de dopaje catiónico de Mg^{2+} en $\text{Mg}_x\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ según una realización de la presente invención.

La Fig. 14 muestra las características del aumento de temperatura de calentamiento inducido magnéticamente en CA de nanofluidos de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ dispersos en tolueno, etanol y agua desionizada medidos a una $f_{\text{apl.}} = 110 \text{ kHz}$ y $H_{\text{apl.}} = \pm 140 \text{ Oe}$ con una concentración de 3 mg/ml según una realización de la presente invención se mueven a una capa de solución acuosa.

La Fig. 15 es un gráfico para comparar los valores de ILP entre nanopartículas superparamagnéticas previamente presentadas y nanopartículas superparamagnéticas de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ según una realización de la presente invención y materiales representativos existentes conocidos en la técnica.

La Fig. 16 muestra gráficos que representan las características del aumento de temperatura de calentamiento inducido magnéticamente por CA de nanopartículas de $\text{Li}_{0,15}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, $\text{Na}_{0,20}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, $\text{K}_{0,18}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, y $\text{Ca}_{0,18}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ con Li^+ , Na^+ , K^+ , y Ca^{2+} , respectivamente, en un campo magnético de CA bajo.

Las Fig. 17 a 19 muestran resultados obtenidos por una prueba de hipertermia *in vitro* usando nanopartículas magnéticas de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ según una realización de la presente invención.

La Fig. 20 muestra los resultados obtenidos mediante una prueba de hipertermia *en vivo* usando nanopartículas magnéticas de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ según una realización de la presente invención.

La Fig. 21 muestra gráficos que representan los resultados obtenidos mediante una prueba de toxicidad de nanopartículas magnéticas de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ según una realización de la presente invención en células U87MG y células Hep3B.

La Fig. 22 muestra gráficos que representan la tasa de supervivencia celular de nanopartículas de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ y nanopartículas superparamagnéticas reportadas, determinada utilizando líneas celulares U87MG.

Descripción detallada

En lo sucesivo en el presente documento, las realizaciones ejemplares de la presente invención se describirán en lo sucesivo con detalle en relación con los dibujos adjuntos. Debe entenderse que la presente invención no se limita a las siguientes realizaciones y puede realizarse de diferentes maneras, y que las realizaciones se proporcionan para

una divulgación completa y una comprensión profunda de la invención por parte de los expertos en la técnica.

De acuerdo con la presente invención, las nanopartículas de óxido de hierro se preparan dopando un sitio vacante de Fe^{3+} del $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ con un ion de metal alcalino o un ion de metal alcalinotérreo, y generan un calor gigantesco incluso en un campo magnético de CA bajo y biocompatible. En la hipertermia, un campo magnético de CA biocompatible generalmente tiene una $f_{\text{apl}} \cdot H_{\text{apl}}$ de $5,0 \times 10^9 \text{ Am}^{-1}\text{s}^{-1}$ o menos, preferiblemente de $3,0 \times 10^9 \text{ Am}^{-1}\text{s}^{-1}$ o menos. Las nanopartículas de óxido de hierro según la presente invención pueden generar un calor gigantesco incluso en un campo magnético de CA bajo y biocompatible.

Como se usa en el presente documento, la expresión "dopado con... ion metálico" significa que un átomo metálico está dopado y unido por iones a los átomos circundantes y, por tanto, todas las expresiones "dopado con... ion metálico", "dopado con... átomo metálico" y "dopado con... metal" deben interpretarse en el mismo sentido.

Las nanopartículas de óxido de hierro según la presente invención generan calor en campos magnéticos de CA y se usan preferiblemente en un campo magnético de CA bajo y biocompatible.

En lo sucesivo en el presente documento, como ejemplo de las nanopartículas de óxido de hierro según la presente invención, se describirá el $\text{Mg}_x\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$.

El $\text{Mg}_x\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ se prepara mediante descomposición térmica a alta temperatura de un precursor de Fe^{3+} y un precursor de Mg^{2+} en una atmósfera de oxígeno, tiene una estructura cristalina en la que un sitio vacante de Fe^{3+} del $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ está dopado con Mg^{2+} , y genera un calor gigantesco incluso en un campo magnético de CA bajo y biocompatible.

Se describirá con más detalle un proceso de preparación de $\text{Mg}_x\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ ($x = 0,13$) (ver Fig. 1).

Para preparar $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, 0,13 mmol de acetato de magnesio (Mg) tetrahidratado, 2,0 mmol de acetilacetato de hierro (Fe), 1,2 mmol de ácido oleico y 20 ml de éter bencílico se mezclan en un matraz de fondo redondo de 50 ml y se agitan magnéticamente. La solución mezclada se calienta a 200°C durante 30 minutos ($\sim 8^\circ\text{C}/\text{min}$, primera tasa de aumento) en una atmósfera mixta de oxígeno y argón (caudal de $\sim 100 \text{ ml}/\text{min}$) y a continuación se mantiene durante 50 minutos (etapa de nucleación). Después, la solución mezclada se calienta nuevamente a 296°C (punto de ebullición del éter bencílico) durante 20 minutos ($5^\circ\text{C}/\text{min}$, segunda tasa de aumento) y a continuación se mantiene durante 60 minutos (etapa de crecimiento).

Después, se retira la fuente de calor y la solución mezclada se enfría a temperatura ambiente.

Se añade un disolvente polar como etanol a la solución mezclada, seguido de centrifugación, precipitando y separando así el polvo negro. Los productos separados (nanopartículas) se dispersan en un disolvente no polar como tolueno.

Para controlar la concentración de dopaje (x) de Mg^{2+} del $\text{Mg}_x\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, se utilizan una cantidad diferente precursor metálico de $\text{Mg}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ en condiciones experimentales idénticas. Por ejemplo, para sintetizar nanopartículas de $\text{Mg}_{0,10}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, se utilizan 0,10 mmol de acetato de Mg tetrahidratado y 2,0 mmol de acetilacetato de Fe en idénticas condiciones experimentales.

La Fig. 2 muestra imágenes de microscopio electrónico de transmisión de nanopartículas de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ de 7 nm preparadas mediante los procesos anteriores. Refiriéndose a la imagen del lado derecho, se puede ver que se observa una orientación de crecimiento cristalino (400) y la distancia reticular correspondiente es de $2,09 \text{ \AA}$, y que se observa una orientación de crecimiento cristalino (200) y la distancia reticular correspondiente es de $2,95 \text{ \AA}$. Estos valores son los mismos que los de un material en bruto de referencia de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Por lo tanto, se puede demostrar que la estructura cristalina de las nanopartículas preparadas mediante los procesos anteriores tiene una estructura de espinela típica de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

En nanopartículas sintetizadas convencionalmente, se preparan nanopartículas de MgFe_2O_4 (estructura de Fe_3O_4 dopado con Mg^{2+}).

Para preparar nanopartículas de MgFe_2O_4 , se ponen 1,0 mmol de MgCl_2 y 2,0 mmol de $\text{Fe}(\text{acac})_3$ en un matraz de fondo redondo de 100 ml que contiene éter dibencílico y un tensioactivo (ácido oleico y oleilamina). Como reductor se utilizan 10,0 mmol de 1,2-hexadecandiol.

La solución mezclada se calienta a 200°C durante 25 minutos en una atmósfera de argón y se mantiene durante 60 minutos (etapa de nucleación).

Después, la solución mezclada se calienta nuevamente a 296°C (punto de ebullición del éter bencílico) durante 30 minutos y se mantiene durante 60 minutos. Se retira la fuente de calor y se enfría la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente.

Se añade etanol al producto de reacción, seguido de centrifugación, obteniendo así polvo negro precipitado. Las

nanopartículas de MgFe_2O_4 obtenidas se dispersan en un disolvente no polar como tolueno.

Tras la preparación de las nanopartículas existentes, dos reactivos químicos, es decir, ácido oleico y oleilamina, se utilizan como factores de control del tamaño, y la oleilamina se puede utilizar como agente reductor. La estructura cristalina puede cambiar de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ en Fe_3O_4 durante su proceso de síntesis.

La oleilamina se utiliza principalmente en la preparación de nanopartículas de óxido de hierro. Para investigar el papel del tensioactivo, se llevaron a cabo experimentos de control con oleilamina en lugar de ácido oleico. Las nanopartículas sintetizadas con oleilamina mostraron un comportamiento de autocalentamiento de CA similar a las nanopartículas de MFe_2O_4 ($\text{M} = \text{Fe}^{3+}$, Co^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+}) debido a la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} que da lugar a la red de Fe_3O_4 en presencia de oleilamina. Este resultado confirma que la red de Fe_3O_4 dopada con iones Mg^{2+} no contribuye a las propiedades de calentamiento de CA.

El $\text{Mg}_x\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, que corresponde a las nanopartículas de óxido de hierro según la presente invención, se obtiene dopando los sitios vacantes de Fe^{3+} de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ con Mg^{2+} .

A diferencia del Fe_3O_4 , el $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ tiene espacios (sitios vacantes), que ocupan alrededor del 12 % de su volumen total (ver Fig. 3). Dado que el Fe_3O_4 se transforma gradualmente en $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ tras la preparación en una atmósfera de oxígeno, los iones de Fe^{2+} presentes en Fe_3O_4 se oxidan a iones de Fe^{3+} , se difunden, y se forman sitios vacantes en $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Dado que se requiere oxidación para preparar las nanopartículas de óxido de hierro según la presente invención, la preparación se puede realizar en una atmósfera de oxígeno o se puede utilizar un oxidante. La preparación propiamente dicha se realiza preferiblemente en una atmósfera mixta de oxígeno y argón para la estabilidad de la reacción.

Cuando dichos sitios vacantes de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ están dopados con un metal alcalino o alcalinotérreo, el $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ dopado demuestra cambios en la suavidad magnética y las propiedades magnéticas de CC/CA, específicamente la susceptibilidad magnética y, por lo tanto, responde a un campo magnético de CA bajo, generando así calor (ver Fig. 4).

Por otro lado, a diferencia del caso anterior, en el caso de un metal de transición (Zn, Fe, Mn, Co, Ni y similar), dado que desde el punto de vista termodinámico es energéticamente favorable que el metal de transición se sustituya predominantemente por iones de Fe^{3+} en un sitio octaédrico (O_h) y un sitio tetraédrico (T_h), no en sitio vacante, el $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ dopado exhibe propiedades magnéticas netas reducidas y responde de manera insignificante a un campo magnético de CA bajo (ver Figs. 3 y 4).

Las nanopartículas de óxido de hierro según la presente invención son nanopartículas en las que los sitios vacantes de Fe^{3+} del $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ están dopados con un metal alcalino o alcalinotérreo.

El metal alcalino es sodio (Na) o potasio (K), y el metal alcalinotérreo es magnesio (Mg) o calcio (Ca).

Las nanopartículas de óxido de hierro según la presente invención pueden emitir un calor gigantesco incluso en un campo magnético de CA bajo y biocompatible de $f_{\text{apl}} \cdot H_{\text{apl}}$ de $3,0 \times 10^9 \text{ Am}^{-1}\text{s}^{-1}$ o menos, y tienen una potencia de pérdida intrínseca (ILP) de $13,5 \text{ nHm}^2/\text{kg}$ a $14,5 \text{ nHm}^2/\text{kg}$ en un campo magnético AC de $f_{\text{apl}} \cdot H_{\text{apl}} < 1,8 \times 10^9 \text{ Am}^{-1}\text{s}^{-1}$ ($f_{\text{apl}} < 120 \text{ kHz}$, $H_{\text{apl}} < 15,12 \text{ kA/m}$).

Las nanopartículas de óxido de hierro según la presente invención pueden tener un diámetro de partícula promedio de aproximadamente 7 nm a aproximadamente 13 nm, sin estar limitado a ello, y puede tener varios tamaños de escala nanométrica.

La Fig. 5 es un gráfico que representa las características de calentamiento inducidas magnéticamente por CA del $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, MgFe_2O_4 , y Fe_3O_4 medidas en un campo magnético de CA bajo ($f_{\text{apl}} = 110 \text{ kHz}$, $H_{\text{apl}} = \pm 140 \text{ Oe}$) según una realización de la presente invención. Tal como se muestra en la Fig. 5, las nanopartículas de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ exhiben una $T_{\text{ca,máx}}$ excepcionalmente alta de 180°C . Mientras, las nanopartículas de MgFe_2O_4 preparadas convencionalmente (Fe_3O_4 dopado con iones de Mg^{2+}) exhiben una $T_{\text{ca,máx}}$ baja de 22°C bajo el mismo campo magnético de CA. Según un método convencional, casi no tiene efecto en la emisión de calor con un campo magnético de CA bajo.

La Fig. 6 muestra un gráfico que representa imágenes de microscopía electrónica de transmisión y características de calentamiento inducidas magnéticamente por CA de nanopartículas de MFe_2O_4 ($\text{M} = \text{Co}^{2+}$, Fe^{2+} , Mn^{2+} , y Ni^{2+}), que se preparan mediante un método convencional bajo las mismas condiciones magnéticas de CA ($f_{\text{apl}} = 110 \text{ kHz}$, $H_{\text{apl}} = \pm 140 \text{ Oe}$). Se puede observar que las nanopartículas sintetizadas convencionalmente (CoFe_2O_4 , Fe_3O_4 , MnFe_2O_4 , y NiFe_2O_4) casi no tienen efecto de emisión de calor. CoFe_2O_4 , Fe_3O_4 , MnFe_2O_4 , y NiFe_2O_4 tienen una estructura en la que los iones de Co^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , y Ni^{2+} están dopados en Fe_3O_4 en lugar de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, respectivamente.

La Fig. 7 muestra los resultados de las mediciones de absorción de rayos X cerca de la estructura del borde (XANES)

y la estructura fina de absorción de rayos X extendida (EXAFS) de nanopartículas de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$. A modo de comparación, se prepararon nanopartículas de MgFe_2O_4 convencional y Fe_3O_4 en bruto. Los espectros de Fe Kedge XANES (gráfico superior en la Fig. 7) mostraron que las nanopartículas de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ y MgFe_2O_4 tienen estados de oxidación de hierro promedio de +3 y +2,75, respectivamente. Comparando con el Fe_3O_4 en bruto, las nanopartículas de MgFe_2O_4 tienen una coordinación de Fe local típica de Fe_3O_4 mientras que, de acuerdo con los resultados analizados por EXAFS (gráfico inferior en la Fig. 7), se confirmó que las nanopartículas de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ tienen un $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ típico (maghemita). En cambio, las nanopartículas de MgFe_2O_4 sintetizado convencionalmente se obtienen dopando con Mg^{2+} en una estructura de magnetita (Fe_3O_4), y que las nanopartículas de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ según la presente invención se obtienen dopando con Mg^{2+} en una estructura de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$).

La Fig. 8 muestra los resultados de la determinación de la composición de nanopartículas de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ utilizando una espectroscopía de rayos X de dispersión de energía (EDS), y se puede ver que los iones de Mg^{2+} están bien presentados en las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

La Fig. 9 muestra bucles de histéresis menores de CC y la Fig. 10 muestra la magnetización dependiente de la temperatura de nanopartículas de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$. En referencia a las Fig. 9 y 10, se puede demostrar que el $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ según la presente invención presenta superparamagnetismo.

La Fig. 11 muestra el área de los bucles de histéresis de CA medidos a una $f_{\text{apl.}} = 110 \text{ kHz}$ y $H_{\text{apl.}} = \pm 140 \text{ Oe}$ de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, MgFe_2O_4 , y Fe_3O_4 . Las nanopartículas de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ tenían un área mucho mayor que las de MgFe_2O_4 y Fe_3O_4 . El área de pérdida por histéresis de CA más grande del $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ indica que tiene una mayor suavidad magnética de CA (o una respuesta magnética de CA más rápida). Por tanto, se puede demostrar que las nanopartículas de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ según la presente invención exhiben una emisión de calor gigantesca (o excepcionalmente alta).

La Fig. 12 muestra gráficos que representan la dependencia de M_s , P_{total} , $P_{\text{pérdida de relajación}}$, y χ''_m en la concentración (x) de dopaje catiónico de Mg^{2+} de $\text{Mg}_x\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$. El χ''_m (y $P_{\text{pérdida de relajación}}$) se incrementó drásticamente de $2,51 \times 10^{-3} \text{ emu}\cdot\text{g}^{-1}\text{Oe}^{-1}$ ($6,84 \times 10^6 \text{ W/m}^3$) a $7,574 \times 10^{-3} \text{ emu}\cdot\text{g}^{-1}\text{Oe}^{-1}$ ($3,42 \times 10^6 \text{ W/m}^3$) aumentando la concentración de dopaje de iones de Mg^{2+} hasta 0,13 y la P_{total} se incrementó correspondientemente de $7,82 \times 10^6 \text{ W/m}^3$ a $4 \times 10^7 \text{ W/m}^3$. Sin embargo, el incremento adicional de la concentración de dopaje de iones de Mg^{2+} hasta 0,15 dio lugar a una reducción severa de χ''_m ($P_{\text{pérdida-relajación-Néel}}$), M_s , y P_{total} . El aumento de la concentración de dopaje iónico de Mg^{2+} de 0 a 0,13 durante la síntesis da lugar a la aceleración de la ocupación de los sitios vacantes de Fe por parte de los iones de Mg^{2+} en la red de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ de modo que resulte en el aumento de la concentración de dopaje de Mg^{2+} que sería el principal responsable de la mejora significativa de M_s (χ''_m). Por el contrario, la repentina disminución de χ''_m , P_{total} , y M_s a $x = 0,15$ se puede suponer que se debe a la reducción de la concentración de dopaje de Mg^{2+} en sitios vacantes de Fe en $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ resultado de la sustitución de Fe^{3+} en el sitio O_h por cationes de Mg^{2+} . En referencia a la Fig. 12, se puede observar que las nanopartículas de $\text{Mg}_x\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ emiten una gran cantidad de calor cuando x satisface $0,05 \leq x \leq 0,15$. Las nanopartículas de $\text{Mg}_x\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ teóricamente emiten la mayor cantidad de calor en el caso de $x = 0,13$, y se puede observar que esto coincide con los resultados experimentales.

La Fig. 13 muestra gráficos que representan la dependencia de la energía de anisotropía y el tiempo de relajación de Néel calculado con respecto a la concentración (x) de dopaje catiónico de Mg^{2+} en nanopartículas de $\text{Mg}_x\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$. Se cree que la razón física del evidente aumento de χ''_m ($P_{\text{pérdida-relajación-Néel}}$) dependiendo de la concentración de dopaje catiónico de Mg^{2+} se debe principalmente al aumento de T_N (T_N más rápido) que resulta del cambio de suavidad magnética de CA o anisotropía magnética causada por la modificación de la concentración de dopaje de Mg^{2+} en los sitios vacantes de Fe de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

La Fig. 14 muestra las características del aumento de temperatura de calentamiento inducido magnéticamente en CA de nanofluidos de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ dispersos en tolueno, etanol y agua desionizada medidos a una $f_{\text{apl.}} = 110 \text{ kHz}$ y $H_{\text{apl.}} = \pm 140 \text{ Oe}$ con una concentración de 3 mg/ml. Con referencia a la Fig. 14, se puede confirmar que las nanopartículas de óxido de hierro de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ según la presente invención tienen un valor de potencia de pérdida intrínseca (ILP) de aproximadamente $13,9 \text{ nHm}^2\text{kg}^{-1}$ (en tolueno), $14,5 \text{ nHm}^2\text{kg}^{-1}$ (en etanol) y $14,0 \text{ nHm}^2\text{kg}^{-1}$ (en agua), respectivamente.

La Fig. 15 es un gráfico para comparar los valores de ILP entre nanopartículas de óxido de hierro según la presente invención y nanopartículas superparamagnéticas previamente reportadas conocidas en la técnica. En referencia a la Fig. 15, se puede confirmar que las nanopartículas de óxido de hierro según la presente invención tienen un valor de ILP que es aproximadamente 100 veces mayor que el de las nanopartículas de Fe_3O_4 comerciales (Feridex).

La Fig. 16 muestra gráficos que representan las características del aumento de temperatura de calentamiento inducido magnéticamente por CA de nanopartículas de $\text{Li}_{0,15}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, $\text{Na}_{0,20}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, $\text{K}_{0,18}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, y $\text{Ca}_{0,18}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, respectivamente, en un campo magnético de CA bajo ($f_{\text{apl.}} = 110 \text{ kHz}$, $H_{\text{apl.}} = \pm 140 \text{ Oe}$). Se puede confirmar que todas las nanopartículas ($\text{Li}_{0,15}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, $\text{Na}_{0,20}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, $\text{K}_{0,18}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, y $\text{Ca}_{0,18}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) presentaban una $T_{\text{CA,máx.}}$ excepcionalmente alta por encima de 100°C . Por lo tanto, se puede observar que todas las nanopartículas de $\text{M}_x\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ ($\text{M} = \text{Li, Mg, K, Na y Ca}$), que se obtienen dopando $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ con Mg o dopando con $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ con un metal alcalino o alcalinotérreo diferente del Mg, presentan un alto autocalentamiento de CA en un campo magnético de CA

bajo.

La Fig. 17 muestra los resultados obtenidos mediante una prueba de hipertermia *in vitro* con células U87MG después del tratamiento con nanopartículas magnéticas de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ y Resovist.

Las células U87MG se incubaron con 700 $\mu\text{g/ml}$ de nanofluidos de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ y Resovist, como grupo control, para la captación celular. Las células se pusieron en el centro de una bobina magnética de CA, y se aplicó un campo magnético de $f_{\text{apl.}} = 99 \text{ kHz}$ y $H_{\text{apl.}} = \pm 155 \text{ Oe}$ ($H_{\text{apl.}} \cdot f_{\text{apl.}} = 1,22 \times 10^9 \text{ Am}^{-1}\text{s}^{-1}$) a las células durante 1500 segundos. Con referencia al gráfico del lado derecho de la Fig. 17, se puede confirmar que las células tratadas con los nanofluidos de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ mostraron una $T_{\text{CA,máx.}}$ (63,5 °C) mucho más alta que Resovist (37,5 °C).

Con referencia a la Fig. 18 que muestra las imágenes del microscopio óptico de células U87MG antes y después de la hipertermia con nanofluidos magnéticos con nanofluidos de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, se puede confirmar que la necrosis celular de U87MG resultó de una deformación severa y se observó claramente una contracción de la morfología celular causada por la energía térmica aplicada después de la hipertermia con nanofluidos magnéticos; todas las células cancerosas fueron eliminadas por el calor. Con más detalle, se confirmó que el 75 % de las células cancerosas fueron eliminadas a 48 °C y que todas las células cancerosas quedaron completamente necrosadas a 63,5 °C. De este modo, se demostró la biodisponibilidad de las nanopartículas según la presente invención.

Por otro lado, la Fig. 19 es una imagen que muestra la imagen de microscopio óptico de células U87MG después de hipertermia con nanofluido magnético con Resovist (grupo de control), y no se observaron células que sufrieran deformación o contracción. Por tanto, se puede ver que la viabilidad celular dependía en gran medida de la temperatura de calentamiento de CA.

La Fig. 20 muestra los resultados obtenidos mediante una prueba de hipertermia *in vivo* usando nanopartículas magnéticas de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$.

Las células Hep3B transfectadas con luciferasa (para imágenes de bioluminiscencia, BLI) se crecieron subcutáneamente en ratones (modelo de xenoinjerto de cáncer).

100 μl de nanofluidos de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ se inyectaron intratumoralmente (100 μl , 11,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) en células cancerosas de los ratones ($\sim 1000 \text{ mm}^3$) a través del tejido blando usando una aguja doblada y se montaron termómetros ópticos en las células cancerosas y el área del recto para monitorizar la temperatura.

A modo de comparación, también se inyectaron intratumoralmente a los ratones Resovist (100 μl , 11,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y solución salina normal (100 μl , 11,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), respectivamente.

Los ratones se pusieron en el centro de una bobina magnética de CA y se expusieron a un campo magnético de CA ($f_{\text{apl.}} = 99 \text{ kHz}$, $H_{\text{apl.}} = \pm 155 \text{ Oe}$, $H_{\text{apl.}} \cdot f_{\text{apl.}} = 1,22 \times 10^9 \text{ Am}^{-1}\text{s}^{-1}$) durante 900 segundos.

La temperatura del recto y la Hep3B inyectada con Resovist aumentaron ligeramente de 34 °C a 36,37 °C y 37,14 °C, respectivamente. Sin embargo, la temperatura de las células Hep3B inyectadas con los nanofluidos de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ se incrementó rápidamente hasta 50,2 °C (temperatura de termoablación).

La actividad de la Hep3B se analizó empleando una técnica de imágenes por bioluminiscencia (BLI). La Hep3B tratada con los nanofluidos de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ no mostraron ninguna intensidad de BL desde el día 2 después de la hipertermia de nanofluidos magnéticos, mientras que los grupos de control aún exhibieron una fuerte intensidad de BL después de la hipertermia con nanofluidos magnéticos. Ausencia de intensidad de BL significa que las células cancerosas resultaron completamente necrosadas por hipertermia de nanofluidos magnéticos.

La Fig. 21 muestra gráficos que representan los resultados obtenidos mediante una prueba de toxicidad de nanopartículas magnéticas de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ según la presente invención en células U87MG y células Hep3B. De este resultado, se confirmó que las nanopartículas de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ mostraban una alta biocompatibilidad (ausencia de toxicidad) incluso en una concentración más alta (300 $\mu\text{g/ml}$).

La Fig. 22 muestra gráficos que representan la tasa de supervivencia celular de nanopartículas de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ y nanopartículas superparamagnéticas reportadas, determinada utilizando líneas celulares U87MG. Las nanopartículas de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ tenían una mayor biocompatibilidad (ausencia de toxicidad) con líneas celulares de U87MG en comparación con todas las demás nanopartículas superparamagnéticas reportadas, incluso en una concentración más alta (300 $\mu\text{g/ml}$). Las nanopartículas reportadas (Fe_3O_4 , CoFe_2O_4 , $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{MnFe}_2\text{O}_4$) tienen una estructura cristalina del Fe_3O_4 . En el caso del Fe_3O_4 , es probable que ocurra la reacción de Fenton y produzca un efecto tóxico para las células durante la internalización celular debido a los iones de Fe^{2+} en la red de Fe_3O_4 . Sin embargo, las nanopartículas de $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, que son formas totalmente oxidadas de Fe_3O_4 , solo tienen iones de Fe^{3+} en el cristal reticular de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Por lo tanto, se espera que la posibilidad de que ocurra una reacción de Fenton sea extremadamente baja durante la internalización celular. Como se ha descrito anteriormente, se demostró a través de tanto de pruebas *in vitro* como *in vivo* que las células cancerosas se podían destruir por completo utilizando nanopartículas magnéticas

según la presente invención. Por lo tanto, las nanopartículas de óxido de hierro según la presente invención se pueden utilizar clínicamente.

- 5 Hasta el momento, la presente invención se ha descrito con referencia a algunas realizaciones junto con los dibujos adjuntos. Aunque en el presente documento se usan términos específicos, debe entenderse que los términos tienen solo el propósito de describir las realizaciones de la presente invención y no pretenden limitar la presente invención. Además, deberá entenderse que diversas modificaciones, cambios, modificaciones y realizaciones equivalentes pueden llevarse a cabo por los expertos en la técnica sin apartarse del alcance de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones. Por lo tanto, el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las
- 10 reivindicaciones acompañantes.

REIVINDICACIONES

1. Nanopartículas de óxido de hierro en las que $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ está dopado con un metal alcalino o alcalinotérreo del grupo formado por Na, K, Mg y Ca, en donde:
 - un sitio vacante de Fe de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ está dopado con metal alcalino o metal alcalinotérreo; las nanopartículas de óxido de hierro están representadas por $\text{Mg}_x\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, en donde x satisface $0,05 \leq x \leq 0,15$, o por $\text{Na}_{0,20}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, o por $\text{K}_{0,18}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, o por $\text{Ca}_{0,18}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$.
2. Las nanopartículas de óxido de hierro según la reivindicación 1, en donde las nanopartículas de óxido de hierro están representadas por $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ y tienen una potencia de pérdida intrínseca (ILP) de 13,9 nHm²/kg en tolueno, 14,5 nHm²/kg en etanol y 14,0 nHm²/kg en agua cuando se ponen en un campo magnético de CA de $f_{\text{apl.}} = 110$ kHz y $H_{\text{apl.}} = \pm 140$ Oe con una concentración de 3 mg/ml.
3. Las nanopartículas de óxido de hierro según la reivindicación 1, en donde las nanopartículas de óxido de hierro están representadas por $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ que presenta una temperatura de 180 °C, o por $\text{Na}_{0,20}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, $\text{K}_{0,18}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, o $\text{Ca}_{0,18}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ que presenta una temperatura superior a 100 °C, cada uno cuando se pone en un campo magnético de CA de $f_{\text{apl.}} = 110$ kHz y $H_{\text{apl.}} = \pm 140$ Oe.
4. Un método para preparar nanopartículas de óxido de hierro capaces de calentarse en un campo magnético de CA bajo y biocompatible, comprendiendo el método:
 - la preparación de nanopartículas de óxido de hierro en las que $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ está dopado con un metal alcalino o alcalinotérreo del grupo formado por Na, K, Mg y Ca, mezclando un precursor de Fe^{3+} , un precursor de M^+ o M^{2+} donde M se selecciona del grupo que consiste en Na, K, Mg y Ca, un tensioactivo y un disolvente en una atmósfera de oxígeno para formar una mezcla, y descomponer térmicamente la mezcla a alta temperatura, al
 - (a) calentar una solución mezclada de precursor de Fe^{3+} , un precursor de M^+ o M^{2+} donde M se selecciona del grupo que consiste en Na, K, Mg y Ca, un tensioactivo y un disolvente a una temperatura inferior al punto de ebullición del disolvente en una atmósfera mixta de oxígeno y argón, seguido del mantenimiento de la solución mezclada a la temperatura durante un cierto período de tiempo;
 - (b) calentar la solución mezclada nuevamente hasta el punto de ebullición del disolvente en una atmósfera mixta de oxígeno y argón, seguido de mantener la solución mezclada en el punto de ebullición durante un cierto período de tiempo;
 - (c) retirar la fuente de calor y enfriar la solución mezclada hasta temperatura ambiente; y
 - (d) realizar la precipitación y separación del polvo de nanopartículas agregando un disolvente polar a la solución mezclada y a continuación realizar una centrifugación, en donde:
 - un sitio vacante de Fe de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ está dopado con metal alcalino o metal alcalinotérreo; las nanopartículas de óxido de hierro están representadas
 - El $\text{Mg}_x\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, en donde x satisface $0,05 \leq x \leq 0,15$, o por $\text{Na}_{0,20}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, o por $\text{K}_{0,18}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, o por $\text{Ca}_{0,18}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el precursor de Fe^{3+} y el precursor de M^+ o M^{2+} comprende al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en nitrato metálico, sulfato metálico, acetilacetato metálico, fluoroacetato metálico, haluro metálico, perclorato metálico, óxido de alquilo metálico, sulfamato metálico, estearato metálico y compuestos metálicos orgánicos.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el tensioactivo comprende al menos uno de los ácidos orgánicos con la fórmula química C_nCOOH , (C_n : hidrocarbano, $7 \leq n \leq 30$), incluido el ácido oleico, ácido láurico, ácido esteárico, ácido mirístico y ácido hexadecanoico.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el nivel de dopaje se ajusta ajustando la cantidad de precursor de Fe^{3+} o de precursor de M^+ o M^{2+} .
8. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde las nanopartículas de óxido de hierro están representadas por $\text{Mg}_{0,13}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ que presenta una temperatura de 180 °C, o por $\text{Na}_{0,20}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, $\text{K}_{0,18}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, o $\text{Ca}_{0,18}\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ que presenta una temperatura superior a 100 °C, cada uno cuando se pone en un campo magnético de CA de $f_{\text{apl.}} = 110$ kHz y $H_{\text{apl.}} = \pm 140$ Oe.

FIG. 1

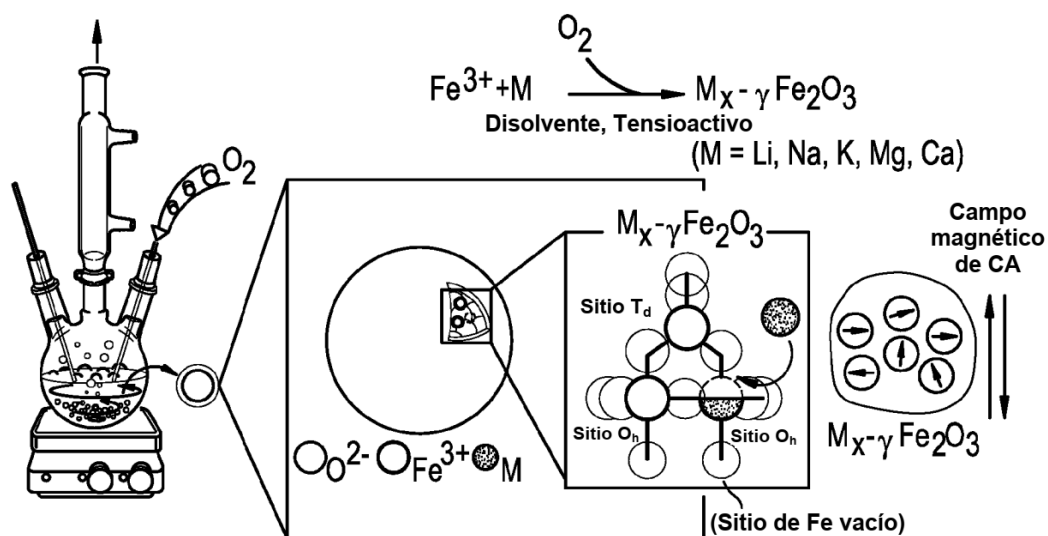
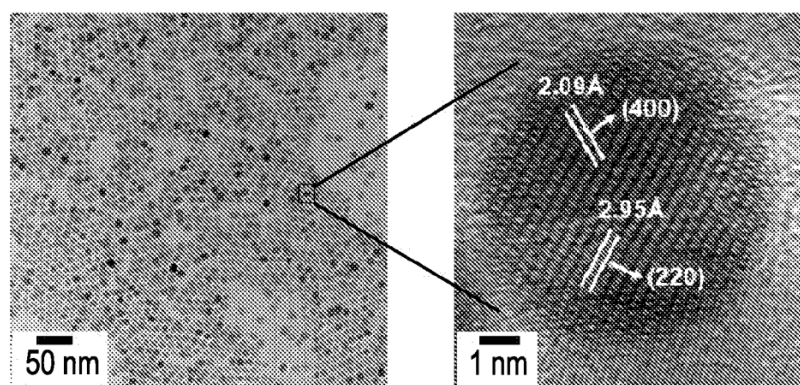


FIG. 2



Tamaño ~ 7 nm

FIG. 3

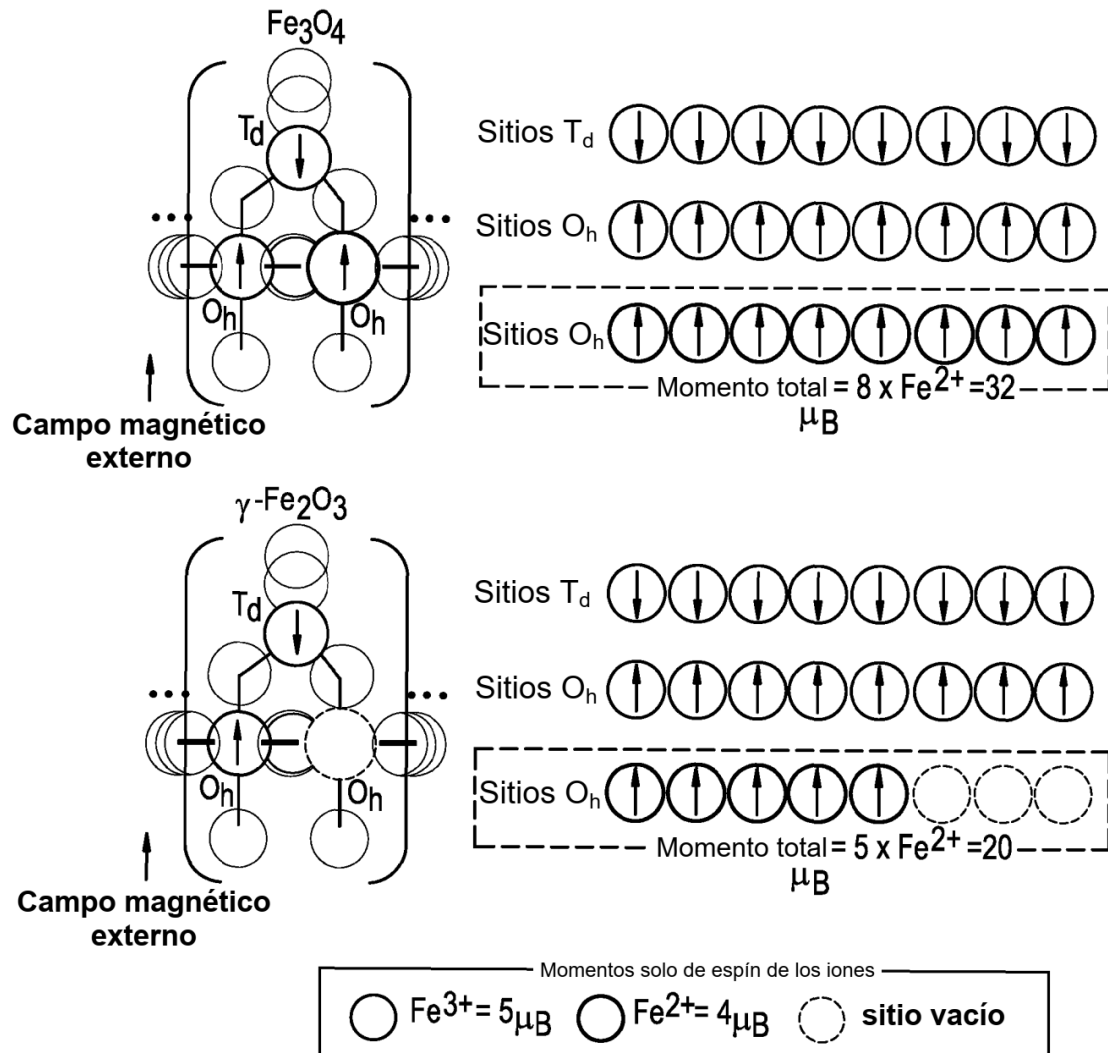


FIG. 4

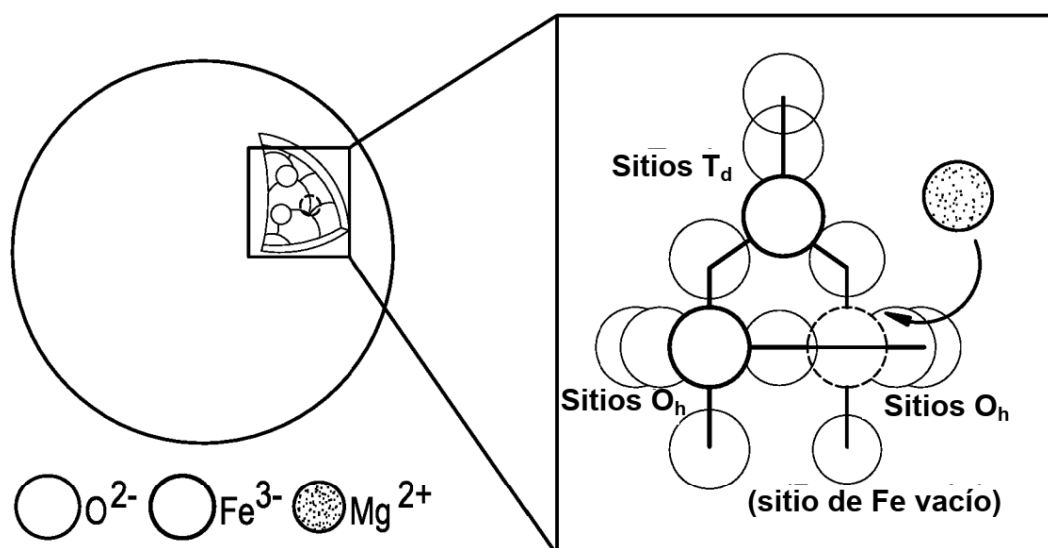


FIG. 5

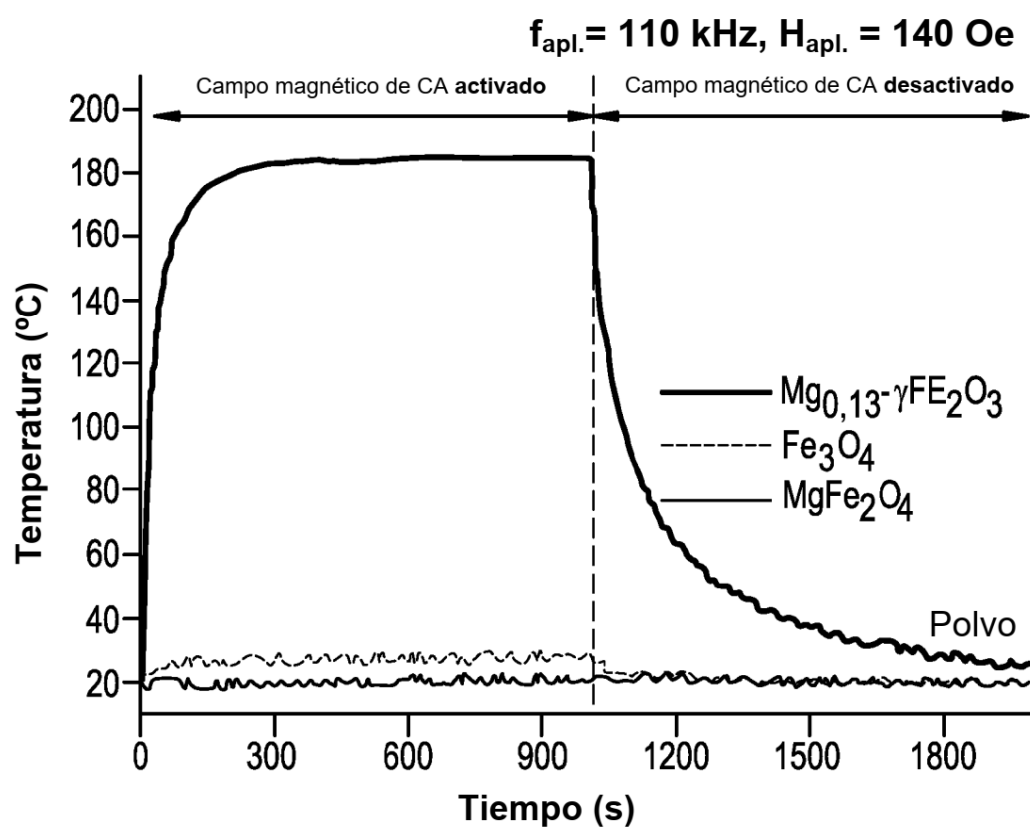


FIG. 6

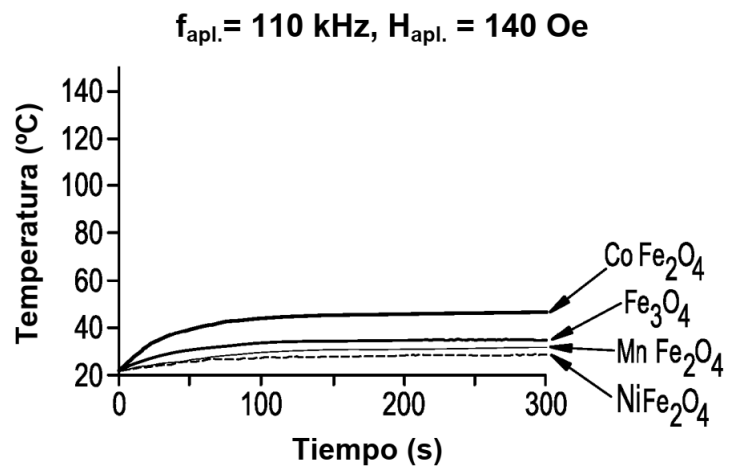
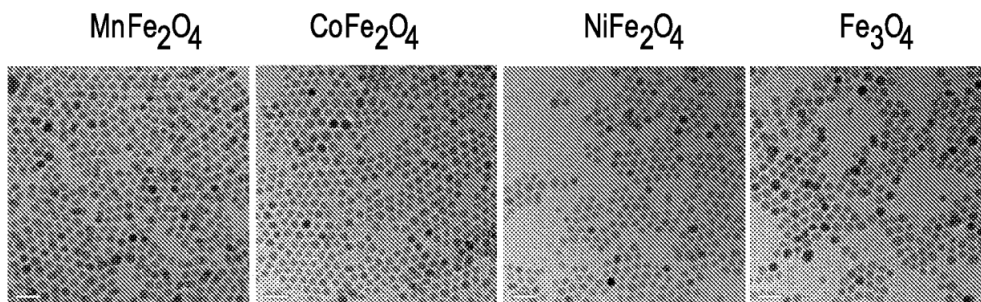


FIG. 7

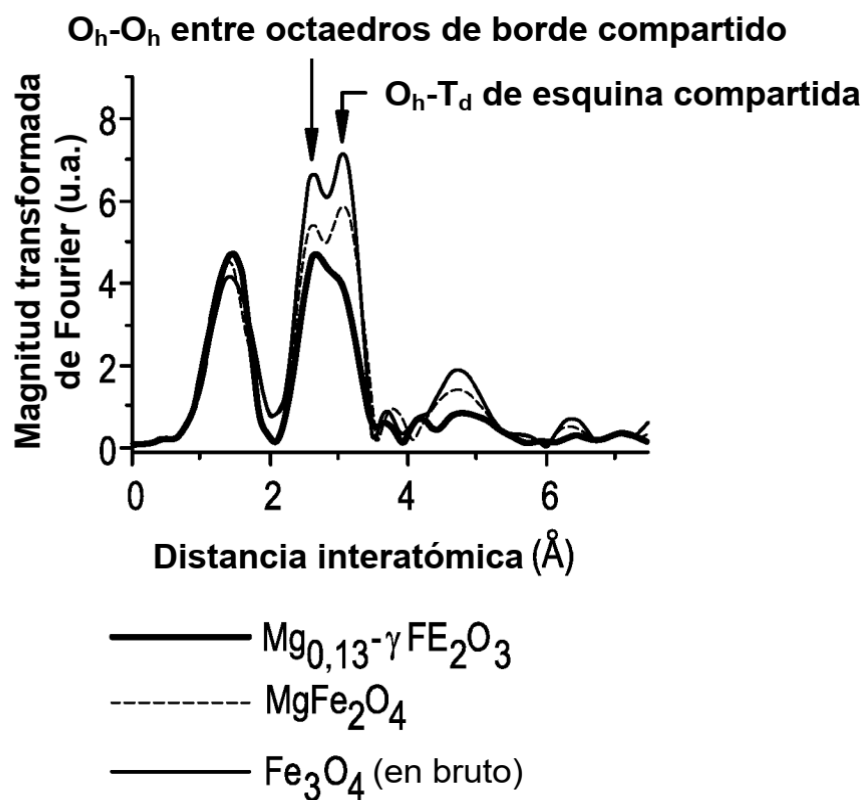
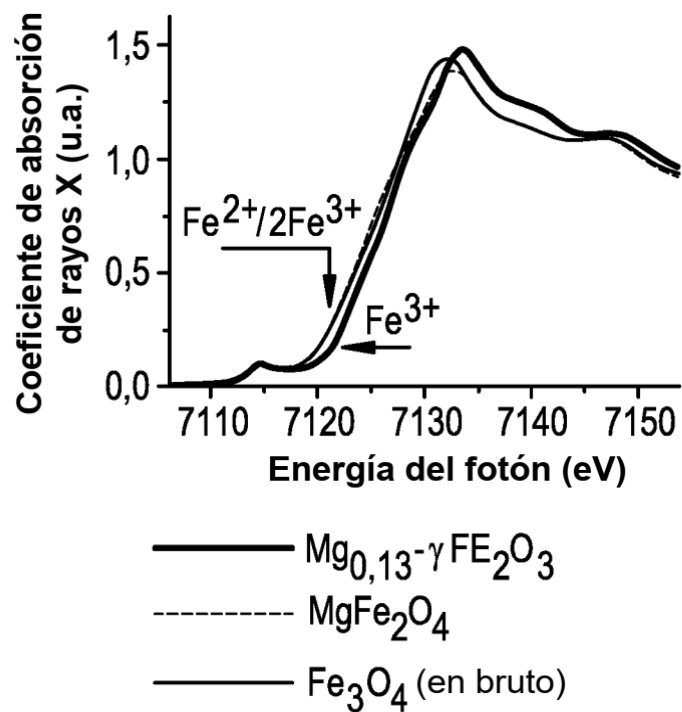


FIG. 8

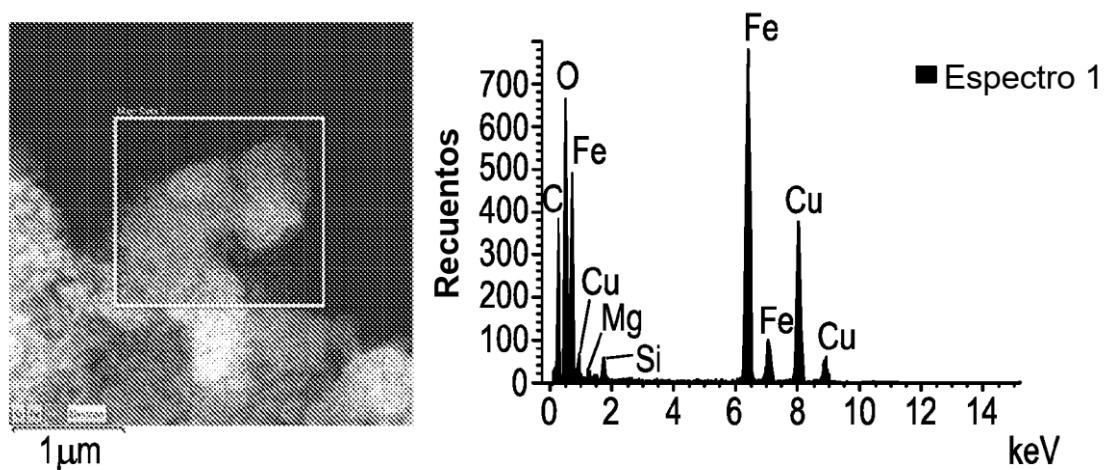


FIG. 9

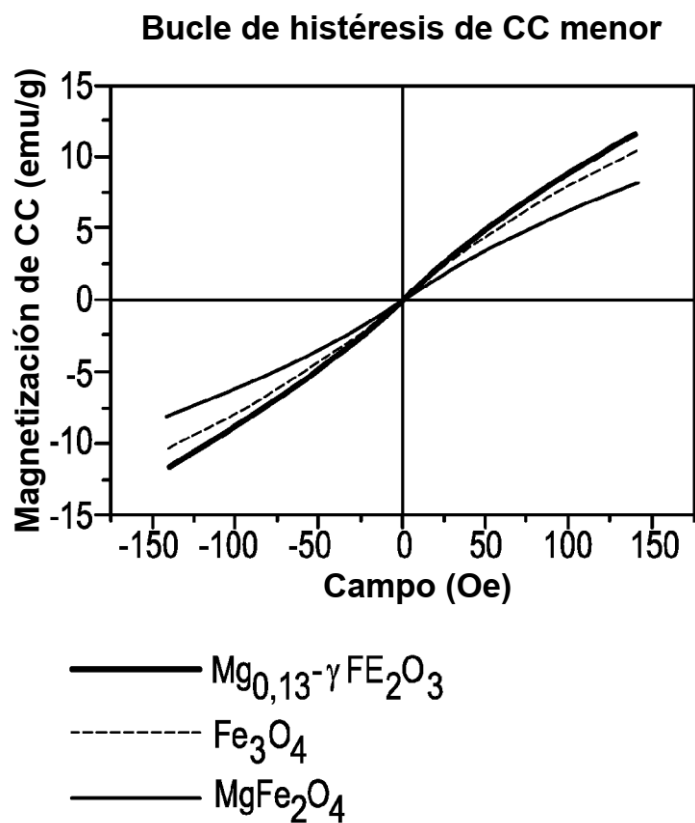


FIG. 10

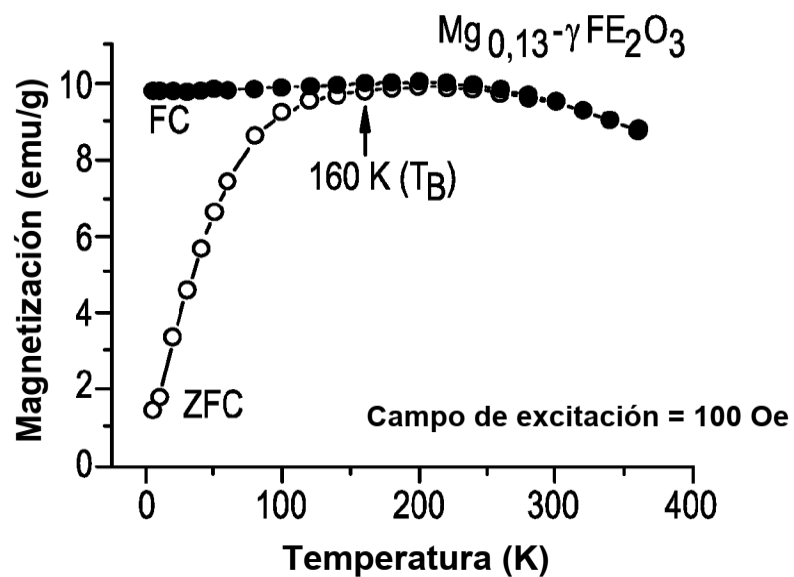


FIG. 11

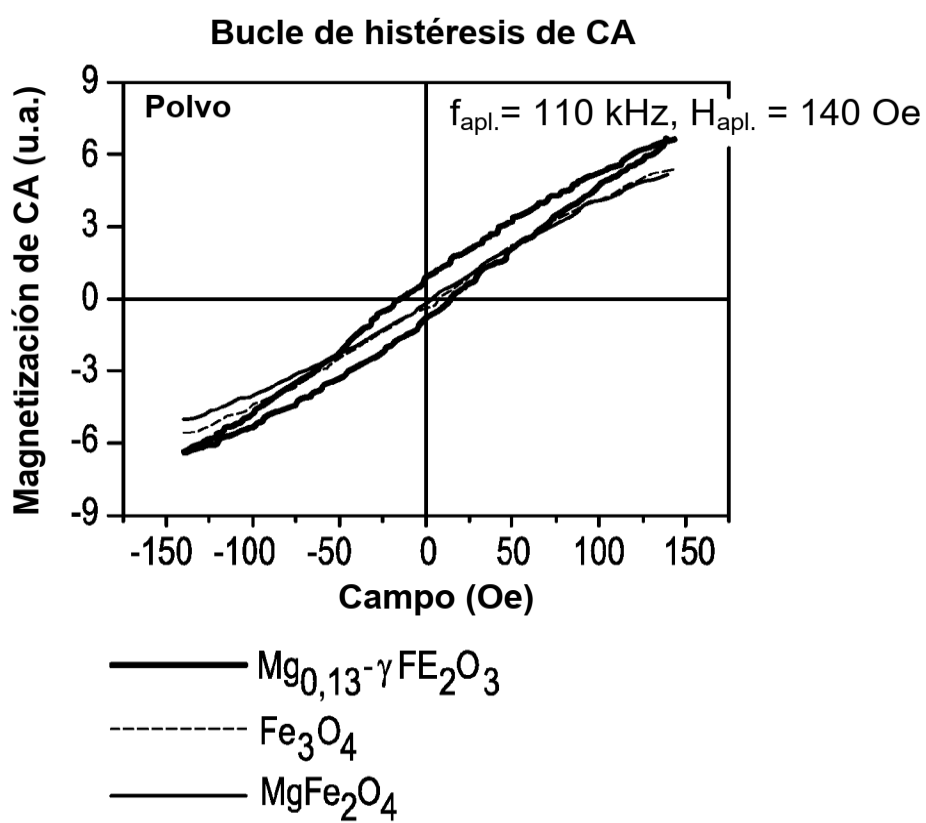


FIG. 12

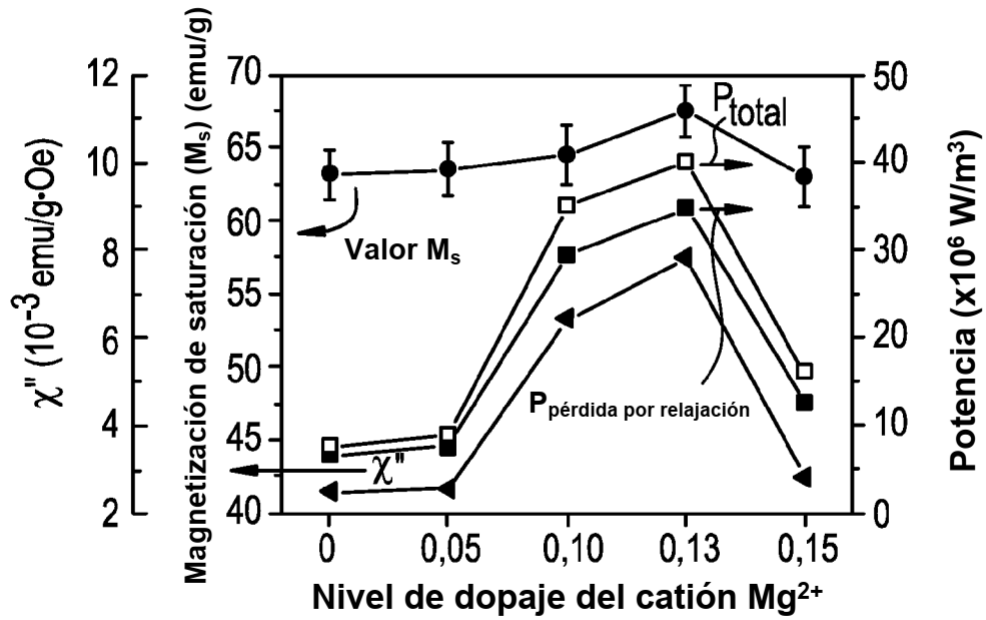


FIG. 13

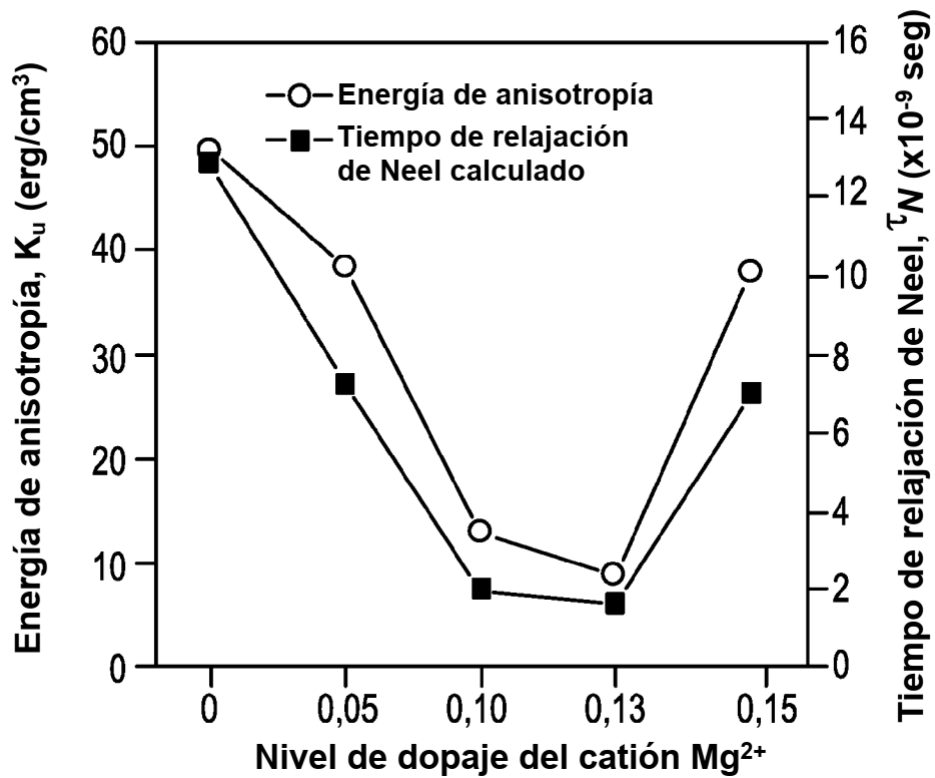
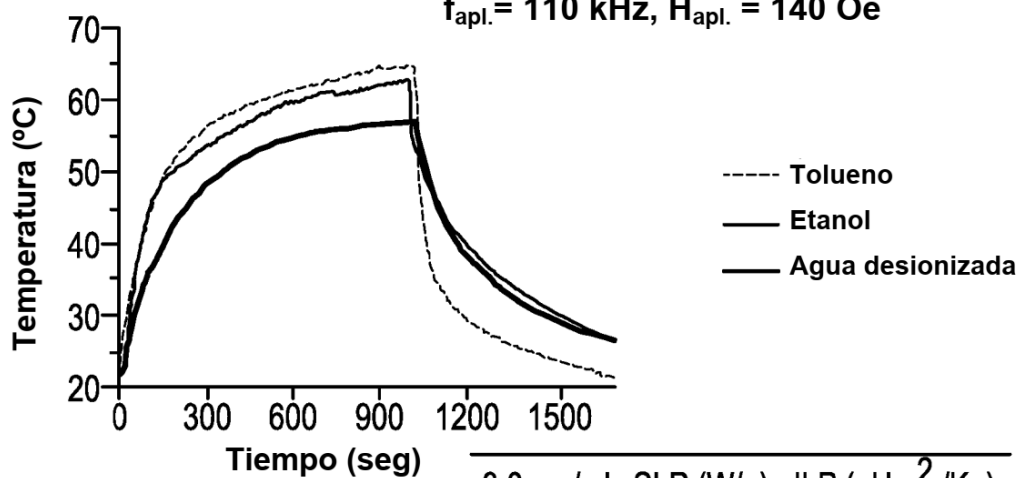


FIG. 14

 $f_{\text{apl.}} = 110 \text{ kHz}$, $H_{\text{apl.}} = 140 \text{ Oe}$ 

3,0 mg/ml	SLP (W/g)	ILP (nHm ² /Kg)
En tolueno	190	13,9
En etanol	198	14,5
En agua	192	14,0

FIG. 15

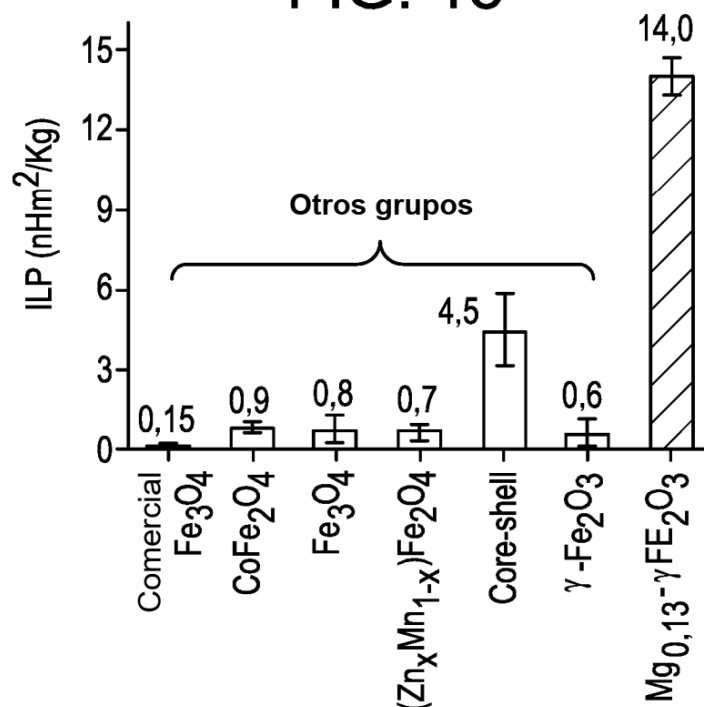


FIG. 16

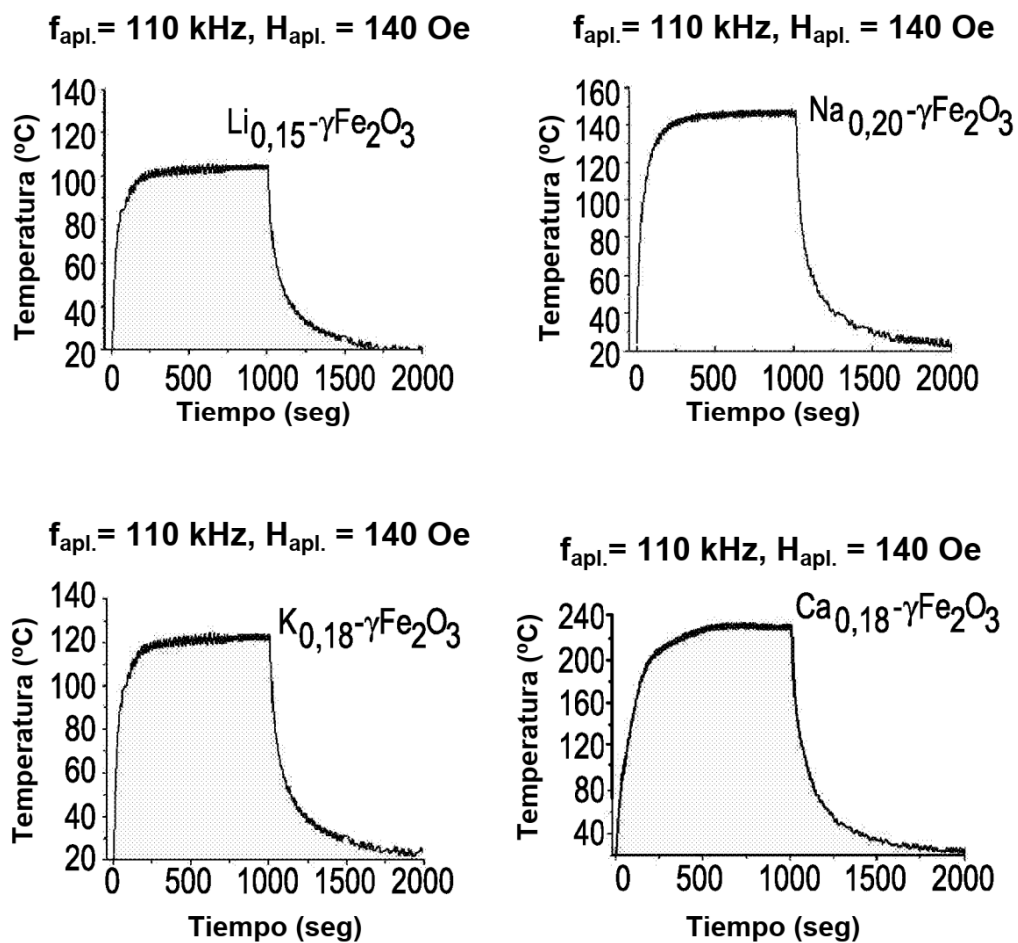
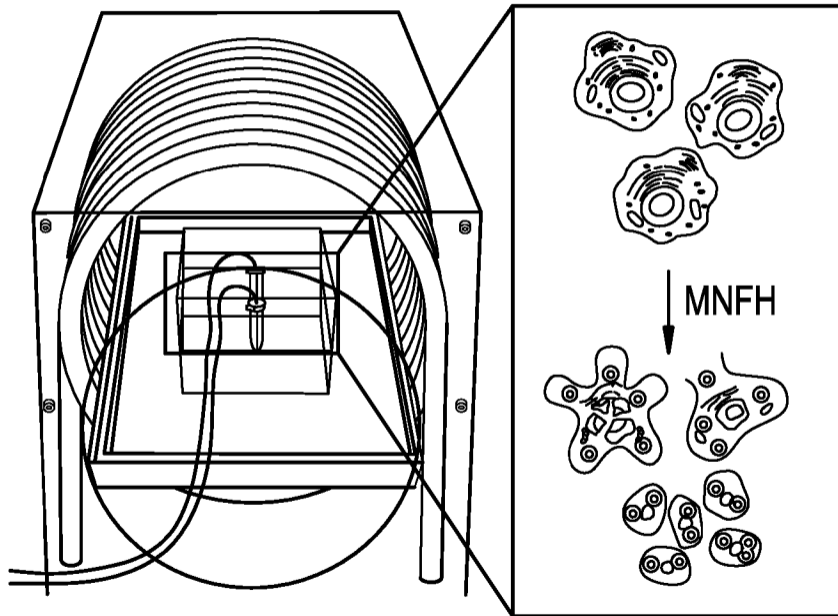
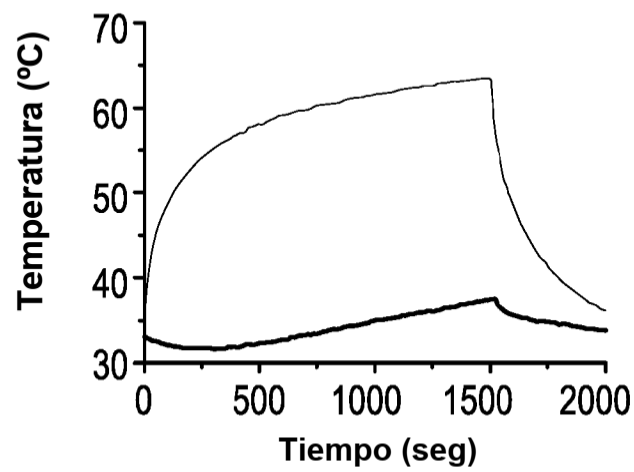


FIG. 17



$$f_{\text{apl.}} = 110 \text{ kHz}, H_{\text{apl.}} = 140 \text{ Oe}$$



— $\text{Mg}_{0.13-\gamma}\text{Fe}_2\text{O}_3$
 — Resovist

FIG. 18

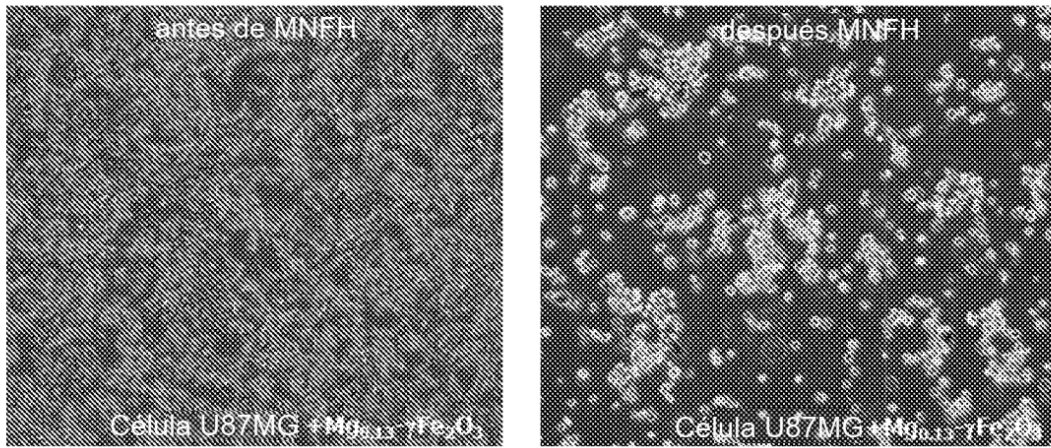


FIG. 19

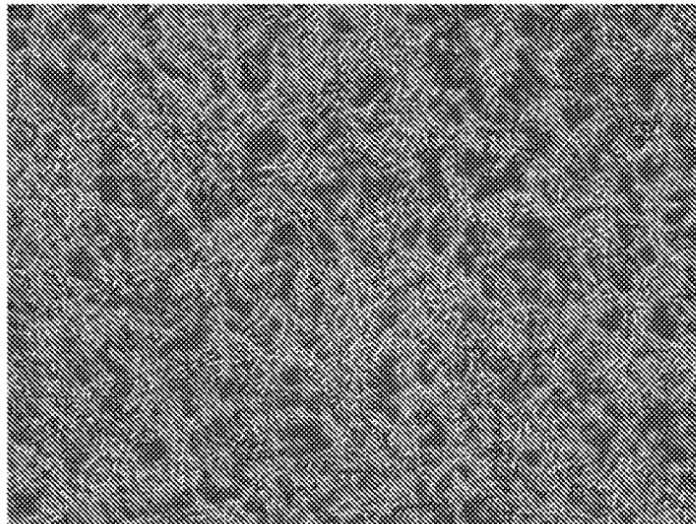


FIG. 20

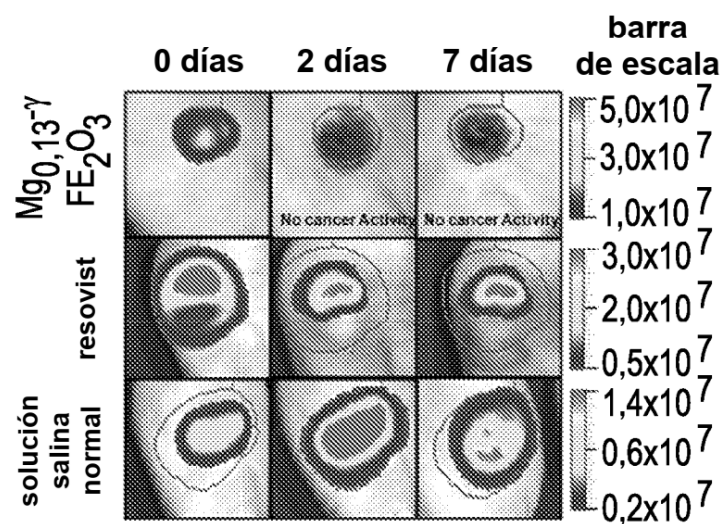
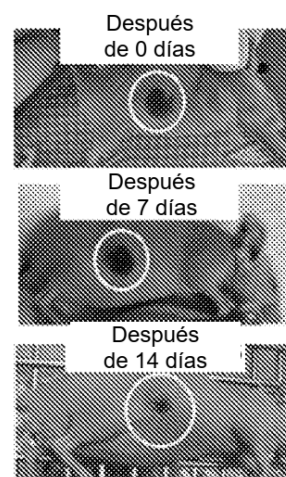
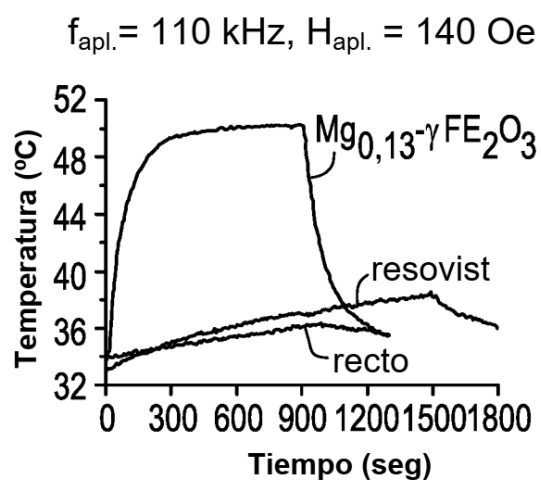
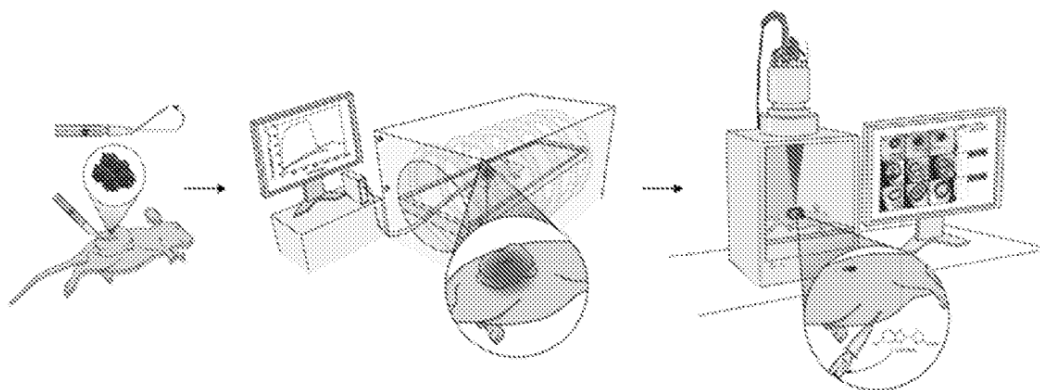


FIG. 21

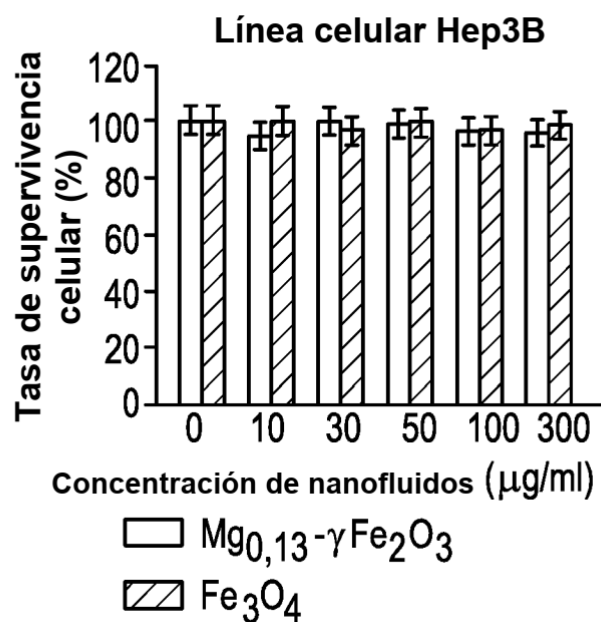
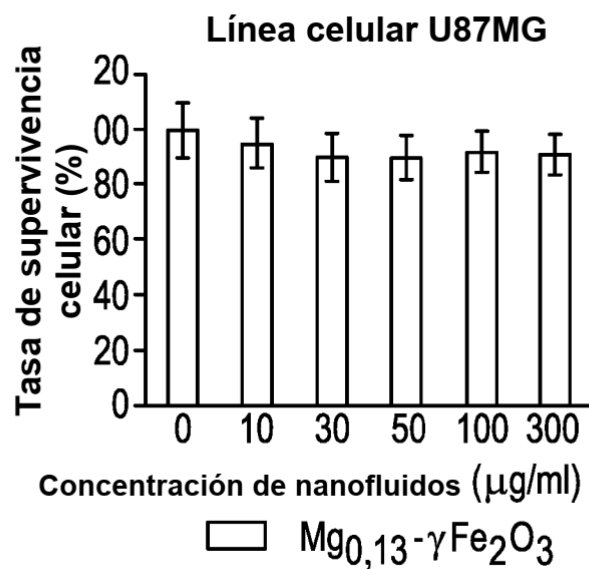


FIG. 22

