



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0610220-4 A2**

(22) Data de Depósito: 12/04/2006
(43) Data da Publicação: 25/09/2012
(RPI 2177)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 47/48
A61K 9/14

(54) Título: NANOPARTÍCULA, SOLUÇÃO DE INFUSÃO, USO DE NANOPARTÍCULAS

(30) Prioridade Unionista: 12/04/2005 DE 102005016873.6, 27/04/2005 US 60/675.100

(73) Titular(es): MAGFORCE NANOTECHNOLOGIES AG

(72) Inventor(es): ANDREAS JORDAN, KLAUS DECKEN, NORBERTO WALDOEFNER, REGINA SCHOLZ

(74) Procurador(es): Bhering Advogados

(86) Pedido Internacional: PCT DE2006000653 de 12/04/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/108405de 19/10/2006

(57) Resumo: NANOPARTÍCULA, SOLUÇÃO DE INFUSÃO, USO DE NANOPARTÍCULAS. A presente invenção relaciona-se a nanopartículas, nas quais pelo menos uma substância terapeuticamente ativa é ligada à referida nanopartícula e na qual a separação de pelo menos uma substância terapeuticamente ativa da nanopartícula é causada ou iniciada por um campo magnético alternado. Além disso, a presente invenção relaciona-se a composições farmacêuticas, em particular a soluções injetáveis contendo nanopartículas assim como ao uso também para o tratamento de câncer.

NANOPARTÍCULA, SOLUÇÃO DE INFUSÃO, USO DE NANOPARTÍCULAS
DESCRIÇÃO

A presente invenção refere-se a nanopartículas as quais substâncias terapeuticamente ativas são ligadas, como a
5 liberação de substâncias terapeuticamente ativas é causada, iniciada ou substancialmente aumentada por um campo magnético alternado.

É sabido que nanopartículas superparamagnéticas podem ser usadas como excipientes no tratamento de doenças. No
10 contexto, vários caminhos são seguidos. Uma estratégia conhecida é, por exemplo, baseada no chamado "ponto de referência de droga magnético", no qual tentativas são feitas para verificar um aumento local na concentração de
15 ingredientes ativos por meio de um campo magnético (DE 10059151 A, Alexiou). Similarmente, tentativas são feitas para transportar quimicamente propriedades alvo encontradas para as partículas verificarem um acúmulo das referidas partículas em regiões do corpo (DE 4428851 A1, EP 0516252 A2). Partículas de múltiplos invólucros para a infiltração de
20 células tumorosas com conjugados consistindo na partícula e no ingrediente ativo são descritos na patente WO 98/58673 (INM).

A presente invenção tem por objetivo carregar nanopartículas com substâncias terapeuticamente ativas de
25 modo que nenhuma liberação notável de substâncias terapeuticamente ativas ocorra no tecido saudável e que uma liberação controlada da substância terapeuticamente ativa possa acontecer uma vez que as nanopartículas tenham entrado no tecido tumoral e nas células tumorosas.

30 O referido objetivo é alcançado pelas nanopartículas, assim como pela composição farmacêutica, e pelo uso das referidas nanopartículas.

Modalidades vantajosas adicionais resultam das reivindicações subordinadas, dos exemplos e da descrição.

35 A presente invenção se relaciona a nanopartículas, nas quais substâncias terapeuticamente ativas são ligadas às

referidas nanopartículas e nas quais a separação de substâncias terapeuticamente ativas das nanopartículas é causada, iniciada ou substancialmente aumentada por um campo magnético alternado. Neste contexto, pelo menos uma substância terapeuticamente ativa é liberada por meio da influência direta do campo magnético alternado ou devido ao aquecimento local causado pelo campo magnético alternado. Preferivelmente, a liberação é causada pelo fato de que um ligador instável termicamente entre o ingrediente ativo, isto é, a substância terapeuticamente ativa e a nanopartícula é termicamente clivada e/ou que um ligador é usado que é instável em relação a um campo magnético alternado. Portanto, a presente invenção consiste na união de uma substância terapeuticamente ativa, em particular uma citostática, a uma nanopartícula por meio de um ligador que pode ser unido termicamente e/ou por meio de um campo magnético.

As nanopartículas de acordo com a invenção são caracterizadas pelo fato de que pelo menos uma substância terapeuticamente ativa é ligada à nanopartícula e na qual a separação de pelo menos uma substância terapeuticamente ativa da nanopartícula é causada ou iniciada ou substancialmente aumentada pelo campo magnético alternado.

Em outras palavras, a presente invenção se relaciona a nanopartículas, nas quais pelo menos uma substância terapeuticamente ativa é ligada ionicamente ou covalentemente ou ligada por ligadores de hidrogênio ou por complexação (elo complexo) ou por intercalação ou por interações lipofílicas por meio de um ligador e o ligador pode ser unido devido à iniciação térmica ou a iniciação por um campo magnético ou eletromagnético respectivamente.

A clivagem iniciada termicamente significa que um aquecimento local sob condições fisiológicas a uma temperatura de mais de 45°C, preferivelmente mais de 50°C, é suficiente para clivar o ligador. A clivagem iniciada por um campo magnético ou eletromagnético respectivamente significa que a aplicação de um campo magnético ou eletromagnético

respectivamente sob condições fisiológicas faz o ligador ser clivado, ou somente pelo campo magnético ou eletromagnético respectivamente e/ou uma redução de PH local induzida pelo campo magnético ou eletromagnético respectivamente.

5 Pelo menos uma substância terapeuticamente ativa, isto é, molécula de pelo menos uma classe de substâncias terapeuticamente ativas ou um ingrediente ativo particular é de preferência ligado por meio de um ligador covalente ou predominantemente covalente e/ou um ligador iônico
10 suficientemente forte, compostos clatratos ou complexação (elos complexos) ou respectivamente por meio de uma disposição de um número suficiente de ligadores de hidrogênio ou interações hidrofóbicas para que uma liberação descontrolada de substância terapeuticamente ativa possa ser
15 substancialmente evitada. A liberação descontrolada descreve a separação da substância terapeuticamente ativa no tecido saudável, particularmente separação sem um campo magnético alternado estar ativo.

 Tal liberação descontrolada resulta na liberação de
20 substâncias terapeuticamente ativas em áreas onde elas são mais prováveis de causar efeitos colaterais danosos do que efeitos terapêuticos, que está fora do tecido carcinogênico ou respectivamente fora das células tumorosas.

 Assim, as substâncias terapeuticamente ativas continuam
25 ligadas fixamente às nanopartículas e são transportadas para a célula cancerosa junto com a nanopartícula. Enquanto as nanopartículas são transportadas para as células cancerosas, somente quantidades menores e até insignificantes de substâncias terapeuticamente ativas são liberadas. Logo que
30 chegam às células cancerosas, as substâncias terapeuticamente ativas são liberadas por meio de um campo magnético alternado, particularmente por meio de um campo magnético alternado exterior ou respectivamente um campo magnético alternado aplicado do lado de fora (impulso).

35 Neste contexto, "causado ou iniciado por um campo magnético alternado" significa que a liberação ou separação

respectivamente é causada diretamente por um campo magnético alternado ou respectivamente os impulsos ou indiretamente, por exemplo, pela ativação ou respectiva indução de expressão de genes de enzimas ou pela geração de calor.

5 As nanopartículas consistem em um material magnético, preferivelmente material ferromagnético, antiferromagnético, ferrimagnético, antiferrimagnético ou superparamagnético, adicionalmente preferido de óxidos de ferro, particularmente de óxidos de ferro superparamagnéticos ou de ferro puro
10 provido com uma camada de óxido. As nanopartículas podem ser aquecidas por um campo magnético alternado. O tecido contendo as nanopartículas pode ser aquecido a uma temperatura de mais de 50°C. Temperaturas tão altas podem ser alcançadas devido ao fato de que até 800 pg e mais de ferro em forma de
15 nanopartículas podem ser absorvidas pela célula tumoral.

Preferivelmente, as nanopartículas consistem em óxidos de ferro e particularmente magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ou misturas dos dois referidos óxidos. Em geral, as nanopartículas preferidas são representadas pela fórmula FeO_x
20 na qual X é um número de 1 a 2. Preferivelmente, as nanopartículas têm um diâmetro de menos de 500 nm. Preferivelmente, as nanopartículas têm um diâmetro médio de 15 nm ou estão compreendidas na faixa de 1-100 nm e particularmente preferido, compreendidas na faixa de 10-20
25 nm.

Em acréscimo aos materiais magnéticos da fórmula FeO_x , na qual X é um número compreendido na faixa de 1.0 a 2.0, materiais da fórmula geral MFe_2O_4 com $\text{M} = \text{Co}, \text{Ni}, \text{Mn}, \text{Zn}, \text{Cd}, \text{Ba}$ ou outras ferritas podem ser usados de acordo com a
30 invenção. Além do mais, sílica ou partículas de polímero, nos quais materiais magnéticos, tais como os materiais magnéticos mencionados na presente invenção são incorporados e/ou aos quais tais materiais estão ligados também são adequados.

Substâncias terapeuticamente ativas são ligadas às
35 referidas nanopartículas, em particular a nanopartículas superparamagnéticas, nas quais um ligador covalente é

preferido. Substâncias terapeuticamente ativas que podem ser selecionadas incluem agentes antiproliferativos, antimigratórios, antiangiogênicos, antitrombóticos, antiinflamatórios, antiflogísticos, citostáticos, citotóxicos, anticoagulantes, antibacterianos, antivirais e/ou antimicóticos, nos quais substâncias antiproliferativas, antimigratórias, antiangiogênicas, citostáticas e/ou citotóxicas assim como ácidos nucleicos, aminoácidos, peptídeos, proteínas, carboidratos, lipídios, glicoproteínas, glicanos ou lipoproteínas tendo propriedades antiproliferativas, antimigratórias, antiangiogênicas, antitrombóticas, antiinflamatórias, antiflogísticas, citostáticas, citotóxicas, anticoagulantes, antibacterianas, antivirais, e/ou antimicóticas são preferidas. Além do mais, tais substâncias podem ser também radiosensibilizadoras ou sensibilizadoras ou amplificadoras de outros métodos de tratamento de câncer convencionais combinados ou conter tais sensibilizadores.

Como compostos citostáticos e/ou citotóxicos, isto é, compostos químicos tendo propriedades citostáticas e/ou citotóxicas os seguintes podem ser usados: agentes alquilantes, antibióticos tendo propriedades citostáticas, antimetabólitos, inibidores de microtúbulos e inibidores de topoisomerase, compostos contendo platina e outros citostáticos tais como, por exemplo, asparaginase, tretinoína, alcalóides, podofilotoxinas, taxanos e miltefosina, hormônios, imunomoduladores, anticorpos monoclonais, transdutores de sinal (moléculas para transdução de sinal) e citoquinas.

Exemplos de agentes alquilantes incluem entre outros: cloretamina, ciclofosfamida, trofosfamida, ifosfamida, melfalan, clorambucil, busulfan, tiotepa, carmustina, lomustina, decarbazina, procarbazina, temozolomida, treosulfan, estramustina, e nimustina.

Exemplos de antibióticos tendo propriedades citostáticas incluem daunorubicina, doxorubicina (adriamicina),

dactomicina, mitomicina C, bleomicina, epirubicina (4-epi-adriamicina), idarubicina, mitoxantrone, amsacrina e actinomicina D.

5 Metotrexato, 5-fluorouracil, 6-mercaptapurina, fludarabina, cladribina, pentostatina, gemcitabina, citarabina, azatioprina, raltitrexed, capecitabina, citocina arabinosida, tioguanina e mercaptopurina podem ser mencionados como exemplos de antimetabólitos (agentes antimetabólicos).

10 Vincristina, vinblastina, vindecina, etoposide assim como teniposide são contados entre a classe de alcalóides e podofilotoxinas. Além do mais, compostos contendo platina podem ser usados de acordo com a invenção. Cisplatina, carboplatina e oxaliplatina são exemplos de compostos
15 contendo platina. Entre os inibidores de microtúbulos são contados, por exemplo, alcalóides tais como alcalóides vinca (vincristina, vinblastina, vinorelbina) e paclitaxel (taxol®) assim como derivados de paclitaxel. Exemplos de inibidores de topoisomerase incluem etoposide, tenoposide, camptotecina,
20 topotecan e irinotecan.

Paclitaxel e docetaxel são exemplos para a classe composta de taxanos e entre as outras substâncias citostáticas (outros citostáticos) são contadas por exemplo hidroxicarbamida (hidroxi uréia), imanitiba, miltefosine®,
25 amsacrina, topotecan (inibidor de topoisomerase-1), pentostatina, bexarotene, biolimus A9, rapamicina (sirolimus), rodomicina D, ametantrone, bendamustina, oxazafosforina, 5-desóxi-5 fluorouridina, 9-aminocamptotecina, derivados de podofilotoxina, mitopodozide, alcalóides vinca,
30 calicaemicina, maitansinóides, tretinoína e asparaginase. Representantes da classe composta de anticorpos monoclonais são entre outros trastuzumab (também conhecido como Herceptin®), alemtuzumab (também conhecido como Mabcampath®) erituximab (também conhecido como Mabthera®).

35 De acordo com a invenção, hormônios tais como, por exemplo, glicocorticóides (prednisona), estrogênios

(fosfestrol, estramustina), LHRH (buserelin, goserelin, leuproterin, triptorelin), flutamida, ciproterona, acetato, tamoxifeno, toremifen, aminoglutetimida, formestane, exemestane, letrozol e anastrozol podem também ser usados.

5 Entre as classes de imunomoduladores, citoquinas, anticorpos e transdutores de sinal são contados interleucina-2, interferon- α , eritropoeietina, G-CSF, trastuzumab (Herceptin®), rituximab (Mabthera®), gefitinib (Iressa®), ibritumomab (Zevalin®), levamisol assim como retinóides.

10 Preferivelmente as substâncias mencionadas anteriormente são ligadas covalentemente às nanopartículas. As substâncias podem, por exemplo, ser ligadas por grupos hidroxílicos, grupos aminados, grupos carbonil, grupos tiol ou grupos carboxil, dependendo dos grupos funcionais que a substância
15 respectiva está carregando. Assim, doxorubicina pode, por exemplo, ser ligado por meio de seus grupos hidroxílicos primários em forma de um éster; derivados de platina (cisplatina, carboplatina, oxaliplatina, etc.) podem ser acoplados a um grupo aminado por meio de substituição
20 nucleofílica na platina, ou paclitaxel pode ser ligado por meio de uma ligação imina.

Grupos hidroxílicos são preferivelmente ligados como éster, acetal, cetel; grupos tiol são preferivelmente ligados como tioéster, tioacetal ou tiocetal; grupos aminados são
25 preferivelmente ligados como amidas e parcialmente como iminas (bases Schiff) ou como uretano pela reação com um grupo isocianato; grupos carboxil são preferivelmente ligados como ésteres ou amidas e grupos carbonil são preferivelmente ligados como acetais ou cetais respectivamente.

30 A preparação de nanopartículas sem ingrediente ativo e sem cobertura é descrita em detalhes na DE4428851 A. Além do mais, a funcionalização da superfície das nanopartículas é conhecida, para que grupos aminados, grupos hidroxílicos, grupos carboxil ou grupos carbonil possam ser gerados na
35 superfície das nanopartículas usando procedimentos conhecidos.

Portanto, a presente invenção refere-se às nanopartículas tendo uma pluralidade de grupos aminados, grupos hidroxílicos, grupos carboxil ou grupos carbonil em suas superfícies e nas quais ligadores são ligados a pelo menos uma parte do referido grupo funcional por meio de uma ligação imina, ligação amina, ligação éster, ligação amida ou ligação cetel e além do mais os referidos ligadores aglutinam a substância terapeuticamente ativa em um modo lipofílico, complexado, iônico, covalente ou por meio de ligações de hidrogênio.

Uma característica particular de uma modalidade preferida das nanopartículas da invenção consiste nos ingredientes ativos serem ligados às nanopartículas magnéticas por meio de tipos especiais de ligações. As referidas ligações são construídas de modo que uma liberação dos ingredientes ativos possa ser estimulada por meio de um campo magnético alternado exterior (impulso).

Um campo magnético alternado atua como estímulo externo que no caso de partículas superparamagnéticas dispara vários processos de relaxamento das partículas. Entre outros, os referidos processos resultam em um aquecimento das partículas e a sua volta. De acordo com a invenção, os referidos processos desencadeados pelo campo magnético alternado são usados para clivar a ligação entre a nanopartícula e a substância terapeuticamente ativa ou para acelerar fortemente o processo de clivagem. Neste contexto, o índice de clivagem por processos biológicos (por exemplo, clivagem enzimática) pode ser fortemente aumentado pelo impulso, para que o aumento em concentração do ingrediente ativo no destino possa somente ser alcançado assim que o impulso tenha sido aplicado. Similarmente, a ligação pode ser construída de modo que uma clivagem por reações químicas (por exemplo, hidrólises) é desencadeada ou significantemente acelerada. Além disso, o aquecimento induzido pelo campo magnético pode causar a fusão de uma molécula de ácido nucléico ou uma molécula de polipeptídeo usada como um ligador.

As substâncias terapeuticamente ativas são ligadas diretamente ou por meio de uma molécula ligadora. A molécula ligadora é preferivelmente ligada as nanopartículas ou a nanopartícula respectiva por meio de uma ligação amida ou uma
5 ligação éster.

De acordo com a invenção, também é possível que ácidos nucleicos (ácidos desoxirribonucleicos (DNA), ácido ribonucleico (RNA) ou ácidos nucleicos peptídeos (PNA) ou polipeptídeos de vários comprimentos possam ser usados como
10 ligadores. As moléculas necessárias podem opcionalmente ser produzidas geneticamente ou sinteticamente. Os ligadores podem ser clivados de um modo ácido induzido, magneticamente induzido ou termicamente induzido sob condições fisiológicas.

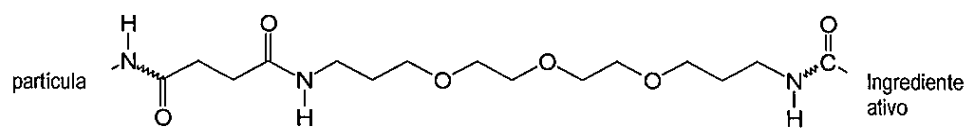
A clivagem de um ligador significa que o ligador contém
15 pelo menos uma ligação dentro do ligador, o qual pode ser clivado sob condições fisiológicas devido ao impacto do calor, a influência de um campo magnético, isto é, de um impulso magnético ou devido a uma exposição a ácido. Devido a exposição ao calor (preferivelmente pelo menos 45°C) e/ou ao campo magnético e/ou ao ácido a referida ligação deveria ser clivada pelo menos duas vezes mais rápido sob condições fisiológicas do que no caso de tal exposição não ser proporcionada. A formação de ácido e a redução do PH local podem por exemplo ser causadas pelas células já mortas. A
20 expressão "elo dentro do ligador" também compreende a ligação do ligador a nanopartícula assim como a ligação do ligador a substância terapeuticamente ativa. Além disso, o ligador pode também ser composto de duas ou três moléculas ligadoras.

Para garantir a clivabilidade requerida, os ligadores
30 têm pelo menos um dos seguintes grupos funcionais:

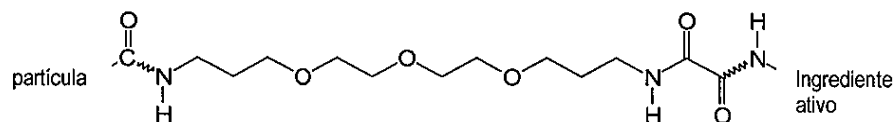
-S-S-, -O-P(=O)(O)-O-, -CO-CO-, -NH-CO-CO-NH-, -C=N-C, cetais,

-CO-NH-N=C-, trióxido silanos (-O-)(-O-)(-O-)Si-C ou acetais.

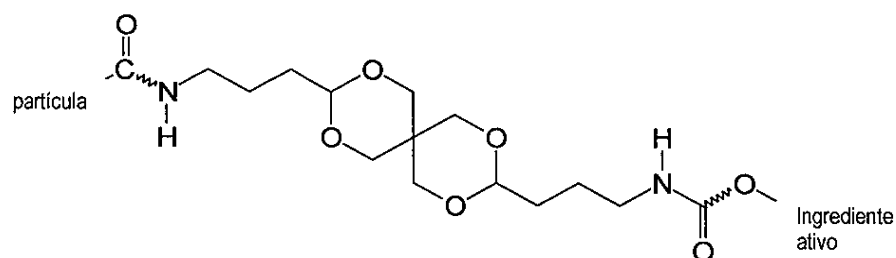
35 Por exemplo, ligadores adequados podem ter a seguinte forma:



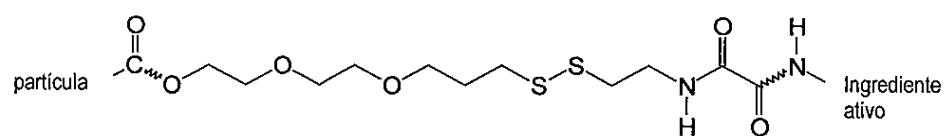
5



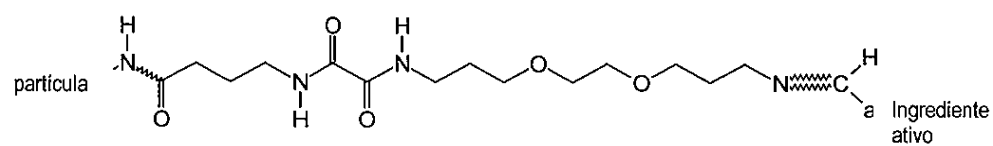
10



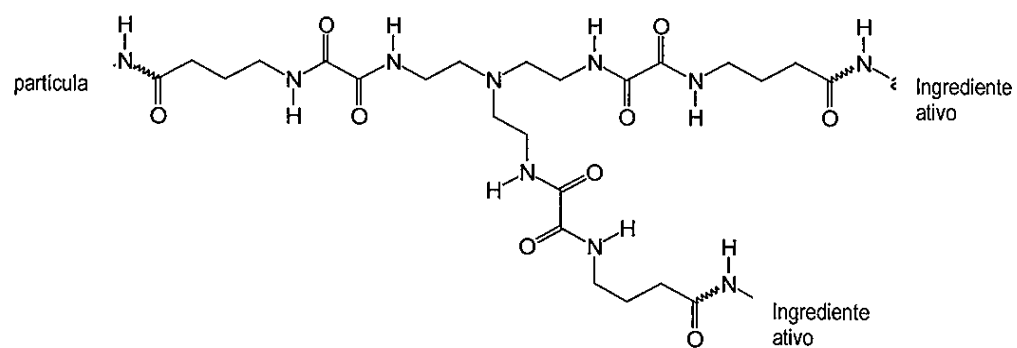
15



20

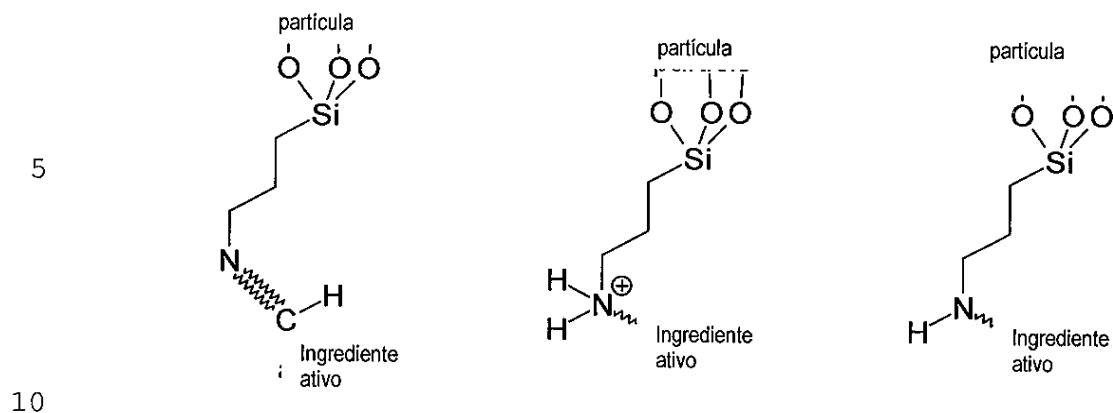


25



30

35



A linha em zigue-zague indica a ligação entre o ingrediente ativo e o ligador ou respectivamente entre o ligador e a nanopartícula.

15 Ácidos nucleicos preferidos são tais construções, preferivelmente estruturas de fita dupla, tendo um ponto de fusão dentro da variação de 40 a 60°C. Quando o DNA, RNA ou PNA de fita dupla é usado, uma fita dispõe de um grupo capaz de acoplar à partícula (por exemplo, um grupo amina ou

20 carbóxi acoplado via um grupo fosforamidato). A fita complementar pode, por exemplo, carregar o ingrediente ativo que é também acoplado via uma ligação covalente. Devido ao pareamento base entre as fitas, o ingrediente ativo é também acoplado às partículas. O ingrediente ativo somente pode ser

25 liberado quando a hélice dupla é derretida e aberta devido à geração de calor no campo magnético alternado. Neste processo, as fitas únicas são separadas e a substância ativa é desacoplada da partícula. O ponto de fusão e a degradação do ligador podem ser controlados pela seleção de homo-

30 híbridos ou hetero-híbridos correspondentes de DNA-DNA, DNA-RNA, DNA-PNA, RNA-RNA, RNA-PNA ou PNA-PNA.

Polipeptídeos preferidos são tais moléculas que tendem a formar definidos homo-dímeros ou heterodímeros, particularmente via ligações de hidrogênio (tais como, por

35 exemplo, no âmbito da imunoglobulina) ou via interações hidrofóbicas (tais como, por exemplo nos chamados zíperes de

leucina). Nos referidos casos também, tais pares tendo um ponto de fusão dentro da variação de 40 a 60°C e que portanto estão predominantemente presentes no estado emparelhado sob condições fisiológicas mas que não se desintegram dentro de
5 seus monômeros a temperaturas alcançáveis terapeuticamente são usados. Para o referido propósito, um parceiro de ligação é acoplado covalentemente a nanopartícula e o outro é covalentemente acoplado a uma substância terapeuticamente ativa. Quando a ligação entre as duas fitas de peptídeos
10 é fundida nanopartículas são desacopladas e substâncias terapeuticamente ativas que depois, possivelmente somente após a clivagem tal como a clivagem enzimática, estão presentes em formas difusíveis livremente.

Similarmente, interações entre polipeptídeo e ácido
15 nucléico podem ser usadas em um ligador correspondente. Para o referido propósito, polipeptídeos interagindo em uma maneira não covalente com ácidos nucléicos e capazes de ligar ácidos nucléicos são acoplados às nanopartículas. As referidas interações podem também ser fundidas pelo impacto
20 do calor, para que a ligação de ácido nucléico seja liberada em acréscimo a molécula de órgão motor acoplada. Às vezes até mesmo o ácido nucléico liberado pode atuar como uma molécula de órgão motor (por exemplo, siRNA, DNA anti-sentido, etc). Polipeptídeos potenciais ligando ácidos nucléicos são em
25 particular dedos de zinco tendo um comprimento entre 20 e 50 aminoácidos, mas também o freqüente motivo hélice-volta-hélice do âmbito de ligações de DNA pode ser usado ou a "proteína de ligação de uma fita única" (SSB) para ligações de DNA (uma pequena proteína tendo um âmbito de ligação de
30 DNA de cerca de 100 aminoácidos) ou respectivamente o motivo de reconhecimento RNA (RRM ou respectivamente RNP-1) de proteínas de ligação RNA de fita única (medindo cerca de 90 aminoácidos) ou o motivo de ligação RNA de fita dupla (DRBM) de proteínas de ligação RNA de fita dupla (medindo cerca de
35 65 aminoácidos).

Uma outra variação consiste em usar a ligação de

ligandos de baixo peso molecular pelos ácidos nucleicos (aptâmeros) ou respectivamente proteínas em um sistema ligador. Geralmente, todas as moléculas podem ser usadas, por exemplo pela produção de anticorpos contra o chamado "hapteno" (por exemplo anticorpos contra dinitrofenol, trinitrofenol, digoxigenina, digoxina, biotina são freqüentemente usados). Em particular, sacos de ligação de biomoléculas, tais como para coenzimas (tais como coenzima A, ATP, GTP, FAD, NADH, NADPH, biotina, ácido fólico, piridoxal fosfato, etc.), substratos (tais como a glutathione ligando o sítio de glutathione-S-transferase GST compreendendo 73 aminoácidos) ou hormônios (tais como o hormônio ligando o âmbito dos receptores de hormônio nuclear para androgênios, estrogênios, ácido retinóico, tiroxina, vitamina D3 medindo de 218 a 252 aminoácidos) são também praticáveis. Uma das interações mais freqüentemente usadas e simultaneamente a ligação não-covalente mais fortemente conhecido é o da biotina para avidina ou respectivamente streptavidina. Devido a alta ligação de avidina, pode ser melhor usar avidina modificada ou respectivamente análogos de biotina (por exemplo, destibiotina ou iminobiotina) com uma ligação menos forte, para realizar a fusão com uma variação de temperaturas que podem ser alcançadas tecnicamente. Em todos os casos, faz sentido acoplar a ligando micromolecular à molécula órgão motora e acoplar a ligando macromolecular às nanopartículas; entretanto, dependendo da escolha de ligando, a preparação inversa pode ser vantajosa.

Nesta modalidade preferida, os únicos métodos de acoplamento considerados são métodos gerando uma ligação entre a nanopartícula e o ingrediente ativo, no qual a referida ligação é suficientemente estável sob condições fisiológicas normais, mas consideravelmente menos estáveis sob as condições (impulso) usadas de acordo com a invenção. O mecanismo de liberação por si e conseqüentemente também o tipo de ligação dependem do alvo (por exemplo, tumor no caso de cânceres) e têm que ser ajustáveis por meio de métodos de

acoplagem química convencionais. Similarmente, a liberação pode ocorrer intracelularmente (por exemplo, em células tumorosas) ou extracelularmente. As partículas produzidas de acordo com a invenção diferem das carreiras conhecidas de ingredientes ativos pelo fato de que a eficiência somente pode ser alcançada pela ativação do campo magnético alternado, enquanto sem o referido impulso o ingrediente ativo permanece amplamente ineficiente.

De acordo com a invenção a conjugação de nanopartícula/ingrediente ativo está preferivelmente baseada em cores magnéticas contendo ferro; as referidas cores são circundadas por um ou mais revestimentos ou coberturas coloidais que permitem que os ingredientes ativos sejam acoplados a esse lugar por meio de grupos funcionais. O núcleo consiste preferivelmente de magnetita e maguemita. A função primária dos revestimentos consiste em realizar uma distribuição coloidal no meio aquoso e em proteger as nanopartículas de aglomerações. Em princípio, partículas com vários revestimentos, são descritas em WO 98/58673 como uma base adequada para conjugação de nanopartícula/ingrediente ativo que pode ser ativada, desde que o comportamento biológico de tais partículas possa ser ajustado por meio de coberturas com polímeros e desde que os ingredientes ativos possam ser acoplados aos grupos funcionais de revestimento primário.

Os ingredientes ativos podem ser acoplados aos revestimentos primários usando métodos diferentes. No evento em que os núcleos de partículas são estabilizados por amino silanos ou por um revestimento ou cobertura respectivamente carregando um grupo amino, os ingredientes ativos podem, por exemplo ser acoplados a um grupo amino localizado junto à superfície. Neste contexto, o acoplamento pode ser realizado por meio de, por exemplo, ésteres de succinimidil, ésteres de sulfosuccinimidil, isotiocianatos, cloretos de triazinil, cloretos de sulfonil, ésteres de tetrafluorofenil ou também por meio de grupos aldeídos. Para este propósito, o

ingrediente ativo tem que ser capaz de ser acoplado a tais grupos por um método químico. Se o ingrediente ativo não pode ser acoplado diretamente usando os referidos métodos, uma molécula ligadora pode ser empregada. A referida ligadora conecta o ingrediente ativo com os grupos funcionais de cobertura de proteção e assim melhora a variabilidade em relação as diferentes possibilidades de acoplamento. Portanto, é preferível que a molécula ligadora contenha um grupo que seja termoinstável, eletromagneticamente instável, fotoinstável, ácido-instável, intercalada ou pode ser intercalada ou clivada por clivagem enzimática. Além do mais, o mecanismo de liberação também pode ser controlado por meio do ligador. Assim, o ligador pode também introduzir grupos que permitem que os ingredientes ativos sejam clivados. Grupos potenciais incluem, por exemplo, grupos imina, hidrazona, éster, ou acetal, cliváveis. Similarmente seqüências peptídicas são adequadas para o uso como tais ligadores nos quais o ingrediente ativo somente é liberado após uma clivagem enzimática ou subsequente à fusão de uma ligação não-covalente. Além do mais, moléculas de DNA, RNA e PNA podem ser usadas como, preferivelmente, ligadoras de fita dupla, nas quais a liberação ocorre pela fusão de fitas duplas induzida termicamente.

De acordo com a invenção, somente tais ligadores podem ser usados que não causam nenhuma ou somente lentas taxas de clivagem sob condições fisiológicas normais. As moléculas ligadoras podem, por exemplo, ser construídas de tal modo que, embora uma liberação na região alvo (por exemplo, liberação enzimática na célula tumoral) seja possível, a referida liberação é tão lenta sob condições normais que é impossível alcançar uma concentração terapêutica do ingrediente ativo. A clivagem da molécula ligadora ou respectivamente clivagem da molécula ligadora em alta velocidade suficiente é somente causada como uma consequência do impulso externo pelo campo magnético alternado e resulta na ativação do ingrediente ativo. Preferivelmente, este

objetivo é realizado pelo fato de que tal conformação permitindo clivagem enzimática dos ligadores somente é alcançada uma vez que uma fusão induzida termicamente do ácido nucléico com fitas duplas ou respectivamente fitas
5 múltiplas ou alternativamente de dímeros peptídeos ou respectivamente oligômeros peptídeos, tenha ocorrido.

Partículas estabilizadas por vários grupos funcionais (por exemplo, carbóxi, epóxi e aldeído) podem ser tratadas do mesmo modo que partículas estabilizadas pelo amino silano. É
10 crucial que o método de acoplamento seja selecionado de modo que uma liberação somente possa acontecer sob as condições mencionadas acima. Similarmente, um ingrediente ativo pode ser acoplado a um alcóxi silano que tenha sido funcionalizado com os grupos acima mencionados (veja exemplo 1), nos quais
15 em uma etapa subsequente o referido conjugado é acoplado ao revestimento protetor de partículas que já tenham sido estabilizadas por silanos. O acoplamento não é limitado a ligações covalentes. De acordo com a invenção também é possível gerar interações iônicas tendo estabilidade
20 suficiente.

Cobertura adicional do conjugado nanopartícula/ingrediente ativo que pode ser ativado (por exemplo, com polímeros) como descrito na especificação da patente número WO 98/58673 também é possível e pode ser usada
25 para melhorar as características biológicas do conjugado partícula/ingrediente ativo. Similarmente outras moléculas conduzindo propriedades de encontro do alvo para a elaboração completa podem ser acopladas (por exemplo, anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais, anticorpos humanizados,
30 anticorpos humanos, anticorpos quiméricos, anticorpos recombinantes, anticorpos biespecíficos, fragmentos de anticorpos, aptâmeros, fragmentos Fab, fragmentos Fc, peptídeos, peptidomiméticas, gap-mers, ribozimas, oligômeros CpG, DNA-zimas, riboswitches ou lipídios. Para realizar este
35 objetivo, as modificações adicionais não devem interferir com a liberação (que pode ser ativada) do ingrediente ativo no

alvo.

Assim, várias moléculas tendo até 500 átomos de carbono ou de 10 a 30 pares de base, preferivelmente de 15 a 25 pares de base ou de 10 a 30 aminoácidos, preferivelmente de 15 a 25 aminoácidos podem servir de ligadores, desde que o ligador contenha um grupo que possa ser clivado enzimaticamente, fotoquimicamente ou termicamente, um grupo ácido-instável ou qualquer outro grupo que possa ser facilmente desligado. Portanto, uma ligação dentro da molécula ligadora e/ou a ligação do ligador ao ingrediente ativo e/ou a ligação do ligador a superfície da nanopartícula tem que ser clivável diretamente pela ação do campo magnético alternado ou clivável indiretamente. Clivagem indireta significa que enzimas tais como peptidases, esterases ou hidrolases são estimuladas no alvo, por exemplo, na célula cancerosa, por exemplo, por meio do campo magnético alternado ou aquele de suas atividades ou expressão é aumentado e as referidas enzimas são capazes de realizar a clivagem mencionada anteriormente. Além disso, a clivagem indireta pode ocorrer quando nanopartículas magnéticas são usadas, se as referidas partículas são aquecidas pelo campo magnético alternado, levando a clivagem de uma ligação termicamente instável. Também, o aumento do pH no alvo pela ação do campo magnético alternado e a subsequente clivagem de ligações ácido-instáveis dentro da molécula ligadora devem ser considerados.

O grupo éster e a amida ou respectivamente o grupo peptídeo são parte dos grupos cliváveis enzimaticamente dentro ou na molécula ligadora. Grupos que podem ser clivados termicamente ou por meio de um ácido compreendem, por exemplo, grupos fosfato, grupos tiofosfato, grupos sulfato, grupos fosfamida, grupos carbamato ou grupos imina.

O ingrediente ativo não tem necessariamente que ser ligado covalentemente ao ligador; em vez disso, ele pode também ser ligado ionicamente ou por meio de ligações de hidrogênio ou pode estar presente em uma forma complexada ou intercalada.

Além do mais, também é possível ligar de forma adsorável os ingredientes ativos a superfície das nanopartículas e cobri-las com uma camada barreira que, numa ampla escala, previne a liberação do ingrediente ativo até
5 que a camada barreira tenha sido modificada, particularmente desintegrada, pela ação de um campo magnético alternado tal que o ingrediente ativo possa ser liberado.

Em outras modalidades preferidas as nanopartículas da invenção estão circundadas ou respectivamente cobertas por um
10 ou mais revestimentos ou coberturas. Os referidos revestimentos ou coberturas podem ter uma ou mais funções e podem servir como revestimento protetor, camada barreira ou cobertura seletiva de célula.

No caso em que a ligação das substâncias
15 terapeuticamente ativas com as nanopartículas é fraca, por exemplo, no caso de uma ligação não-covalente, iônica, adsorável, lipofílica e/ou de van der Waals e/ou uma conexão por meio de ligações de hidrogênio, um revestimento protetor ou cobertura barreira podem prevenir a liberação de
20 substâncias terapeuticamente ativas até que as nanopartículas tenham atingido seu destino. Uma camada exterior carregando funcionalidades específicas da célula pode ser aplicada ao revestimento protetor ou cobertura barreira em vez do referido revestimento protetor ou cobertura barreira ou como
25 uma camada adicional sobre este revestimento protetor ou cobertura barreira.

A referida cobertura específica de célula aumenta a afinidade das nanopartículas com certas células, por exemplo, com certas células bacterianas ou com certas células
30 tumorosas; conseqüentemente, ela serve para a discriminação celular. Tais nanopartículas específicas de célula acumulam-se preferivelmente nas células, para as quais suas afinidades são aumentadas devido a funcionalidade sobre suas superfícies; conseqüentemente tais nanopartículas são
35 específicas de tumor. Graças a esta tecnologia, nanopartículas específicas de tumor, por exemplo, para certos

tipos de câncer podem ser desenvolvidas.

Além do mais, as nanopartículas podem também ser estabilizadas por um revestimento protetor coloidal evitando que as nanopartículas se aglomerem. Preferivelmente, tais
 5 revestimentos protetores ou coberturas são providos com grupos amino ou grupos carbóxi. Polímeros biológicos, sintéticos ou semi-sintéticos podem ser usados para revestimentos protetores ou coberturas respectivamente. Polímeros, preferivelmente polímeros bioestáveis, isto é,
 10 polímeros que são amplamente resistentes à degradação biológica são tipicamente usados para gerar uma camada barreira. Para a geração de revestimentos específicos de célula ou coberturas respectivamente, é preferível usar polímeros biodegradáveis.

15 Os seguintes polímeros podem ser usados como polímeros bioestáveis: ácido poliacrílico e poliacrilatos tais como polimetil metacrilato, polibutil metacrilato, poliacrilamida, poliacrilonitrilas, poliamidas, polieteramidas, amina polietileno, poliimidas, policarbonatos, policarburetanos,
 20 cetonas de polivinil, halóides de polivinil, halóides de polivinilideno, éteres de polivinil, poliisobutilenos, aromáticos de polivinil, ésteres de polivinil, pirrolidonas de polivinil, polioximetilenos, óxido de politetrametileno, polietileno, polipropileno,
 25 politetrafluoretileno, poliuretanos, uretanos de poliéter, uretanos de poliéter de silicone, poliuretanos de silicone, uretanos de policarbonatos de silicone, elastômeros de poliolefina, borrachas EPDM, fluorsilicones, carboximetil quitosanas, poliaril eteretercetonas, poli eteretercetonas,
 30 tereftalato de polietileno, polivaleratos, carboximetil celulose, celulose, raíom, triacetato de raíom, nitratos de celulose, acetatos de celulose, celulose de hidróxi etil, butiratos de celulose, aceto-butiratos de celulose, copolímeros de etil vinil acetato, polissulfonas, resinas de
 35 epóxi, resinas ABS, silicones tais como polissiloxanos, polidimetil siloxanos, halogênios de polivinil e copolímeros,

éteres de celulose, triacetatos de celulose, quitosanas e copolímeros e/ou misturas das referidas substâncias.

Os seguintes polímeros podem ser usados como polímeros biodegradáveis: poli valerolactonas, poli-E-decalactonas, ácido polilactônico, ácido poliglicólico, polilactides, poliglicolides, copolímeros de polilactides e poliglicolides, poli-E-caprolactona, ácido poliidróxi butírico, poliidróxi butiratos, poliidróxi valeratos, poliidróxi butirato-co-valeratos, poli(1,4-dioxano-2,3-dionas), poli(1,3-dioxano-2-onas), poli-para-dioxanonas, polianidridos como anidridos de ácido polimaléico, poliidróxi metacrilatos, fibrinas, policianoacrilatos, dimetil acrilatos de policaprolactona, poli-B-ácido maléico, acrilatos de butil policaprolactona, polímeros de multiblocos como, por exemplo, de dióis de oligocaprolactona e dióis de oligodioxanona, polímeros de multiblocos de éster poliéter, como por exemplo, PEG e tereftalato de polibutileno, polipivotolactonas, trimetil carbonatos de ácido poliglicólico, glicolides de policaprolactona, poli(i-etil glutamato), poli(DTH-iminocarbonato), poli(DTE-co-DT-carbonato), poli(bisfenol A iminocarbonato), poliortoéster, carbonatos de politrimetila, poliiminocarbonatos, poli(N-vinil)-pirrolidona, álcoois de polivinil, amidas de poliéster, poliésteres glicolisados, polifosfoésteres, polifosfazenos, poli(p-carbóxi fenóxi)propano], ácido poliidróxi pentanóico, polianidridos, óxido de polietileno óxido de propileno, poliuretanos macios, poliuretanos tendo resíduos de aminoácido na estrutura, ésteres de poliéter como óxido de polietileno, oxalato de polialceno, poliortoésteres bem como copolímeros dos mesmos, lipídeos, carragenanas, fibrinogênio, amido, colágeno, polímeros à base de proteína, poliamino ácidos, poliamino ácidos sintéticos, zeína, zeína modificada, poliidróxi alcenoatos, ácido péctico, ácido actico, fibrina e caseína modificada e não modificada, sulfato de carbóxi metila, albumina, ácido hialurônico, quitosana e derivados dos mesmos, sulfatos de heparano e derivados dos mesmos,

heparinas, sulfato de condroitina, dextrano, B-ciclodextrinas, alginatos, glicosaminoglicanos, sacarídeos, polissacarídeos, proteoglicanos, glicoproteínas, copolímeros com PEG e polipropileno glicol, goma arábica, guar, gelatina, colágeno N-hidróxi succinimida, fosfolipídeos, modificações e copolímeros e/ou misturas das substâncias acima mencionadas.

Para aumentar mais a afinidade em relação a certas células, anticorpos monoclonais e/ou aptâmeros podem ser acoplados sobre a superfície das nanopartículas ou respectivamente sobre a camada exterior ou revestimento das nanopartículas. Os anticorpos monoclonais e aptâmeros são planejados de modo que sejam capazes de reconhecer certas células, tais como células tumorosas, e adicionalmente aumentar a discriminação celular das nanopartículas.

Em uma modalidade preferida da presente invenção, os núcleos das nanopartículas magnéticas consistem em magnetita (Fe_3O_4), maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ou em misturas dos referidos dois óxidos e preferivelmente eles são superparamagnéticos. Adicionalmente, os núcleos são estabilizados pelos revestimentos protetores coloidais, permitindo uma fixação das substâncias terapeuticamente ativas. Devido ao tipo de ligação, a conjugação de nanopartículas magnéticas e substâncias terapeuticamente ativas são construídas de tal modo que a liberação controlada da substância terapeuticamente ativa no corpo humano pode ser causada por meio de um campo magnético alternado (impulso).

Além disso, a presente invenção relaciona-se a composições farmacêuticas contendo as nanopartículas da invenção assim como ao uso das nanopartículas da invenção para preparar tais composições farmacêuticas.

Em particular, as referidas composições farmacêuticas são infusões ou soluções injetáveis. Tais soluções das nanopartículas, por exemplo, em solução salina fisiológica, são adequadas para administração intersticial ou intratumoral respectivamente. A administração intravenosa ou intra-arterial permite adicionalmente uma terapia sistemática no

que concerne ao corpo inteiro, no caso de tumores não-sólidos e/ou tipos de tumores que formam metástases.

As nanopartículas e composições farmacêuticas de acordo com a invenção são usadas para tratamento e profilaxia de
 5 doenças caracterizadas pela classe de células degeneradas ou células estranhas e nas quais as características das nanopartículas da invenção consistem no fato de que elas são capazes de discriminar entre células estranhas ou células degeneradas respectivamente e células autólogas saudáveis
 10 podem ser usadas vantajosamente. Entre as células degeneradas estão particularmente contadas células cancerosas ou células que são defeituosas respectivamente considerando suas proliferações e tecido estenótico e reestenótico. As células estranhas incluem em particular células bacterianas.

15 Conseqüentemente, as nanopartículas da invenção e as composições farmacêuticas contendo as nanopartículas são usadas para profilaxia e tratamento de tumores, carcinomas e câncer.

Exemplos de tipos de câncer e tumores para os quais as
 20 nanopartículas da invenção podem ser usadas incluem os seguintes: adenocarcinomas, melanoma coroidal, leucemia aguda, neurinoma acústico, carcinoma ampular, carcinoma anal, astrocitomas, carcinoma de célula basal, câncer pancreático, tumor do tecido conectivo, câncer de bexiga, carcinoma
 25 bronquial, carcinoma bronquial da célula não-pequena, câncer de seio, linfoma de Burkitt, carcinoma de corpo, síndrome de CUP, câncer do intestino grosso, câncer do intestino delgado, tumores do intestino delgado, câncer ovariano, carcinoma endometrial, ependimoma, cânceres epiteliais, tumores Ewing,
 30 cânceres gastrointestinais, câncer da vesícula biliar, carcinomas biliares, câncer uterino, câncer cervical, glioblastomas, cânceres ginecológicos, tumores de ouvido, nariz e garganta, neoplasias hematológicas, leucemia da célula pilosa, câncer uretral, câncer de pele, tumores de
 35 cérebro (gliomas), metástases de cérebro, câncer testicular, tumor da hipófise, carcinóides, sarcoma de Kaposi, câncer

laríngeo, tumor da célula germe, câncer de osso, carcinoma
 coloretal, tumores de cabeça e pescoço (tumores situados na
 região do pescoço, nariz e ouvidos), carcinoma de cólon,
 craniofaringiomas, câncer na área da boca e do lábio, câncer
 5 de fígado, metástases de fígado, leucemia, tumor da pálpebra,
 câncer de pulmão, linfoma maligno (Hodgkin/Não-Hodgkin),
 linfomas, câncer de estômago, melanoma maligno, neoplasma
 maligno, malignomas do trato gastrointestinal, carcinoma de
 peito, câncer de reto, meduloblastomas, melanoma,
 10 meningiomas, doença de Hodgkin, micoses fungóides, câncer de
 nariz, neurinoma, neuriblastoma, câncer de rim, carcinoma da
 célula renal, linfomas Não-Hodgkin, oligodendroglioma,
 carcinoma esofageal, tumores osteolíticos e tumores
 osteoblásticos, osteosarcoma, carcinoma ovariano, carcinoma
 15 pancreático, carcinoma penil, plasmacitoma, carcinoma da
 célula escamosa da cabeça e do pescoço, carcinoma da
 próstata, câncer de garganta, carcinoma retal,
 retinoblastoma, câncer vaginal, carcinoma da tireóide, câncer
 de pulmão Schneeberg, câncer esofageal, carcinoma
 20 espinocelular, linfoma da célula T (micoses fungóides),
 timoma, carcinoma do tubo, tumores de olhos, tumores
 urológicos, carcinoma urotelial, carcinoma vulvar, surgimento
 de verruga, tumores do tecido macio, sarcoma do tecido macio,
 tumor de Wilm e câncer de língua.

25 Tumores sólidos são particularmente preferidos. Além
 disso, carcinomas de próstata, tumores de cérebro, sarcomas,
 carcinomas cervicais, carcinomas ovarianos, carcinomas de
 seio, carcinomas bronquiais, melanomas, tumores da cabeça e
 do pescoço, carcinomas esofagiaais, carcinomas retais,
 30 carcinomas pancreáticos, carcinomas de bexiga e carcinomas de
 rim, metástases no fígado, no cérebro e nos nódulos
 linfáticos são preferidos.

Além disso, a aplicação e o uso das nanopartículas junto
 com hipertermia convencional, radioterapia e/ou junto com
 35 quimioterapia convencional são particularmente preferidos.

Exemplos

Exemplo 1

Preparação das nanopartículas com mitomicina acoplada para liberação:

Para acoplar a mitomicina citostática a nanopartículas de óxido de ferro estabilizadas pelo aminosilano, uma conjugação de mitomicina e trietoxisilibutiraldeído é sintetizada. Para este propósito, mitomicina e trietoxisilibutiraldeído são dissolvidos em uma proporção molar de 1:1 e misturados por 2 horas. Fazendo isto, o ingrediente ativo é acoplado ao silano por meio de uma ligação imina. Subseqüentemente, o referido conjugado é usado para cobrir as partículas de óxido de ferro como se segue: uma suspensão de partículas de óxido de ferro não cobertas (preparadas cloreto de ferro (II) e cloreto de ferro (III) pela precipitação com hidróxido de sódio) é colocada em um pH de 5 usando ácido acético. Subseqüentemente, uma mistura de mitomicina/silano conjugada e aminopropiltriethoxisilano é adicionada sob agitação contínua. A proporção molar de mitomicina para aminopropiltriethoxisilano é previamente estabelecida em 1:50. Após 24 horas, glicol etileno é adicionado para que o volume da suspensão seja dobrado. A água é então removida por destilação. Assim, os silanos são acoplados fixamente as partículas de óxido de ferro. A suspensão é purificada pela diálise diante de água ultrapura e concentrada para uma concentração de ferro de 1 mol/l (por destilação).

Exemplo 2

Acoplamento de um amino modificado oligonucleotídeo para nanopartículas de óxido de ferro usando glutaraldeído como um ligador.

Nanopartículas estabilizadas pelo aminosilano são preparadas pela precipitação de cloreto de ferro (II) e cloreto de ferro (III) com hidróxido de sódio e coberto pela adição de aminopropiltriethoxisilano (de acordo com WO 97/38058). A suspensão é concentrada para uma concentração de ferro de 2 mol/l.

500 µl da suspensão são lavados com 10 ml de tampão PIPES (piperazina-N,N'-bis-2-ácido etano sulfônico; pH=7,4). Subseqüentemente, 5% de solução de glutaraldeído (6 ml) são adicionados e a mistura é agitada por 2 horas. As partículas
5 ativadas deste modo são lavadas e ressuspensas em 800 µl de tampão PIPES. 0,3 µmol do oligonucleotídeo modificado por amino (modificação terminal de amino) são dissolvidos em água e adicionados a elas. A suspensão é agitada por 12 horas. Subseqüentemente, as partículas são lavadas com água
10 ultrapura e ressuspensas em 500 µl de água ultrapura.

Exemplo 3

Aplicação de uma camada biodegradável

As nanopartículas tendo ligadores dialdeído glutárico e oligonucleotídeos imobilizados para isso que foram preparados
15 de acordo com o exemplo 2 são liofilizados e tratados com uma solução etanólica contendo poliglicol usando um método de pulverização. Uma vez que o solvente tenha sido removido, nanopartículas providas com uma cobertura de poliglicol biodegradável são obtidas. Por exemplo, tais coberturas
20 servem para a fixação de aptâmeros e anticorpos específicos para células tumorosas.

Exemplo 4

Acoplamento de substâncias ativas por meio de oligonucleotídeos

25 Atualmente, a síntese de oligonucleotídeo é na maioria das vezes automatizada e é desenvolvida usando química de grupo protetor. Um oligonucleotídeo curto consistindo em 15 nucleotídeos é covalentemente acoplado as nanopartículas (veja exemplo 2). Um segundo oligonucleotídeo que é
30 complementar ao primeiro oligonucleotídeo é acoplado com o ingrediente ativo doxorubicina por meio de uma modificação terminal. Ambos componentes são colocados juntos e são aquecidos brevemente a uma temperatura de 95°C para desnaturar os oligonucleotídeos. As duas fitas se emparelham
35 para formar uma fita dupla devido à incubação subsequente a uma temperatura um pouco abaixo do ponto de fusão do

oligonucleotídeo. A sequência do oligonucleotídeo é selecionada para que o ponto de fusão sob condições fisiológicas seja aproximadamente de 48°C, deste modo não sendo possível a fusão da fita dupla. Devido ao aquecimento de mais de 50°C, o DNA de fita dupla preparado é quantitativamente fundido e o ingrediente ativo é liberado junto com o oligonucleotídeo fixado. O DNA de fita único é rapidamente degradado assim que ele entra na célula, para que o ingrediente ativo seja completamente liberado.

Exemplo 5

Acoplamento de substâncias ativas por meio de ácido nucléico de hélices triplas.

O RNA de fita dupla pode ser usado em terapia assim chamado siRNA (RNA interferente pequeno) para desativar genes específicos. No caso em que tal RNA vai ser liberado sob controle externo da nanopartícula usada como transportadora, o método de escolha consiste em uma ligação por meio de uma hélice tripla específica.

Um oligonucleotídeo ligando fitas duplas e casando com o siRNA usado é covalentemente ligado às nanopartículas por meio de uma modificação terminal (de acordo com o exemplo 2). (Isto permite uma formação posterior de um chamado "oligonucleotídeo de formação tripla" (TFO)). Para conseguir uma estabilidade aumentada em respeito às enzimas hidrolíticas, tais oligonucleotídeos usados têm estrutura de fosfato-açúcar dos ácidos nucléicos substituída por uma espinha do tipo peptídeo sintética que tem uma estrutura análoga a dos ácidos nucléicos, chamados ácidos nucléicos peptídeos (PNAs). O oligonucleotídeo covalentemente ligado ligará o RNA com fita dupla no sulco largo por hibridização um pouco abaixo do ponto de fusão da desejada hélice tripla (que simultaneamente é mais baixo do que o ponto de fusão do RNA de fita dupla).

Nenhuma liberação significativa acontece sob condições fisiológicas quando o ponto de fusão de 45°C, neste caso, não é alcançado. Somente ao exceder terapeuticamente o referido

ponto de fusão da hélice tripla, a referida hélice tripla funde liberando o siRNA com fita dupla.

Exemplo 6

Acoplamento de substâncias ativas por meio de uma
5 molécula de oligopeptídeo

O acoplamento sensível a temperatura por meio de um âmbito oligopeptídeo sensível a temperatura é particularmente adequado para alvejar efetores de polipeptídeos produzidos geneticamente tal como o fator de necrose do tumor
10 (TNF α). Neste contexto, uma heterodimerização, chamado zíper de leucina é usado. Por interações iônicas de grupos carregados (arginina/lisina contra glutamato/aspartato) a ligação é estabilizada e especificada simultaneamente.

Nas nanopartículas, um oligopeptídeo sintético
15 consistindo em 22 aminoácidos do zíper de leucina max é ligado por meio de uma modificação terminal do oligopeptídeo. Quando uma preparação TNF produzida geneticamente carregando terminalmente os 22 aminoácidos correspondentes do zíper de leucina myc é adicionada, o fator de necrose do tumor é
20 ligado quantitativamente às nanopartículas. Durante a termoterapia, a temperatura de fusão do zíper de leucina é excedida e conseqüentemente o fator de necrose do tumor (a função do qual não é afetada) é liberado localmente.

Exemplo 7

25 Acoplamento de substâncias ativas por meio de ligações de peptídeos oligonucleotídeos

Em acréscimo as interações termoinstáveis específicas de ácidos nucléicos com ácidos nucléicos e de proteínas com proteínas (ou respectivamente polipeptídeos com
30 polipeptídeos) há também interações biológicas específicas (assim com inespecíficas) entre proteínas ou polipeptídeos e ácidos nucléicos respectivamente. Desde que tais interações sejam baseadas nas mesmas ligações não-covalentes, elas são geralmente tão termoinstáveis quanto àquelas mencionadas
35 antes e assim elas podem igualmente ser usadas como um sistema ligador termoinstável para liberação térmica de

ingredientes ativos. Proteínas são usadas que interagem não especificamente (por exemplo, histonas ou a proteína SSB de fita única da bifurcação de replicação do DNA) ou bem especificamente com ácidos nucleicos (por exemplo, repressores, fatores de transcrição). Os chamados motivos "hélice-volta-hélice" de proteínas repressoras assim como os chamados motivos "dedo de zinco" das proteínas receptoras nucleares são usados como DNA específico ligando polipeptídeos. Ambos compreendem tipicamente cerca de 60 aminoácidos. (motivos dedo de zinco consistem em duas alças de tamanhos iguais, tendo respectivamente dois pares de cisteínas, ou um par de cisteínas e um par de histidinas respectivamente presos juntos por um átomo de zinco complexado). Assim, duas estruturas do tipo dedo são formadas, alcançando os sulcos mais importantes do DNA. Um ligador contendo uma sequência de aminoácidos que reconhece especificamente uma sequência de DNA palindrômica no caso de receptores de hormônio esteróides e compreende entre 15 e 20 aminoácidos está situado entre as duas estruturas.

Um oligopeptídeo sintético consistindo em 60 aminoácidos e compreendendo o motivo do dedo de zinco completo do receptor glicocorticóide é covalentemente acoplado a superfície das nanopartículas. A molécula do ingrediente ativo doxorubicina é covalentemente acoplada ao oligonucleotídeo com fita dupla medindo 15 pares de base compreendendo a sequência de reconhecimento do receptor de glicocorticóide (o chamado "elemento de resposta glicocorticóide" GRE). Ambos componentes são acoplados para formar um complexo que é estável sob condições fisiológicas. Se as nanopartículas são aquecidas pela aplicação de um campo magnético alternado, a temperatura de fusão do complexo é excedida. Devido à desintegração do complexo o conjugado oligonucleotídeo/ingrediente ativo é liberado.

Exemplo 8

Acoplamento de ingredientes ativos por meio de ligações

de anticorpos de hapteno

A ligação espontânea de um hapteno como terapêutica para proteínas autólogas pode levar a uma reação imune. A fixação de anticorpos pode também levar a uma neutralização do efeito. O referido efeito é usado para realizar uma ativação local por uma desintegração térmica de complexos de hapteno/anticorpos.

Os chamados fragmentos Fv (os menores fragmentos possíveis de anticorpos de ligação antígeno) de um anticorpo direcionado contra a doxorubicina que foram produzidos bioquimicamente (ou opcionalmente geneticamente) são covalentemente ligados à superfície das nanopartículas. Os sítios de ligação antígeno são saturados pela adição de um excesso de doxorubicina. As nanopartículas de doxorubicina saturadas são limpas de ligações de ingredientes ativos não especificamente por separação magnética ou centrifugação e, se necessário, elas são lavadas adicionalmente.

Após administração intravenosa de nanopartículas saturadas de doxorubicina, as referidas nanopartículas circulam e em grande escala, elas estão livres dos efeitos colaterais usuais da citostática. Uma acumulação inespecífica de nanopartículas dentro da gama de tumores é alcançada porque as nanopartículas são capazes de deixar os vasos através das paredes dos vasos permeáveis regeneradas continuamente. Adicionalmente, a integração intracelular em células tumorosas (devido à frequência da mitose), mas não dentro de células benignas, pode ser alcançada por uma cobertura superficial especial. Após um período decente de acumulação intratumoral, as nanopartículas podem ser aquecidas por campos magnéticos externos; isto resulta em danificação do tecido devido a hipertemia e na fusão do complexo de hapteno/anticorpo (fragmento) devido ao desenvolvimento do calor. O efeito da danificação do tecido da hipertemia é potencializado devido ao efeito citotóxico autônomo assim como é devido ao efeito de sensibilização em relação à radiação provocada por doxorubicinas. Deste modo,

uma sinergia real no tratamento de tumor é alcançada.

Exemplo 9

Acoplamento de ingredientes ativos por meio de ligações de biotina/avidina

5 A ligação não-covalente entre a vitamina biotina e a ligação proteína avidina da albumina do ovo da galinha (ou respectivamente sua estreptavidina análoga bacteriana) é a interação conhecida não-covalente mais forte. Devido à energia de alta ligação, entretanto, a ligação pode não
10 ser fundido dentro do intervalo de temperatura disponível. Para ser capaz de ainda tirar vantagem da referida ligação altamente específica, derivados de biotina com força de ligação reduzida têm que ser usados, tais como destibiotina (com uma dissociação constante de 5×10^{13} comparada com 1×10^{15}
15 10^{15} no caso da biotina) ou iminobiotina (dissociação constante de $3,5 \times 10^{11}$), a ligação das quais a (estrept)avidina é fundida fisiologicamente a temperaturas que podem ser alcançadas terapeuticamente.

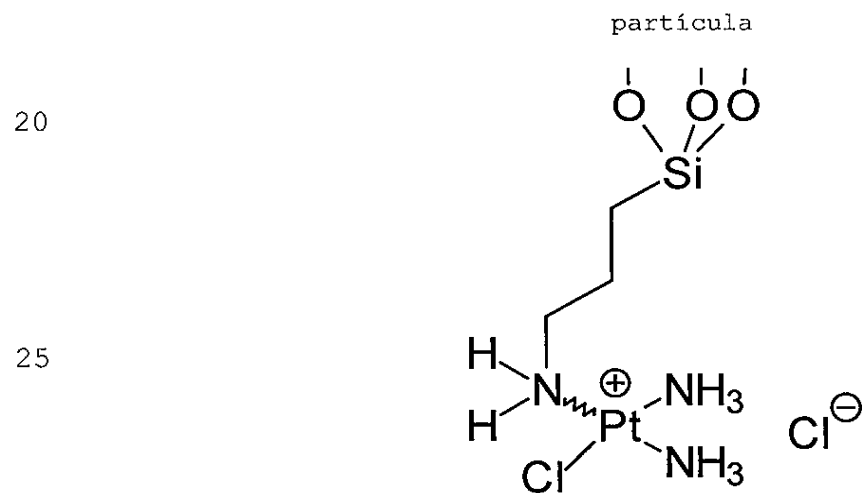
A iminobiotina é acoplada por meio de seu grupo ϵ -amino
20 com o grupo amino da doxorubicina; a ligação é formada por meio do dialdeído glutárico. As nanopartículas são também acopladas a estreptavidina disponível comercialmente via uma funcionalidade amino da cobertura superficial por meio do dialdeído glutárico. Pela adição de um excesso de
25 iminobiotinil doxorubicina, as nanopartículas são carregadas com doxorubicina. Frequentemente, as referidas nanopartículas carregadas com doxorubicina são passivamente enriquecidas in vivo devido à permeabilidade das células endoteliais na área do tumor e adicionalmente elas são ativamente enriquecidas
30 pela endocitose nas células tumorosas. Neste caso também, a hipertemia induzida magneticamente é aumentada de forma sinérgica pela liberação térmica da doxorubicina sensibilizadora.

Exemplo 10

35 Preparação de nanopartículas com cisplatina acoplada para liberação:

Para o acoplamento da cisplatina citostática as nanopartículas de óxido de ferro estabilizadas pelo aminosilano, primeiramente, as nanopartículas caracterizadas no exemplo 1 são derivatizadas por meio do aminopropiltriethoxisilano. Para o referido propósito, uma suspensão de partículas de óxido de ferro sem cobertura (preparadas de cloreto de ferro (II) e cloreto de ferro (III) pela precipitação com o hidróxido de sódio) é colocada para um pH de 5 usando ácido acético. Aminopropiltriethoxisilano é adicionado em gotas numa proporção molar em relação ao número máximo teórico de grupos hidróxi, agitado por uma hora em temperatura ambiente e subsequente misturado com uma quantidade equimolar de cisplatina que reage em uma reação de substituição nucleofílica com o grupo amino do silano.

As nanopartículas derivatizadas obtidas têm a seguinte estrutura:



Exemplo 11

Efeito das nanopartículas de cisplatina de acordo com o exemplo 10 sobre células de glioblastomas

Uma solução aquosa das referidas nanopartículas de cisplatina comparadas a nanopartículas não-derivatizadas em células glioblastomas foi examinada.

Os testes in vitro foram realizados com a linha de

célula humana de glioblastoma RUSIRS1 (TUMOR CEREBRAL). As células glioblastomas foram tiradas de um tecido tumoral de um paciente e cultivadas como descrito na DE 199 12 798 C1. Para testar a eficiência das partículas de cisplatina respectivamente 2×10^6 células RUSIRS1 foram preparadas em uma garrafa de cultura de célula de 75 cm^3 com 25 ml de meio de cultura de célula (D-MEM+20%FBS+1,2 ml de piruvato). A suspensão celular foi uniformemente distribuída sobre 4 vasos de cultura. Respectivamente 153 μl de solução aquosa das referidas nanopartículas cisplatinas ($c_{\text{Fe}}=2\text{mol/l}$) foram adicionadas a duas das referidas suspensões celulares. As duas outras garrafas de cultura serviram como referência e 153 μl da solução aquosa de nanopartículas não-derivatizadas ($c_{\text{Fe}}=2\text{mol/l}$) foi adicionada também. Antes da adição às células, as amostras das nanopartículas foram aquecidas a uma temperatura de 37°C por 15 minutos e deixadas em RT por 10 minutos. Após a adição das nanopartículas as amostras foram deixadas por uma hora e subsequentemente sujeitas a tratamento por um campo magnético alternado por 30 minutos. O referido tratamento foi repetido após 24 horas. Já após um tempo de incubação de 48 horas a 37°C , danos mais distintos puderam ser observados nas duas amostras com nanopartículas de cisplatina do que nas duas amostras contendo nanopartículas não-derivatizadas.

REIVINDICAÇÕES

1. Nanopartícula, **caracterizada** pelo fato de que pelo menos uma substância terapeuticamente ativa é ligada à nanopartícula por meio de uma molécula ligadora, na qual a
5 molécula ligadora contém um grupo que é termoinstável, eletromagneticamente instável, fotoinstável, ácido-instável ou pode ser intercalada ou clivada enzimaticamente e na qual a separação de pelo menos uma substância da nanopartícula terapeuticamente ativa é causada ou iniciada ou
10 substancialmente aumentada por um campo magnético alternado.

2. Nanopartícula, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que pelo menos uma substância terapeuticamente ativa é covalentemente ligada à nanopartícula.

15 3. Nanopartícula, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada** pelo fato de que a molécula ligadora é uma molécula de ácido nucléico, um polipeptídeo, um ácido nucléico peptídeo, um aptâmero, DNA, RNA, um zíper de leucina, um oligonucleotídeo, um oligopeptídeo, biotina,
20 avidina, estreptavidina, uma ligação de anticorpo hapteno ou uma ligação avidina biotina.

4. Nanopartícula, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizada** pelo fato de que a molécula ligadora é um constructo de ácido nucléico de faixa
25 dupla, uma hélice dupla, uma homo-híbrido ou uma hetero-híbrido de DNA-DNA, DNA-RNA, DNA-PNA, RNA-RNA, RNA-PNA ou PNA-PNA.

5. Nanopartícula, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizada** pelo fato de que a
30 nanopartícula é provida com um revestimento protetor ou com uma cobertura.

6. Nanopartícula, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada** pelo fato de que o revestimento protetor ou cobertura tem grupos amino ou grupos carbóxi.

35 7. Nanopartícula, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizada** pelo fato de que

pelo menos uma substância terapeuticamente ativa é selecionada pelo grupo compreendendo agentes antiproliferativos, antimigratórios, antiangiogênicos, antitrombóticos, antiinflamatórios, antiflogísticos, citostáticos, citotóxicos, anticoagulantes, antibacterianas, antivirais e/ou antimicóticos.

8. Nanopartícula, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada** pelo fato de que pelo menos uma substância terapeuticamente ativa é selecionada do grupo compreendendo actinomicina D, ametantrona, aminocamptotecina, aminoglutetimida, amsacrina, anastrozol, antagonistas de bases pirimidina e purina, antraciclina, inibidores de aromatase, asparaginase, anti-estrogênios, bendamustina, bexarotene, biolimus A9, bleomicina, buserelina, busulfan, caliqueamicinas, camptotecina, derivados de camptotecina, capecitabina, carboplatina, carmustina, clorambucil, cisplatina, cladribina, ciclosfofamida, citarabina, citosina arabinosida, citostáticos alquilantes, dacarbazina, dactomicina, daunorubicina, 5'-desóxi-5-fluorouridina, docetaxel, doxorubicina (adriamicina), doxorubicina lipo, epirubicina, estramustina, etoposide, exemestane, fludarabina, fluorouracil, antagonistas do ácido fólico, formestano, gentacibine, glicocorticóides, goserelina, hormônios, antagonistas dos hormônios, hicamtin, hidroxí uréia, idaburicina, ifosfamida, imatinib, irinotecan, letrozol, leupropelin, lomustine, maitansinóides, melfalan, mercaptopurina, metotrexato, miltefosine, mitomicinas, mitopodozide, agentes antimitóticos, mitoxantrone, nimustina, oxaliplatina, oxazafosforinas, paclitaxel, pentostatina, derivados de podofilotoxina, procarbazona, rapamicina, rodomicina D, tamoxifeno, temozolomida, teniposide, testolactona, testolactona, tiotepa, tioguanina, inibidores de topoisomerase, topotecan, treosulfan, tretinoína, triptorelin, trofosfamidas, alcalóides vinca, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, antibióticos ativos de forma

citostática.

9. Nanopartícula, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada** pelo fato de que pelo menos uma substância terapeuticamente ativa é selecionada do grupo contendo ácidos
5 nucléicos, aminoácidos, peptídeos, proteínas, carboidratos, lipídios, glicoproteínas, glicanos, ou lipoproteínas, nas quais as substâncias mencionadas anteriormente têm propriedades antiproliferativas, antimigratórias, antiangiogênicas, antitrombóticas, antiinflamatórias,
10 antiflogísticas, citostáticas, citotóxicas, anticoagulantes, antibacterianas, antivirais e/ou antimicóticas.

10. Nanopartícula, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizada** pelo fato de que a nanopartícula é composta de óxidos de ferro
15 superparamagnéticos ou de ferro puro tendo uma camada de óxido.

11. Nanopartícula, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizada** pelo fato de que um sensibilizador, radiosensibilizador e/ou amplificador é
20 ligado à nanopartícula para complementar métodos de tratamento de câncer convencionais.

12. Nanopartícula, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizada** pelo fato de que em anticorpos monoclonais ou respectivamente fragmentos de
25 anticorpos e/ou aptâmeros são acoplados a superfície da referida nanopartícula.

13. Solução de infusão, **caracterizada** por conter nanopartículas como definidas nas reivindicações de 1 a 12.

14. Uso de nanopartículas, como definido em qualquer uma
30 das reivindicações de 1 a 12, **caracterizado** pelo fato de ser para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento e/ou profilaxia de doenças proliferativas, câncer e infecções bacterianas.

NANOPARTÍCULA, SOLUÇÃO DE INFUSÃO, USO DE NANOPARTÍCULAS

A presente invenção relaciona-se a nanopartículas, nas
quais pelo menos uma substância terapeuticamente ativa é
ligada à referida nanopartícula e na qual a separação de pelo
5 menos uma substância terapeuticamente ativa da nanopartícula
é causada ou iniciada por um campo magnético alternado. Além
disso, a presente invenção relaciona-se a composições
farmacêuticas, em particular a soluções injetáveis contendo
nanopartículas assim como ao uso também para o tratamento de
10 câncer.