

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 493**

51 Int. Cl.:

A61K 9/10	(2006.01) A61K 31/282	(2006.01)
A61K 9/50	(2006.01) A61K 31/407	(2006.01)
A61K 9/51	(2006.01) A61K 31/513	(2006.01)
A61K 33/00	(2006.01) A61K 31/546	(2006.01)
A61K 33/24	(2006.01) A61K 41/00	(2006.01)
A61K 33/26	(2006.01) A61K 45/06	(2006.01)
A61K 33/30	(2006.01) A61N 1/40	(2006.01)
A61K 33/32	(2006.01) B82Y 5/00	(2011.01)
A61K 33/34	(2006.01)	
A61K 31/136	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.08.2006** **E 10012394 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017** **EP 2266544**

54 Título: **Procedimiento para introducir sustancias terapéuticas en células**

30 Prioridad:

19.08.2005 DE 102005039579
26.08.2005 US 711407 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.10.2017

73 Titular/es:

MAGFORCE AG (100.0%)
Max-Planck-Strasse 3
12489 Berlin, DE

72 Inventor/es:

JORDAN, ANDREAS;
WALDÖFNER, NORBERT y
SCHOLZ, REGINA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 635 493 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

Procedimiento para introducir sustancias terapéuticas en células

La presente invención se refiere a composiciones que contienen nanopartículas y a usos de esta composición para introducir sustancias terapéuticamente activas en células, en particular células cancerosas. Las partículas están configuradas químicamente de manera que en las células tiene lugar una elevada absorción intracelular. Para la introducción en las células no es necesario que exista una unión directa entre la nanopartícula y la sustancia terapéuticamente activa. Las composiciones farmacéuticas a base de nanopartículas y agentes anticancerosos conducen a una acción incrementada del agente anticanceroso y a efectos secundarios reducidos.

Se sabe que las células (en particular células tumorales) pueden absorber nanopartículas por endocitosis. En el documento DE 197 26 282.1 se menciona un procedimiento para preparar nanopartículas que pueden penetrar en células. La absorción de las nanopartículas se puede analizar mediante ensayos *in vitro* con material celular muy puro. En el documento DE 199 12 798 C1 se mencionan métodos con cuya ayuda se puede cultivar cualquier célula a partir de material tisular. Mediante estos métodos se pueden configurar químicamente las partículas de manera que se produzca una elevada absorción en determinadas células tumorales. También se conocen, y son asimismo objeto de investigación, métodos para aumentar la eficacia de sustancias terapéuticas mediante su acoplamiento a nanopartículas como sistemas portadores. Así, en el documento DE 10059151 A se realiza un acoplamiento de las sustancias mediante interacciones iónicas, con lo cual el conjugado debe acumularse en el tejido tumoral. Sin embargo, la liberación de la sustancia terapéutica no se produce intracelularmente, sino en el intersticio. También se conoce la introducción de nanopartículas en células tumorales con la ayuda de anticuerpos o péptidos (por ejemplo péptidos TAT). Sin embargo, este tipo de introducción solo conduce a un enriquecimiento comparativamente bajo de nanopartículas en células tumorales y, en consecuencia, no puede utilizarse con fines terapéuticos.

Es misión de la presente invención poner a disposición composiciones y usos de estas composiciones para el tratamiento y la profilaxis de enfermedades cancerosas.

La misión se logra mediante las nanopartículas en el uso según la reivindicación 1. De las reivindicaciones dependientes, de los ejemplos y figuras, y de la descripción, se desprenden otras ejecuciones ventajosas.

Se describen composiciones farmacéuticas que consisten en nanopartículas con una elevada afinidad hacia células degeneradas, al menos una sustancia terapéuticamente activa, en particular un agente anticanceroso y al menos un vehículo, excipiente y/o disolvente farmacológicamente tolerable.

Se pueden utilizar como vehículos, excipientes y/o disolventes farmacológicamente tolerables las sustancias habitualmente utilizadas en galénica (la tecnología farmacéutica), prefiriéndose las composiciones farmacéuticas líquidas.

Son adecuados como disolventes agua o disolución salina fisiológica. En caso necesario, se pueden utilizar también codisolventes tales como etanol, por ejemplo, preferiblemente en una cantidad de hasta 10% en volumen.

En particular, estas composiciones farmacéuticas son disoluciones para infusión o para inyección. Tales disoluciones de las nanopartículas en, por ejemplo, disolución salina fisiológica, son adecuadas para la administración intersticial o respectivamente intratumoral. Además, la administración intraarterial o intravenosa permite una posibilidad de terapia sistémica, que afecte a todo el cuerpo, para tipos de tumores no sólidos y/o metastatizantes.

Las nanopartículas y la al menos una sustancia terapéutica, en particular el al menos un agente anticanceroso, pueden estar contenidas en una disolución, preferiblemente disolución para inyección o disolución para infusión, única. No obstante, la composición farmacéutica también puede estar constituida por dos disoluciones, de las que una contiene las nanopartículas y la otra contiene la al menos una sustancia terapéuticamente activa, en particular el al menos un agente anticanceroso, y se pueden aplicar ambas disoluciones al mismo tiempo o simultáneamente. Según la presente invención, las nanopartículas se administran junto con un agente anticanceroso, de modo que las nanopartículas y el agente anticanceroso están presentes simultáneamente en la célula degenerada, siendo administradas las nanopartículas y el agente anticanceroso en disoluciones separadas.

Resulta esencial en la invención el que se haya encontrado, sorprendentemente, que las nanopartículas descritas en la presente memoria son capaces de introducir sustancias terapéuticas, en particular agentes anticancerosos, en células degeneradas. Se entienden por células degeneradas las células oncogénicas, las células tumorales y también las células cancerosas, es decir, células que han degenerado por completo o están en camino hacia una degeneración completa. Por lo tanto, se denominan células degeneradas a células que presenten una proliferación incontrolada. Esto significa que las sustancias terapéuticas, en particular agentes anticancerosos, son claramente mejor absorbidas por las células degeneradas si están presentes simultáneamente las nanopartículas descritas en la presente memoria que en ausencia de las nanopartículas. Gracias a la absorción mejorada de las sustancias terapéuticas en las células degeneradas, se producen tanto un claro aumento de la actividad de estas sustancias, en particular agentes anticancerosos, como una reducción de los efectos secundarios de estas sustancias.

Se entiende por aumento de la actividad que la misma cantidad de sustancia terapéuticamente activa, en particular agente anticanceroso, muestre una eficacia incrementada en presencia de las nanopartículas que en su ausencia. Se ha de entender por reducción de los efectos secundarios de sustancias terapéuticas, en particular agentes anticancerosos, que el daño a las células sanas, para la misma eficacia o con la misma cantidad de agente anticanceroso, es menor en el caso de la presencia simultánea de las nanopartículas que en su ausencia.

Por lo tanto, es un prerequisite para el aumento de la eficacia que la sustancia terapéutica pueda ser absorbida en la célula en el transcurso de la introducción de un gran volumen de nanopartículas en las células. Evidentemente, la invaginación de la membrana celular como consecuencia de la fijación de las partículas conduce a la supresión al menos parcial del control de paso transmembranal y, con ello, a un canal de introducción completamente nuevo para sustancias terapéuticamente activas. En este contexto, es ventajoso que se pueda conseguir un incremento local de la concentración de nanopartículas y sustancia terapéutica, en particular agente anticanceroso, en el intersticio. Esto se puede conseguir, por ejemplo, mediante la administración intersticial de la mezcla o mediante estrategias de enriquecimiento apropiadas, tales como la liberación controlada, el reconocimiento de receptores o de otras biomoléculas que son reconocidas por ligandos de la superficie de la partícula (denominado en inglés "targeting"). También es posible aplicar sistemáticamente la sustancia terapéutica con posterioridad a la administración intersticial de las nanopartículas. La absorción intracelular de las nanopartículas se efectúa en un plazo que va desde algunas horas hasta varios días; de forma que también es posible una administración repetida de la sustancia dentro de la fase de endocitosis. En particular, se precisa una administración sistémica de la sustancia si esta tiene que ser metabolizada.

Las nanopartículas deben presentar una carga superficial positiva, ya que tales nanopartículas son particularmente bien absorbidas en células degeneradas, en particular células cancerosas.

Se puede conseguir una carga superficial positiva en condiciones fisiológicas sobre las nanopartículas dotando a las nanopartículas de un revestimiento que pueda polarizarse positivamente y/o ionizarse positivamente.

Un revestimiento que pueda polarizarse positivamente y/o ionizarse positivamente semejante se puede obtener revistiendo las nanopartículas con sustancias que se puedan polarizar positivamente y/o ionizar positivamente. Tales sustancias pueden contener, por ejemplo, grupos amino o átomos de nitrógeno protonizables que, al valor de pH correspondiente, están presentes en forma protonada.

Se debe entender por carga superficial positiva una superficie cargada positivamente o una superficie que se puede cargar positivamente o que se puede polarizar positivamente de una nanopartícula cualquiera, debiendo presentar las nanopartículas, en condiciones fisiológicas, esta superficie positivamente polarizada o positivamente cargada.

En una forma de realización preferida, las nanopartículas poseen un revestimiento a base de aminosilanos policondensados y eventualmente otro revestimiento externo que presenta grupos carboxilato que compensan las cargas positivas.

Dado que el revestimiento cargado positivamente o que puede polarizarse positivamente o que puede cargarse positivamente solamente debe biodegradarse de manera lenta, consiste preferiblemente en sustancias biológicamente estables o respectivamente biológicamente inertes o respectivamente bioestables, por ejemplo polímeros.

Como polímeros bioestables se pueden emplear: poliacrilamida, poliacrilonitrilos, poliamidas, polieteramidas, polietilenamina, poliimidas, policarbonatos, policarboureтанos, polivinilcetonas, poli(halogenuros de vinilo), poli(halogenuros de vinilideno), poliviniléteres, poliisobutilenos, polivinilaresmáticos, poli(ésteres vinílicos), polivinilpirrolidonas, polioximetilenos, poli(óxido de tetrametileno), polietileno, polipropileno, politetrafluoroetileno, poliuretanos, polieteruretanos, polieteruretanos de silicona, poliuretanos de silicona, policarbonatoureтанos de silicona, elastómeros poliolefinicos, poliisobutileno, cauchos EPDM, fluorosiliconas, carboximetilquitosanos, poliarileteretercetonas, polieteretercetonas, poli(tereftalato de etileno), polivaleratos, carboximetilcelulosa, celulosa, rayón, triacetatos de rayón, nitratos de celulosa, acetatos de celulosa, hidroxietilcelulosa, butiratos de celulosa, acetatobutiratos de celulosa, copolímeros de etil-acetato de vinilo, polisulfonas, resinas epoxídicas, resinas ABS, cauchos EPDM, siliconas tales como polisiloxanos, polidimetilsiloxanos, poli(halogenuros de vinilo) y copolímeros, éteres de celulosa, triacetatos de celulosa, quitosanos y copolímeros y/o mezclas de estas sustancias.

Los polímeros biológicamente estables deben presentar un número suficiente de grupos positivos o que se puedan polarizar positivamente o cargar positivamente tales como, por ejemplo, grupos amino o átomos de nitrógeno. Normalmente, el revestimiento cargado positivamente está dotado por término medio de al menos 50 grupos catiónicos, que se pueden polarizar positivamente y/o que se pueden cargar positivamente, tales como grupos amino, por nanopartícula, preferiblemente al menos 100 y, de manera particularmente preferible, al menos 500.

En formas de realización preferidas, este revestimiento consiste en aminosilanos monoméricos tales como, por ejemplo, 3-aminopropiltriethoxisilano, 2-aminoetil-3-aminopropiltrimethoxisilano, trimethoxisililpropildietilentriammina o N-(6-aminohexil)-3-aminopropiltrimethoxisilano, que se policondensan por procedimientos conocidos para conseguir la estabilidad necesaria. En los documentos DE 19614136 A o DE 19515820 A se describe, por ejemplo, un procedimiento adecuado.

Con el fin de compensar la carga y también aumentar la discriminación celular, se pueden revestir con un revestimiento adicional de polímeros, preferiblemente descomponibles biológicamente o respectivamente biodegradables, la capa o revestimiento positivamente cargados.

Como polímeros biodegradables se utilizan, preferiblemente: polivalerolactonas, poli- ϵ -decalactonas, poli(ácido lactónico), poli(ácido glicólico), polilactidas, poliglicolidas, copolímeros de las polilactidas y poliglicolidas, poli- ϵ -caprolactona, poli(ácido hidroxibutírico), polihidroxibutiratos, polihidroxivaleratos, polihidroxibutiratos-co-valeratos, poli(1,4-dioxano-2,3-dionas), poli(1,3-dioxano-2-onas), poli-para-dioxanonas, polianhídridos tales como poli(anhídridos de ácido maleico), polihidroximetacrilatos, fibrina, policianoacrilatos, policaprolactona-dimetilacrilatos, poli(ácido β -maleico), poli(caprolactona-acrilatos de butilo), polímeros multibloque tales como, por ejemplo, de oligocaprolactonadióles y oligodioxanonadióles, polímeros multibloque de poliéster tales como, por ejemplo, PEG y poli(tereftalato de butileno), polipivalolactonas, poli(trimetilcarbonato de ácido glicólico), policaprolactonaglicólidos, poli(γ -glutamato de etilo), poli(DTH-iminocarbonato), poli(carbonato de DTE-co-DT), poli(iminocarbonato de bisfenol A), poliortoésteres, poli(trimetilcarbonato de ácido glicólico), politrimetilcarbonatos, poliiminocarbonatos, poli(N-vinil)-pirrolidona, poli(alcoholes vinílicos), poliésteramidas, poliésteres glicolados, polifosfoésteres, polifosfacenos, poli[(p-carboxifenoxi)propano], poli(ácido hidroxipentanoico), polianhídridos, poli(óxido de etileno-óxido de propileno), poliuretanos blandos, poliuretanos con restos aminoácidos en la cadena principal, poliésteres tales como poli(óxido de etileno), poli(oxalatos de alqueno), poliortoésteres y sus copolímeros, lípidos, carragenanos, fibrinógeno, almidón, colágeno, polímeros basados en proteínas, poliaminoácidos, poliaminoácidos sintéticos, zeína, zeína modificada, polihidroxialcanoatos, ácido péptico, ácido actínico, fibrina y caseína modificadas y sin modificar, carboximetilsulfato, albúmina, ácido hialurónico, quitosano y sus derivados, sulfatos de heparán y sus derivados, heparinas, sulfato de condroitina, dextrano, β -ciclodextrinas, alginatos, glicosaminoglicanos, sacáridos, polisacáridos, proteoglicanos, glicoproteínas, copolímeros con PEG y polipropilenglicol, goma arábiga, guar, gelatina, colágeno-N-hidroxisuccinimida, lípidos, fosfolípidos, modificaciones y copolímeros y/o mezclas de las sustancias mencionadas en lo que antecede.

Son particularmente preferidos polímeros o copolímeros basados en ácidos α -hidroxicarboxílicos tales como, por ejemplo, poli(ácido láctico), polilactidas, poli(ácido glicólico), poliglicolidas y copolímeros de los mismos. Se prefieren además polioles (por ejemplo, polietilenglicol) y poliacidos tales como, por ejemplo, poli(ácidos acrílicos) y también hidratos de carbono y azúcares, en particular dextranos.

Adicionalmente, las nanopartículas pueden estar dotadas o revestidas de un tercer revestimiento. Los revestimientos pueden servir como envoltura protectora, capa de barrera o para la discriminación celular.

Un revestimiento con especificidad celular incrementa la afinidad de las nanopartículas hacia determinadas células, por ejemplo hacia determinadas células bacterianas o hacia determinadas células tumorales y, por lo tanto, sirve para la discriminación celular. Tales nanopartículas con especificidad celular se acumulan preferiblemente en aquellas células hacia las que tienen una mayor afinidad, debido a la funcionalidad en su superficie, y por lo tanto tienen especificidad tumoral. Con esta tecnología es posible, por ejemplo, desarrollar nanopartículas con especificidad tumoral hacia determinados tipos de cáncer.

Para incrementar adicionalmente la afinidad con respecto a determinadas células, en la superficie de las nanopartículas o en la capa externa o envoltura de las nanopartículas se pueden acoplar y/o disponer y/o incorporar anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos recombinantes, anticuerpos biespecíficos, fragmentos de anticuerpo, aptámeros, fragmentos Fab, fragmentos Fc, péptidos, peptidomiméticos, gámpmeros, ribozimas, oligómeros CpG, ADNzimas, ribointerruptores y/o lípidos. Los compuestos están configurados de manera que son capaces de reconocer determinadas células, por ejemplo células tumorales, y aumentar adicionalmente la discriminación celular de las nanopartículas.

Las nanopartículas mismas consisten preferiblemente en un material magnético, un material ferromagnético, antiferromagnético, ferrimagnético, antiferrimagnético o superparamagnético, además preferiblemente de óxidos de hierro, en particular óxidos de hierro superparamagnéticos o de hierro puro, que está provisto de una capa de óxido. Se pueden calentar tales nanopartículas mediante un campo alternativo magnético. Es posible calentar a más de 50°C el tejido que contiene las nanopartículas. Estas temperaturas tan elevadas se pueden conseguir por que se pueden absorber hasta 1.000 pg y más de hierro en forma de nanopartículas por célula tumoral.

Las nanopartículas consisten preferiblemente en óxidos de hierro y, en particular, en magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) o mezclas de estos dos óxidos, y preferiblemente son superparamagnéticas. En general, las nanopartículas preferidas pueden representarse por la fórmula FeO_x , donde x representa un número de 1 a 2. Sin embargo, también cabe la posibilidad de incorporar las nanopartículas en un material no magnético, tal como óxido de silicio (SiO_2), por ejemplo (véase más abajo). Preferiblemente, las nanopartículas tienen un diámetro inferior a 500 nm. Preferiblemente, las nanopartículas tienen un diámetro medio de 15 nm o bien se sitúan preferiblemente en el intervalo de tamaños de 1 - 100 nm, y de manera particularmente preferible en el intervalo de 10 - 20 nm.

Además de los materiales magnéticos de la fórmula FeO_x , donde x es un número en el intervalo de 1,0 a 2,0, también se pueden emplear conforme a la invención materiales de fórmula general $\text{M(II)Fe}_2\text{O}_4$ con M = Co, Ni, Mn,

Zn, Cu, Cd, Ba, u otras ferritas. Preferiblemente, el contenido de átomos metálicos distintos de átomos de hierro asciende a no más de 70% de átomos metálicos, en particular no más de 35% de átomos metálicos. No obstante, las nanopartículas consisten preferiblemente en más del 98% en peso de óxido de hierro, que contiene tanto Fe(III) como Fe(II) en una proporción de 1:1 a 1:3, preferiblemente. También son adecuadas, además, partículas de sílice o de polímero, en las que están incorporados o unidos materiales magnéticos tales como, por ejemplo, los materiales magnéticos mencionados en la presente memoria.

Los núcleos de nanopartícula utilizados pueden consistir también en materiales no magnéticos. Entran en consideración, por ejemplo, nanopartículas de polímeros (por ejemplo, PLGA, poliácridamida, poli(cianoacrilato de butilo), de metales y de todos los materiales oxidicos (por ejemplo, MgO, CaO, TiO₂, ZrO₂, SiO₂, Al₂O₃). Es adecuado cualquier material que se pueda revestir con envolturas con especificidad tumoral por medio de los métodos descritos más arriba, ya que la aptitud para la endocitosis no depende del núcleo de la partícula, sino de la envoltura.

Preferiblemente, las nanopartículas o partículas a nanoescala tienen un diámetro medio de partícula no superior a 100 nm, preferiblemente no superior a 50 nm y, de manera particularmente preferible, no superior a 30 nm. Preferiblemente, el diámetro medio de partícula se sitúa en 1 - 40 nm, preferiblemente en 3 - 30 nm y, de manera particularmente preferible, en 5 - 25 nm.

Sorprendentemente, tales nanopartículas son muy adecuadas para introducir sustancias terapéuticas en determinados tipos celulares, con lo cual se incrementa claramente la eficacia de las sustancias terapéuticas. Dichas sustancias terapéuticas son, preferiblemente, agentes anticancerosos, citostáticos, sustancias activas citotóxicas, sustancias activas antiproliferativas, sustancias activas antiflogísticas, sustancias activas antimigración, sustancias activas antiangiogénicas, sustancias activas antiinflamatorias, sustancias activas antibacterianas y/o inhibidores de microtúbulos.

Como compuestos citotóxicos y/o citostáticos, es decir, compuestos químicos con propiedades citotóxicas y/o citostáticas, se pueden emplear, entre otros, agentes alquilantes, antibióticos con propiedades citostáticas, antimetabolitos, inhibidores de microtúbulos e inhibidores de topoisomerasa, compuestos que contienen platino y otros citostáticos tales como, por ejemplo, asparaginasa, tretinoína, alcaloides, podofilotoxinas, taxanos y miltefosina, hormonas, inmunomoduladores, anticuerpos monoclonales, transductores de señal (moléculas de transducción de señal) y citocinas.

Como ejemplos de agentes alquilantes se pueden nombrar, entre otros: cloretamina, ciclofosfamida, trofosfamida, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, busulfán, tiotepa, carmustina, lomustina, dacarbazina, procarbazona, temozolomida, treosulfán, estramustina y nimustina.

Son ejemplos de antibióticos con propiedades citostáticas daunorrubicina y daunorrubicina liposomal, doxorubicina (adriamicina), dactinomicina, mitomicina C, bleomicina, epirubicina (4-epiadriamicina), idarrubicina, dactinomicina, mitoxantrona, amsacrina y actinomicina D.

Se pueden mencionar como ejemplos de antimetabolitos (sustancias activas antimetabólicas) metotrexato, 5-fluorouracilo, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina, fludarabina, cladribina, pentostatina, gemcitabina, citarabina, azatioprina, raltitrexed, capecitabina, arabinósido de citosina, tioguanina y mercaptopurina.

Pertenecen a la clase de los alcaloides y podofilotoxinas, entre otros, vincristina, vinblastina, vindesina, etopósido y tenipósido. Además, se pueden emplear compuestos que contienen platino. Como compuestos que contienen platino se mencionarán, por ejemplo, cisplatino, carboplatino y oxaliplatino. Entre los inhibidores de microtúbulos se cuentan, por ejemplo, alcaloides tales como, por ejemplo, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina) y paclitaxel (Taxol®), así como derivados de paclitaxel. Como ejemplos de inhibidores de topoisomerasa se pueden mencionar, por ejemplo, etopósido, tenipósido, camptotecina, topotecán e irinotecán.

El paclitaxel y el docetaxel son ejemplos de la clase de compuestos de los taxanos y entre las otras sustancias activas citostáticas (otros citostáticos) se cuentan, por ejemplo, hidroxycarbamida (hidroxiurea), imatinib, miltefosina, amsacrina, topotecán (inhibidor de topoisomerasa-I), pentostatina, bexaroteno, tretinoína y asparaginasa. Son representantes de la clase de compuestos de los anticuerpos monoclonales, entre otros, trastuzumab (también conocido como Herceptin®), alemtuzumab (también conocido como MabCampath®) y rituximab (también conocido como MabThera®).

También se pueden emplear hormonas tales como, por ejemplo, glucocorticoides (prednisona), estrógenos (fosfestrol, estramustina), LHRH (buserelina, goserelina, leuprorelina, triptorelina), flutamida, acetato de ciproterona, tamoxifeno, toremifeno, aminoglutetimida, formestano, exemestano, letrozol y anastrozol. Entre las clases de los inmunomoduladores, citocinas, anticuerpos y transductores de señal se cuentan interleucina-2, interferón-α, eritropoyetina, G-CSF, trastuzumab (Herceptin®), rituximab (MabThera®), gefitinib (Iressa®), ibritumomab (Zevalin®), levamisol y retinoides.

Como otras sustancias terapéuticas posibles se mencionarán: actinomicina D, aminoglutetimida, antraciclinas, inhibidores de aromataza, antiestrógenos, buserelina, antagonistas de ácido fólico, goserelina, antagonistas de

hormonas, Hycamtin, hidroxiiurea, inhibidores de mitosis, tamoxifeno, testolactona, sirolimus (rapamicina), everolimus, pimecrolimus, somatostatina, tacrolimus, roxitromicina, dunaimicina, ascomicina, bafilomicina, eritromicina, midecamicina, josamicina, concanamicina, claritromicina, troleandomicina, folimicina, cerivastatina, simvastatina, lovastatina, fluvastatina, rosuvastatina, atorvastatina, pravastatina, pitavastatina, 4-hidroxioxíciclofosfamida, trofosfamida, bendamustina, timosina α -1, aclarrubicina, 5'-dihidrogenofosfato de fludarabina, antagonistas de bases purínicas y pirimidínicas, hidroxycarbamida, aldesleucina, pegaspargasa, letrozol, aminoglutetimida, adriamicina, azitromicina, espiramicina, cefarantina, epotilona A y B, mitoxantrona, azatioprina, miconofenolato mofetil, c-myc-antisentido, b-myc-antisentido, ácido betulínico, camptotecina, derivados de camptotecina, hormona estimulante de melanocitos (α -MSH), proteína C activada, inhibidor de IL1- β , ácido fumárico y sus ésteres, dermucidina, calcipotriol, tacalcitol, lapachol, β -lapachona, podofilotoxina, betulina, 2-etilhidrazida de ácido podofílico, molgramostim (rhuGM-CSF), peginterferón α -2b, lenograstim (r-HuG-CSF), filgrastim, macrogol, dacarbazina, cefalomanina, trastuzumab, exemestano, basiliximab, daclizumab, selectina (antagonista de citocina), inhibidor de CETP, cadherinas, inhibidores de citocinina, inhibidor de COX-2, NFkB, angiopeptina, ciprofloxacina, camptotecina, fluroblastina, antagonistas de bFGF, probucol, prostaglandinas, 1,11-dimetoxicantín-6-ona, 1-hidroxí-11-metoxicantín-6-ona, escopoletina, colchicina, donadores de NO, tetranitrato de pentaeritrilo, sidoniminas, derivados S-nitrosos, estaurosporina, β -estradiol, α -estradiol, estriol, estrona, etinilestradiol, fosfestrol, medroxiprogesterona, cipionatos de estradiol, benzoatos de estradiol, tranilast, kamebakaurina, verapamilo, inhibidores de tirosina-cinasa (tirfostinas), ciclosporina A, paclitaxel y sus derivados tales como 6- α -hidroxipaclitaxel, bacatina, Taxotere, mofebutazona, acemetacina, diclofenaco, lonazolaco, dapsona, ácido O-carbamoilfenoxiacético, lidocaína, ketoprofeno, ácido mefenámico, piroxicam, meloxicam, fosfato de cloroquina, penicilamina, hidroxícicloroquina, auranofina, aurotiomato de sodio, oxaceprol, celecoxib, β -sitosterol, ademetonina, mirtecaína, polidocanol, nonivamida, levomentol, benzocaína, aescina, elipticina, D-24851 (Calbiochem), colcemida, citocalasina A-E, indanocina, nocodazol, bacitracina, antagonistas de receptor de vitronectina, azelastina, ácidos nucleicos libres, ácidos nucleicos incorporados en portadores víricos, fragmentos de ADN y de ARN, inhibidor de activador de plasminógeno-1, inhibidor de activador de plasminógeno-2, oligonucleótidos antisentido, inhibidores de VEGF, IGF-1, sustancias activas del grupo de los antibióticos tales como cefadroxilo, cefazolina, cefaclor, cefoxitina, tobramicina, gentamicina, penicilinas, dicloxacilina, oxacilina, sulfonamidas, metronidazol, antitrombóticos, argatroban, aspirina, abcximab, antitrombina sintética, bivalirudina, cumadina, enoxaparina, receptor membranario de plaquetas GPIIb/IIIa, anticuerpos contra inhibidor de factor X_a, heparina, hirudina, r-hirudina, PPACK, protamina, prourocinasa, estreptocinasa, warfarina, urocinasa, vasodilatadores, dipiramidol, trapidilo, nitroprusiatos, antagonistas de PDGF, triazolopirimidina, suramina, inhibidores de ECA, captopril, cilazapril, lisinopril, enalapril, losartán, inhibidores de tioproteasa, prostaciclina, vapirost, interferón α , β y γ , antagonistas de histamina, bloqueantes de serotonina, inhibidores de apoptosis, reguladores de apoptosis, NF-kB u oligonucleótidos antisentido Bcl-xL, halofuginona, nifedipino, tocoferol, molsidomina, polifenoles del té, galato de epicatequina, galato de epigallocatequina, ácidos boswélicos y sus derivados, leflunomida, anakinra, etanercept, sulfasalazina, etopósido, dicloxacilina, tetraciclina, triamcinolona, mutamicina, procainimida, ácido retinoico, quinidina, disopiramida, flecanida, propafenona, sotalol, amiodarona, esteroides naturales y preparados sintéticamente tales como briofilina A, inotodiol, maquirósido A, galakinósido, mansonina, estreblósido, hidrocortisona, betametasona, dexametasona, fenoprofeno, ibuprofeno, indometacina, naproxeno, fenilbutazona, aciclovir, ganciclovir, zidovudina, antimicóticos, clotrimazol, flucitosina, griseofulvina, ketoconazol, miconazol, nistatina, terbinafina, cloroquina, mefloquina, quinina, terpenoides naturales, hipocaesculina, C21-angelato de barringtogenol, 14-dehidroagrostistaquina, agrosquerina, agrostistaquina, 17-hidroxiagrostistaquina, ovatoiólidos, ácido 4,7-oxícicloanisomérico, baccarínoides B1, B2, B3 y B7, tumbimósido, bruceanos A, B y C, bruceantínósido C, yadanzíósidos N y P, isodeoxielefantopina, tomenfantopina A y B, coronarina A, B, C y D, ácido ursólico, ácido hiptático A, zeorina, iso-iridogermanal, maitenfoliol, efusantina A, excisanina A y B, longicaurina B, esculponeatina C, kamebaunina, leucamenina A y B, 13,18-deshidro-6-alfa-senecioloixichaparrina, taxamairina A y B, regenilol, triptólido, cimarina, apocimarina, ácido aristolóquico, anopterina, hidroxianopterina, anemonina, protoanemonina, berberina, cloruro de queliburina, cicutoxina, sinococulina, bombestratina A y B, cudraiso flavona A, curcumina, dihidronitidina, cloruro de nitidina, 12-beta-hidroxipregnadien-3,20-diona, bilobol, ginkgol, ácido ginkgólico, helenalina, indicina, indicina-N-óxido, lasiocarpina, inotodiol, glicósido 1a, podofilotoxina, justicidina A y B, larreatina, maloterina, malotocromanol, isobutirilmalotocromanol, maquirósido A, marcantina A, maitansina, licoridicina, margetina, pancratistatina, liriodenina, bispartenolidina, oxoushinsunina, aristolactama-AII, bispartenolidina, periplocósido A, galakinósido, ácido ursólico, deoxipsorospermina, psicorubina, ricina A, sanguinarina, ácido de trigo manwu, metilsorbifolina, cromonas de Spathelia, estizofilina, mansonina, estreblósido, akagerina, dihidrousambarensina, hidroxiusambarina, estricnopentamina, estricnofilina, usambarina, usambarensina, berberina, liriodenina, oxoushinsunina, dafnoretina, laricirresinol, metoxilaricirresinol, siringarresinol, umbeliferona, afromosona, acetilvismiona B, desacetilvismiona A, vismiona A y B.

Por lo tanto, es esencial en la invención que la al menos una sustancia terapéuticamente activa se administra con nanopartículas que pueden penetrar en células, que son absorbidas en gran medida por células tumorales a través de endocitosis. Las nanopartículas, tales como las que se describen también, por ejemplo, en el documento DE 197 26 282 A, son absorbidas en mayor medida por células tumorales, en comparación con células normales. Como se ha podido demostrar mediante pruebas *in vitro* con nanopartículas de óxido de hierro, en determinadas líneas de células tumorales se absorben más de 1.000 pg de hierro en forma de nanopartículas, por célula. En este caso, las nanopartículas son introducidas en las células en grandes volúmenes, como se ha podido demostrar mediante análisis por microscopía electrónica. En ensayos *in vitro* se ha encontrado ahora, sorprendentemente, que

la administración de composiciones farmacéuticas a base de dichas nanopartículas y al menos una sustancia terapéuticamente activa, en particular un citostático o un agente anticanceroso, conduce a un aumento de la eficacia de la sustancia administrada. Este efecto se ha observado también incluso cuando no existe ninguna unión (covalente, iónica o adsorbtiva) entre las nanopartículas y el citostático. Solamente influye en estos resultados una unión entre citostático y nanopartícula si, debido a la reacción de unión, el citostático pierde su eficacia, o si la unión es tan sólida que no se produce liberación alguna del citostático tras la absorción intracelular.

Por tanto, las composiciones farmacéuticas constituidas por las mencionadas nanopartículas y al menos una sustancia terapéuticamente activa son notablemente adecuadas para la profilaxis y el tratamiento de enfermedades cancerosas, úlceras, tumores, carcinomas y en la proliferación de células alteradas.

Como ejemplos de tipos de cánceres y de tumores en los que se pueden emplear las composiciones a base de nanopartículas y sustancia terapéutica, se mencionarán: adenocarcinomas, melanoma coroidal, leucemia aguda, neurinoma del acústico, carcinoma ampular, carcinoma anal, astrocitomas, basalioma, cáncer de páncreas, tumor de tejido conjuntivo, cáncer de vejiga, carcinoma bronquial, carcinoma bronquial no microcítico, cáncer de mama, linfoma de Burkitt, carcinoma de corpus, síndrome de CUP, cáncer del intestino grueso, cáncer del intestino delgado, tumores del intestino delgado, cáncer de ovario, carcinoma de endometrio, ependimoma, tipos de cánceres epiteliales, tumores de Ewing, tumores gastrointestinales, cáncer de la vesícula biliar, carcinomas biliares, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, glioblastomas, tumores ginecológicos, tumores de garganta, nariz y oído, neoplasias hematológicas, leucemia de células pilosas, cáncer de uretra, cáncer de piel, tumores cerebrales (gliomas), metástasis cerebrales, cáncer de testículo, tumor hipofisario, carcinoides, sarcoma de Kaposi, cáncer de laringe, tumor de células germinales, cáncer de huesos, carcinoma colorrectal, tumores de cabeza y cuello (tumores de la región del cuello, la nariz y oído), carcinoma de colon, craneofaringiomas, cáncer en la zona de la boca y en el labio, cáncer de hígado, metástasis hepáticas, leucemia, tumor de párpado, cáncer de pulmón, cáncer de ganglio linfático (de Hodgkin y no Hodgkin), linfomas, cáncer de estómago, melanoma maligno, neoplasma maligno, malignomas del tracto gastrointestinal, carcinoma de mama, cáncer rectal, meduloblastomas, melanoma, meningiomas, enfermedad de Hodgkin, micosis fungoide, cáncer de nariz, neurinoma, neuroblastoma, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, linfomas no Hodgkin, oligodendroglioma, carcinoma de esófago, carcinomas osteolíticos y carcinomas osteoplásticos, osteosarcoma, carcinoma de ovario, carcinoma de páncreas, cáncer de pene, plasmocitoma, carcinoma de epitelio plano de la cabeza y cuello, cáncer de próstata, cáncer de garganta, carcinoma de recto, retinoblastoma, cáncer de vagina, carcinoma de tiroides, enfermedad de Schneeberg, cáncer de esófago, espinalioma, linfoma de células T (micosis fungoide), timoma, carcinoma tubárico, tumores del ojo, cáncer de uretra, tumores urológicos, carcinoma urotelial, cáncer de vulva, aparición de verrugas, tumores de partes blandas, sarcoma de partes blandas, tumor de Wilms, carcinoma cervical y cáncer de lengua.

Son particularmente preferidos los tumores sólidos. Se prefieren adicionalmente carcinomas de próstata, tumores cerebrales, sarcomas, carcinomas cervicales, carcinomas ováricos, carcinomas de mama, carcinomas bronquiales, melanomas, tumores de cabeza y cuello, carcinomas esofágicos, carcinomas rectales, carcinomas pancreáticos, de vejiga y de riñón, metástasis hepáticas, cerebrales y en ganglios linfáticos.

Además, se prefieren particularmente la administración y el uso de las composiciones farmacéuticas conformes a la invención junto con la hipertermia convencional, la hipertermia por fluido magnético o la termoterapia con fluidos magnéticos, radioterapia y/o junto con la quimioterapia convencional. Así, las composiciones conformes a la invención respaldan ventajosamente también a los métodos convencionales para el tratamiento del cáncer.

Por consiguiente, la presente invención también se dirige a combinaciones de una composición farmacéutica conforme a la invención e hipertermia, termoterapia, radioterapia y/o quimioterapia.

Como ejemplo de una de tales combinaciones se mencionará el uso de una composición farmacéutica conforme a la invención junto con hipertermia por fluido magnético o, respectivamente, termoterapia con fluidos magnéticos. En este caso, un campo magnético variable actúa como excitación externa que, en el caso de nanopartículas superparamagnéticas, desencadena diferentes procesos de relajación de las nanopartículas. Estos procesos dan lugar, entre otras cosas, a un calentamiento de las nanopartículas y su entorno. Según la invención, estos procesos desencadenados por el campo magnético variable se utilizan para calentar las células degeneradas, con lo que la sustancia terapéuticamente activa puede conducir aún más rápidamente a la muerte de esa célula.

Por tanto, las composiciones farmacéuticas se emplean para el tratamiento y también la profilaxis de enfermedades caracterizadas por especies celulares degeneradas o células extrañas al cuerpo, y en las que se utilizan las propiedades de las nanopartículas según la invención para, por una parte, discriminar entre células extrañas o respectivamente degeneradas y células propias del cuerpo, sanas, y por otra parte introducir sustancias terapéuticamente activas en estas células. Son células degeneradas, en particular, células cancerosas o células que están alteradas en su proliferación, así como también tejido estenótico o restenótico. Como células extrañas al cuerpo se mencionarán, en particular, bacterias.

La eficacia de estas sustancias activas se incrementa gracias a la propiedad de las nanopartículas de poder introducir sustancias activas en células degeneradas. Si además se combina la administración de la composición farmacéutica que comprende nanopartículas y sustancia terapéuticamente activa, con radioterapia o quimioterapia, o

con hipertermia o hipertermia y quimioterapia, o con hipertermia y radioterapia, se puede mejorar aún más la eficacia del tratamiento.

Por tanto, según la invención se aumenta la eficacia de las sustancias activas como consecuencia de una concentración local, locorregional o intracelular incrementada de sustancia activa y se reduce la toxicidad sistémica y efectos secundarios de la sustancia terapéuticamente activa.

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra células RUSIRS1 3 horas después de la adición de mitomicina en NaCl al 0,9%

La Figura 2 muestra células RUSIRS1 3 horas después de la adición de mitomicina en NaCl al 0,9% + nanopartículas

La Figura 3 muestra células RUSIRS1 24 horas después de la adición de mitomicina en NaCl al 0,9%

La Figura 4 muestra células RUSIRS1 24 horas después de la adición de mitomicina en NaCl al 0,9% + nanopartículas

La Figura 5 muestra células RUSIRS1 48 horas después de la adición de mitomicina en NaCl al 0,9%

La Figura 6 muestra células RUSIRS1 48 horas después de la adición de mitomicina en NaCl al 0,9% + nanopartículas

La Figura 7 muestra células RUSIRS1 después de 48 horas (testigo)

La Figura 8 muestra células BT20 después de 72 horas, como testigo, con cefamandol pero sin nanopartículas

La Figura 9 muestra células BT20 tras 72 horas de incubación con nanopartículas y cefamandol

La Figura 10 muestra células BT20 tras 72 horas de incubación con nanopartículas y cefamandol

La Figura 11 muestra células WiDr después de 72 horas, como testigo, con cefamandol pero sin nanopartículas

La Figura 12 muestra células WiDr tras 72 horas de incubación con nanopartículas y cefamandol

La Figura 13 muestra células WiDr tras 72 horas de incubación con nanopartículas y cefamandol

EJEMPLOS

Ejemplo 1:

Aumento de la eficacia del citostático mitomicina (*in vitro*)

Mediante pruebas *in vitro* se ha podido demostrar el aumento de la eficacia de la mitomicina para combatir células tumorales. Las pruebas *in vitro* se realizaron con la línea celular de glioblastoma humano RUSIRS1 (tumor cerebral). Se extrajeron las células de glioblastoma del tejido tumoral de un paciente como se describe en el documento DE 199 12 798 C1 y se cultivaron. Para probar la eficacia de la mezcla de mitomicina y nanopartículas se prepararon en cada caso 2×10^6 células RUSIRS1 en un frasco de cultivo celular de 75 cm^3 con 25 ml de medio de cultivo celular (D-MEM + FBS al 20% + 1,2 ml de piruvato). A esta suspensión celular se añadieron 136 μl de fluido magnético MFL AS M01 (nanopartículas de óxido de hierro con un revestimiento de N-(2-aminoetil)-3-(trimetoxisilil)propilamina policondensada, fabricante: MagForce Nanotechnologies GmbH, Berlín) ($C_{\text{Fe}} = 2 \text{ mol/l}$) y 390 μl de disolución de mitomicina (1 mg/ml en NaCl al 0,9%). Antes de añadirlas a las células, se calentaron las muestras a 37°C durante 15 minutos y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se preparó de la misma forma una muestra testigo, con mitomicina pero sin nanopartículas.

La influencia de las nanopartículas sobre la eficacia de la mitomicina se puede ilustrar por medio de las Figuras 1-6. Las células a las que se había añadido exclusivamente una disolución de mitomicina solo mostraron un daño considerable tras 48 horas de incubación. Por el contrario, las células que se habían incubado con el citostático y las partículas mostraron ya un daño considerable transcurridas 3 horas. La absorción de las nanopartículas de óxido de hierro en las células se puede demostrar por una coloración marrón de la célula. Los experimentos comparativos han demostrado que las nanopartículas solas (sin mitomicina) también son absorbidas, pero no conducen a un daño celular tan elevado. Solamente aparece un daño celular rápido (al cabo de 3 horas) si están presentes al mismo tiempo partículas y mitomicina. Por tanto, mediante la endocitosis de las partículas también se ha introducido mitomicina, lo que ha conducido al daño celular significativo.

Ejemplo 2:

Aumento de la eficacia del antibiótico cefamandol (*in vitro*)

El cefamandol (n.º CAS 30034-03-8) se utiliza para combatir infecciones bacterianas. En el año 2000 se encontró, sorprendentemente, una eficacia contra células cancerosas en material de biopsia de metástasis hepáticas (MagForce Nanotechnologies). Sin embargo, el potencial de esta sustancia para combatir células cancerosas debe considerarse bastante bajo. Los experimentos de los autores han demostrado que, por regla general, el daño a células tumorales (*in vitro*), solamente comienza a partir de una concentración de 0,5 mg/ml (concentración en el medio de cultivo celular). Sin embargo, es posible aumentar drásticamente la eficacia del cefamandol para combatir células tumorales mediante la administración simultánea de nanopartículas.

Los experimentos *in vitro* se llevaron a cabo con las líneas celulares BT20 (carcinoma de mama) y WiDr (carcinoma de colon). Se extrajeron las células tumorales del tejido tumoral de un paciente como se describe en el documento DE 199 12 798 C1, y se cultivaron. Para probar la eficacia de la mezcla de cefamandol y nanopartículas se prepararon en cada caso 2×10^6 células en un frasco de cultivo celular de 75 cm^3 con 25 ml de medio de cultivo celular (RPMI + FBS al 10% + 1,2 ml de piruvato para células WiDr, y respectivamente BME + FBS al 10% + piruvato + 5 ml de aminoácidos no esenciales + 5 ml de glutamina para células BT20). A esta suspensión celular se añadieron 136 µl de fluido magnético MFL AS M01 (nanopartículas de óxido de hierro con un revestimiento de N-(2-aminoetil)-3-(trimetoxisilil)propilamina policondensada, fabricante: MagForce Nanotechnologies AG, Berlín) ($C_{Fe} = 2 \text{ mol/l}$) y 390 µl de disolución de cefamandol (disolución madre 1 mg/ml en NaCl al 0,9%). Por lo tanto, la concentración de cefamandol en el medio de cultivo celular (25 ml) era 0,016 mg/ml, es decir, claramente por debajo del umbral de eficacia del cefamandol puro.

Tras 72 horas de incubación se pudo observar un daño celular considerable, como evidencian las Figuras 7-12. En el caso de BT20, al cabo de 72 horas habían muerto 30,5% de las células, y 24% en el caso de WiDr. Ni mediante el cefamandol en la concentración seleccionada, ni mediante las nanopartículas solas, se produce muerte celular (0% de células muertas). Sólo mediante la combinación de cefamandol y nanopartículas se obtiene, por la introducción de cefamandol en las células, este daño significativo de las células tumorales.

Ejemplo 3

Preparación de una composición farmacéutica a base de nanopartículas, sustancia activa farmacológica y disolvente

Se añaden aproximadamente 1 mg de citostático (o de 1 a 10 mmol, preferiblemente de 2 a 6 mmol de citostático) a 1 ml de una dispersión acuosa de nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas (concentración de hierro 2 mol/l).

Si el citostático no es suficientemente soluble en agua, se pueden emplear codisolventes en una cantidad de hasta 20% en volumen de la disolución. Se pueden emplear como codisolventes DMSO, DMS, etanol, acetato de etilo u otros disolventes fisiológicamente tolerables.

Ejemplo 4

A 1 ml del fluido magnético MFL AS M01 (nanopartículas de óxido de hierro con un revestimiento de N-(2-aminoetil)-3-(trimetoxisilil)propilamina policondensada, fabricante: MagForce Nanotechnologies AG, Berlín) ($C_{Fe} = 2 \text{ mol/l}$) se añadieron y mezclaron concienzudamente 1 mg de carmustina o 1 mg de cisplatino o 1 mg de epirrubicina o 1,5 mg de gemcitabina o 1 mg de imatinib o 0,8 mg de Paclitaxel o 1,2 mg de vinblastina o 1 mg de vincristina o 1,5 mg de adriamicina o 1 mg de oxacilina o 1 mg de tetraciclina o 1 mg de temozolomida.

Ejemplo 5

Aumento de la eficacia del citostático mitoxantrona (*in vitro*)

Se cultivaron células primarias de carcinoma de próstata como se describe en el documento DE 199 12 798 C1. Para probar la eficacia de una mezcla de mitoxantrona y nanopartículas se prepararon en cada caso 2×10^6 células en un frasco de cultivo celular de 75 cm^3 con 25 ml de medio de cultivo celular. A esta suspensión celular se añadieron 136 µl de fluido magnético MFL AS M01 (nanopartículas de óxido de hierro con un revestimiento de N-(2-aminoetil)-3-(trimetoxisilil)propilamina policondensada, fabricante: MagForce Nanotechnologies AG, Berlín) ($C_{Fe} = 2 \text{ mol/l}$) y 390 µl de disolución de mitoxantrona (disolución madre 1 mg/ml en NaCl al 0,9%). Tras 72 horas de incubación se observó un daño celular considerable. También se puede verificar un efecto similar con los citostáticos epirrubicina y docetaxel (disueltos en sorbitol polioxietilado, polisorbato 80).

Ejemplo 6

Aumento de la eficacia del citostático 5-fluorouracilo (*in vitro*)

Se cultivaron células primarias de carcinoma rectal como se describe en el documento DE 199 12 798 C1. Para probar la eficacia de una mezcla de 5-fluorouracilo y nanopartículas se prepararon en cada caso 2×10^6 células en un frasco de cultivo celular de 75 cm^3 con 25 ml de medio de cultivo celular. A esta suspensión celular se añadieron 136 µl de fluido magnético MFL AS M01 (nanopartículas de óxido de hierro con un revestimiento de N-(2-aminoetil)-3-(trimetoxisilil)propilamina policondensada, fabricante: MagForce Nanotechnologies AG, Berlín) ($C_{Fe} = 2 \text{ mol/l}$) y 390 µl

de disolución de 5-fluorouracilo (disolución madre 1 mg/ml en NaCl al 0,9%). Tras 72 horas de incubación se observó un daño celular considerable. También se puede verificar un efecto similar con los citostáticos irinotecán y oxaliplatino.

Ejemplo 7

5 Aumento de la eficacia del citostático carboplatino (*in vitro*)

Se cultivaron células primarias de carcinoma bronquial (carcinoma bronquial no microcítico, CBNM) como se describe en el documento DE 199 12 798 C1. Para probar la eficacia de una mezcla de carboplatino y nanopartículas se prepararon en cada caso 2×10^6 células en un frasco de cultivo celular de 75 cm³ con 25 ml de medio de cultivo celular. A esta suspensión celular se añadieron 136 µl de fluido magnético MFL AS M01 (nanopartículas de óxido de hierro con un revestimiento de N-(2-aminoetil)-3-(trimetoxisilil)propilamina policondensada, fabricante: MagForce Nanotechnologies AG, Berlín) ($c_{Fe} = 2 \text{ mol/l}$) y 390 µl de disolución de carboplatino (disolución madre 1 mg/ml en NaCl al 0,9%). Tras 72 horas de incubación se observó un daño celular considerable. También se puede verificar un efecto similar con los citostáticos gemcitabina y docetaxel (disueltos en sorbitol polioxielilado, polisorbato 80).

15 Ejemplos 8-196

De manera análoga al procedimiento experimental del Ejemplo 2, se ensayaron *in vitro*, con las sustancias activas indicadas en la Tabla 1, las 7 líneas celulares: a) línea celular de glioblastoma humano RUSIRS1; b) líneas celulares de carcinoma de mama BT20; c) línea celular de carcinoma de colon WiDR; d) células de carcinoma bronquial CBNM, e) células de carcinoma de recto y f) línea celular de carcinoma de próstata DU145.

20 En todos los casos se evidenció un aumento de la actividad del citostático. La acción potenciadora de la actividad se indica entre paréntesis debajo del citostático respectivo, significando (+) un incremento de aproximadamente 5% a 80% y (++) un aumento de 80% a 500%.

Tabla 1: Aumento de la actividad de citostáticos

Línea celular de glioblastoma humano RUSIRS1	Líneas celulares de carcinoma de mama BT20	Línea celular de carcinoma de colon WiDR	Células de carcinoma bronquial CBNM	Células de carcinoma de recto	Línea celular de carcinoma de próstata DU145	Línea celular de neuroglioma H4
letrozol (+)	letrozol (+)	letrozol (+)	letrozol (+)	letrozol (+)	letrozol (+)	letrozol (+)
tamoxifeno (+)	tamoxifeno (+)	tamoxifeno (++)	tamoxifeno (+)		tamoxifeno (+)	tamoxifeno (+)
somatostatina (+)		somatostatina (+)	somatostatina (+)	somatostatina (+)	somatostatina (++)	somatostatina (+)
tacrolimus (+)	tacrolimus (+)		tacrolimus (+)	tacrolimus (+)	tacrolimus (+)	tacrolimus (++)
ascomicina (++)	ascomicina (+)	ascomicina (+)	ascomicina (+)	ascomicina (+)	ascomicina (+)	
cerivastatina (+)	cerivastatina (+)	cerivastatina (+)	cerivastatina (+)	cerivastatina (++)	cerivastatina (+)	cerivastatina (+)
simvastatina (+)	simvastatina (+)	simvastatina (+)	simvastatina (++)	simvastatina (+)	simvastatina (+)	simvastatina (+)
bendamustina (+)	bendamustina (+)		bendamustina (+)		bendamustina (+)	
tobramicina (+)	tobramicina (+)	tobramicina (+)	tobramicina (+)	tobramicina (+)	tobramicina (+)	tobramicina (+)
ganciclovir (++)	ganciclovir (+)	ganciclovir (+)	ganciclovir (+)	ganciclovir (+)	ganciclovir (+)	ganciclovir (+)
aciclovir (+)	aciclovir (+)	aciclovir (+)	aciclovir (+)	aciclovir (++)	aciclovir (+)	aciclovir (+)

Línea celular de glioblastoma humano RUSIRS1	Líneas celulares de carcinoma de mama BT20	Línea celular de carcinoma de colon WiDR	Células de carcinoma bronquial CBNM	Células de carcinoma de recto	Línea celular de carcinoma de próstata DU145	Línea celular de neuroglioma H4
ibuprofeno (+)	ibuprofeno (+)	ibuprofeno (++)	ibuprofeno (+)	ibuprofeno (+)	ibuprofeno (+)	ibuprofeno (+)
paclitaxel (+)	paclitaxel (++)	paclitaxel (+)	paclitaxel (+)	paclitaxel (+)	paclitaxel (+)	paclitaxel (+)
diclofenaco (+)		diclofenaco (+)	diclofenaco (+)	diclofenaco (++)	diclofenaco (+)	diclofenaco (+)
azelastina (+)	azelastina (+)			azelastina (+)	azelastina (+)	azelastina (+)
oxacilina (+)	oxacilina (+)	oxacilina (++)	oxacilina (+)	oxacilina (+)	oxacilina (++)	oxacilina (+)
nifedipino (+)	nifedipino (+)	nifedipino (+)	nifedipino (+)		nifedipino (+)	nifedipino (+)
leflunomida (+)	leflunomida (+)	leflunomida (+)	leflunomida (+)	leflunomida (+)	leflunomida (+)	leflunomida (+)
tetraciclina (+)	tetraciclina (+)	tetraciclina (+)	tetraciclina (+)	tetraciclina (++)	tetraciclina (++)	tetraciclina (+)
rapamicina (+)	rapamicina (++)	rapamicina (+)	rapamicina (+)	rapamicina (++)	rapamicina (+)	rapamicina (+)
imatinib (+)	imatinib (+)	imatinib (++)	imatinib (+)	imatinib (+)	imatinib (+)	imatinib (+)
vincristina (+)	vincristina (++)	vincristina (+)	vincristina (++)	vincristina (++)	vincristina (+)	vincristina (+)
gemcitabina (+)	gemcitabina (+)	gemcitabina (+)	gemcitabina (++)	gemcitabina (+)	gemcitabina (+)	gemcitabina (+)
cladribina (+)	cladribina (+)	cladribina (++)	cladribina (++)		cladribina (+)	cladribina (+)
idarrubicina (++)	idarrubicina (+)	idarrubicina (+)	idarrubicina (++)	idarrubicina (+)	idarrubicina (+)	idarrubicina (+)
busulfán (+)		busulfán (+)	busulfán (++)		busulfán (+)	busulfán (+)
clorambucilo (+)	clorambucilo (+)	clorambucilo (++)	clorambucilo (+)	clorambucilo (+)	clorambucilo (+)	clorambucilo (++)
carmustina (+)	carmustina (+)	carmustina (+)	carmustina (++)	carmustina (+)	carmustina (+)	carmustina (+)
cisplatino (+)	cisplatino (+)	cisplatino (+)	cisplatino (++)	cisplatino (+)	cisplatino (+)	cisplatino (++)

REIVINDICACIONES

1. Nanopartículas para uso en un procedimiento para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades cancerosas, úlceras, tumores, carcinomas o en la proliferación de células anormales, presentando las nanopartículas una carga superficial positiva, administrándose las nanopartículas junto con un agente anticanceroso de manera que las nanopartículas y el agente anticanceroso están presentes simultáneamente en la célula degenerada, y administrándose las nanopartículas y el agente anticanceroso en disoluciones separadas.
2. Nanopartículas para el uso según la reivindicación 1, caracterizadas por que las nanopartículas son nanopartículas magnéticas, preferiblemente de un material magnético, un material ferromagnético, antiferromagnético, ferrimagnético, antiferrimagnético o superparamagnético.
3. Nanopartículas para el uso según una de las reivindicaciones 1 a 2, presentando las nanopartículas un revestimiento de materiales que se pueden polarizar positivamente y/o ionizar positivamente.
4. Nanopartículas para el uso según la reivindicación 3, presentando las sustancias que se pueden polarizar positivamente y/o ionizar positivamente grupos amino y/o átomos de nitrógeno.
5. Nanopartículas para el uso según la reivindicación 3 o 4, consistiendo el revestimiento en sustancias biológicamente estables o respectivamente biológicamente inertes o respectivamente bioestables, preferiblemente polímeros, en particular aminosilanos policondensados, en particular 3-aminopropiltrimetoxisilano, 2-aminoetil-3-aminopropiltrimetoxisilano, trimetoxisililpropildietilentriamina o N-(6-aminohexil)-3-aminopropiltrimetoxisilano.
6. Nanopartículas para el uso según una de las reivindicaciones precedentes, consistiendo las nanopartículas en óxido de hierro, magnetita, maghemita o $M(II)Fe_2O_4$, donde M representa Zn, Cu, Co, Ni, Cd, Ba o Mn.
7. Nanopartículas para el uso según una de las reivindicaciones precedentes, presentando las nanopartículas un diámetro medio de 15 nm o bien situándose en el intervalo de tamaños de 1 - 100 nm, preferiblemente en el intervalo de 10 - 20 nm.
8. Nanopartículas para el uso según una de las reivindicaciones precedentes, empleándose las nanopartículas en el marco de una hipertermia, hipertermia por fluido magnético, termoterapia con fluidos magnéticos, radioterapia y/o quimioterapia.
9. Nanopartículas para el uso según una de las reivindicaciones precedentes, siendo el agente anticanceroso un citostático, sustancia activa citotóxica, sustancia activa antiproliferativa, sustancia activa antiflogística, sustancia activa antimigración, sustancia activa antiangiogénica, sustancia activa antiinflamatoria, sustancia activa antibacteriana o un inhibidor de microtúbulos.
10. Nanopartículas para el uso según una de las reivindicaciones precedentes, seleccionándose el agente anticanceroso del grupo que comprende: actinomicina D, aminoglutetimida, amsacrina, anastrozol, antagonistas de bases purínicas y pirimidínicas, antraciclinas, inhibidores de aromatasa, asparaginasa, antiestrógenos, bexaroteno, bleomicina, buserelina, busulfán, derivados de camptotecina, capecitabina, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino, cladribina, ciclofosfamida, citarabina, arabinósido de citosina, citostáticos alquilantes, dacarbazina, dactinomicina, daunorrubicina, docetaxel, doxorubicina (adriamicina), doxorubicina lipo, epirubicina, estramustina, etopósido, exemestano, fludarabina, fluorouracilo, antagonistas de ácido fólico, formestano, gemcitabina, glucocorticoides, goserelina, hormonas y antagonistas de hormonas, Hycamtin, hidroxiurea, idarrubicina, ifosfamida, imatinib, irinotecán, letrozol, leuprorelina, lomustina, melfalán, mercaptopurina, metotrexato, miltefosina, mitomicina, sustancias inhibidoras de mitosis, mitoxantrona, nimustina, oxaliplatino, paclitaxel, pentostatina, procarbazona, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido, testolactona, tiotepa, tioguanina, inhibidores de topoisomerasa, topotecán, treosulfán, tretinoína, triptorrelina, trofosfamida, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, antibióticos con acción citostática, actinomicina D, aminoglutetimida, antraciclinas, inhibidores de aromatasa, antiestrógenos, buserelina, antagonistas de ácido fólico, goserelina, antagonistas de hormonas, Hycamtin, hidroxiurea, letrozol, sustancias inhibidoras de mitosis, tamoxifeno, testolactona, sirolimus (rapamicina), everolimus, pimecrolimus, somatostatina, tacrolimus, roxitromicina, dunaimicina, ascomicina, bafilomicina, eritromicina, midecamicina, josamicina, concanamicina, claritromicina, troleandomicina, folimicina, cerivastatina, simvastatina, lovastatina, fluvastatina, rosuvastatina, atorvastatina, pravastatina, pitavastatina, 4-hidroxioxibiciclofosfamida, trofosfamida, bendamustina, timosina α -1, aclarrubicina, 5'-dihidrogenofosfato de fludarabina, antagonistas de bases purínicas y pirimidínicas, hidroxycarbamida, aldesleucina, pegaspargasa, letrozol, aminoglutetimida, adriamicina, azitromicina, espiramicina, cefarantina, epotilona A y B, mitoxantrona, azatioprina, micofenolato mofetilo, c-myc-antisentido, b-myc-antisentido, ácido betulínico, camptotecina, derivados de camptotecina, hormona estimulante de melanocitos (α -MSH), proteína C activada, inhibidor de IL1- β , ácido fumárico y sus ésteres, dermicitina, calcipotriol, tacalcitol, lapachol, β -lapachona, podofilotoxina, betulina, 2-etilhidrazida de ácido podofílico, molgramostim (rhuGM-CSF), peginterferón α -2b, lanogastim (r-HUG-CSF), filgrastim, macrogol, dacarbazona, letrozol, goserelina, cefalomanina, trastuzumab, exemestano, basiliximab, daclizumab, selectina (antagonista de citocina), inhibidor de CETP, cadherinas, inhibidores de citocinina, inhibidor de COX-2, NFkB, angiopeptina, ciprofloxacina, camptotecina, fluroblastina, antagonistas de bFGF, probucol, prostaglandinas, 1,11-dimetoxicantín-6-ona, 1-hidroxi-11-metoxicantín-6-ona, escopoletina, colchicina, donadores de NO, tetranitrato de pentaeritrilo, sidoniminas, derivados S-nitrosos, tamoxifeno,

- estaurosporina, β -estradiol, α -estradiol, estriol, estrona, etinilestradiol, fosfestrol, medroxiprogesterona, cipionato de estradiol, benzoato de estradiol, tranilast, kamebakaurina, verapamilo, inhibidores de tirosina-cinasa (tirfostinas), ciclosporina A, paclitaxel y sus derivados tales como 6- α -hidroxipaclitaxel, baccatina, Taxotere, mofebutazona, acemetacina, diclofenaco, lonazolaco, dapsona, ácido O-carbamoilfenoxiacético, lidocaína, ketoprofeno, ácido mefenámico, piroxicam, meloxicam, fosfato de cloroquina, penicilamina, hidroxiclороquina, auranofina, aurotiomalato de sodio, oxaceprol, celecoxib, β -sitosterol, ademetonina, mirtecaina, polidocanol, nonivamida, levomentol, benzocaína, aescina, elipticina, D-24851 (Calbiochem), colcemida, citocalasina AE, indanocina, nocadazol, bacitracina, antagonistas de receptor de vitronectina, azelastina, ácidos nucleicos libres, ácidos nucleicos incorporados en portadores víricos, fragmentos de ADN y ARN, inhibidor de activador de plasminógeno-1, el inhibidor de activador de plasminógeno-2, oligonucleótidos antisentido, inhibidores de VEGF, IGF-1, sustancias activas del grupo de los antibióticos tales como cefadroxilo, cefazolina, cefaclor, cefoxitina, tobramicina, gentamicina, penicilinas, dicloxacilina, oxacilina, sulfonamidas, metronidazol, antitrombóticos, argatrobán, aspirina, abciximab, antitrombina sintética, bivalirudina, cumadina, enoxaparina, receptor membranario de plaquetas GPIIb/IIIa, anticuerpos contra inhibidor de factor X_a , heparina, hirudina, r-hirudina, PPACK, protamina, prourocinasa, estreptocinasa, warfarina, urocinasa, vasodilatadores, dipiramidol, trapidilo, nitroprusiatis, antagonistas de PDGF, triazolopirimidina, seramina, inhibidores de ECA, captopril, cilazapril, lisinopril, enalapril, losartán, inhibidores de tioproteasa, prostaciclina, vapirost, interferón α , β y γ , antagonistas de histamina, bloqueantes de serotonina, inhibidores de apoptosis, reguladores de apoptosis, oligonucleótidos antisentido NF- κ B o Bcl-xL, halofuginona, nifedipino, tocoferol, tranirast, molsidomina, polifenoles del té, galato de epicatequina, galato de epigallocatequina, ácidos boswélicos y sus derivados, leflunomida, anakinra, etanercept, sulfasalazina, etopósido, dicloxacilina, tetraciclina, triamcinolona, mutamicina, procainamida, ácido retinoico, quinidina, disopiramida, flecaína, propafenona, sotalol y amidorona, esteroides naturales y preparados sintéticamente tales como briofilina A, inotodiol, maquirósido A, galakinósido, mansonina, estreblósido, hidrocortisona, betametasona, dexametasona, fenoprofeno, ibuprofeno, indometacina, naproxeno, fenilbutazona, aciclovir, ganciclovir, zidovudina, antimicóticos, clotrimazol, flucitosina, griseofulvina, ketoconazol, miconazol, nistatina, terbinafina, cloroquina, mefloquina, quinina, terpenoides naturales, hipocaesulina, C21-angelato de barringtogenol, 14-dehidroagrostistaquina, agrosquerina, agrostistaquina, 17-hidroxiagrostistaquina, ovatiódidos, ácido 4,7-oxicicloanisomérico, baccarinoides B1, B2, B3 y B7, tubeimósido, bruceanos A, B y C, bruceantinósido C, yadanziosidos N y P, isodeoxielefantopina, tomenfantopina A y B, coronarina A, B, C y D, ácido ursólico, ácido hiptático A, zeorina, iso-iridogermanal, maitenfoliol, efusantina A, excisanina A y B, longicaurina B, esculponeatina C, kamebaunina, leucamenina A y B, 13,18-deshidro-6- α -senecioloiloxichaparrina, taxamairina A y B, regenilol, triptólido, cimarina, apocimarina, ácido aristolóquico, anopterina, hidroxianopterina, anemonina, protoanemonina, berberina, cloruro de queliburina, cicutoxina, sinococulina, bombrestatina A y B, cudraisoflavona A, curcuma, dihidronitidina, cloruro de nitidina, 12- β -hidroxipregnadien-3,20-diona, bilobol, ginkgol, ácido ginkgólico, helenalina, indicina, indicina-N-óxido, lasiocarpina, inotodiol, glicósido 1a, podofilotoxina, justicidina A y B, larreatina, maloterina, malotocromanol, isobutirilmalotocromanol, maquirósido A, marcantina A, maitansina, licoridicina, margetina, pancratistatina, liriordenina bispartenolidina, oxoushinsunina, aristolactama-IIA, bispartenolidina, periplocósido A, galakinósido, ácido ursólico, deoxipsorospermina, psicorubina, ricina A, sanguinarina, ácido de trigo Manwu, metilsorbifolina, cromonas de Spathelia, estizofilina, mansonina, estreblósido, akagerina, dihidrousambarensina, hidroxiusambarina, estricnopentamina, estricnofilina, usambarina, usambarensina, berberina, liriordenina, oxoushinsunina, dafnoretina, laricirresinol, metoxilaricirresinol, siringarresinol, umbeliferona, afromosona, acetilvismiona B, desacetilvismiona A, vismiona A y B.
11. Nanopartículas para el uso según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizadas por que las nanopartículas presentan una afinidad hacia células degeneradas.
12. Nanopartículas para el uso según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizadas por que los tumores son un tumor sólido, preferiblemente carcinomas de próstata, tumores cerebrales, sarcomas, carcinomas cervicales, carcinomas ováricos, carcinomas de mama, carcinomas bronquiales, melanomas, tumores de cabeza y cuello, carcinomas esofágicos, carcinomas rectales, carcinomas pancreáticos, de vejiga y de riñón, metástasis hepáticas, cerebrales o en ganglios linfáticos



Figura 1

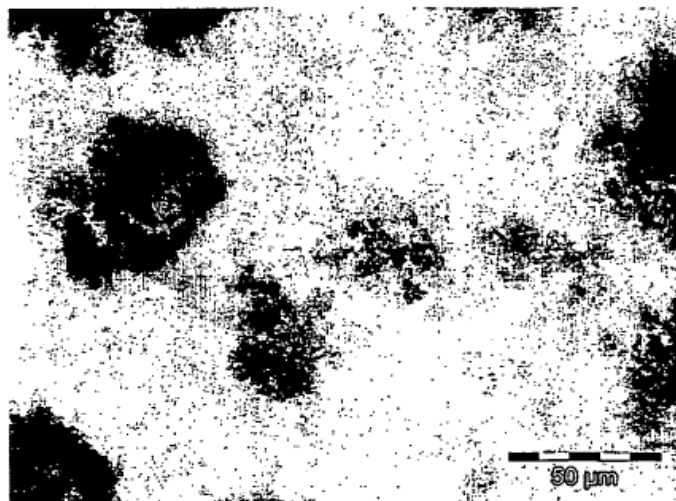


Figura 2

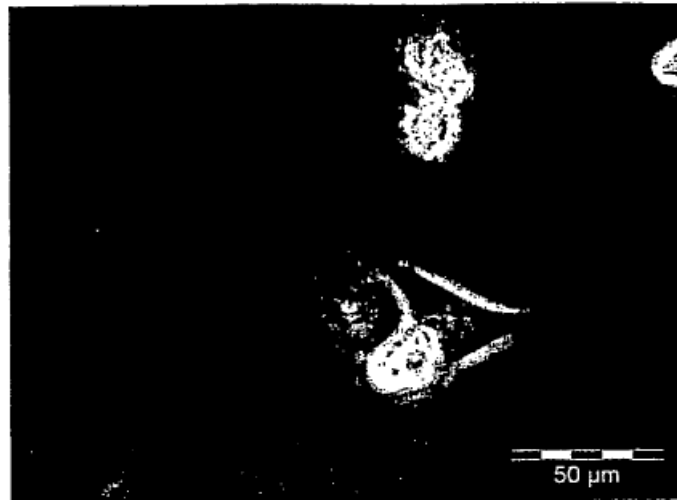


Figura 3

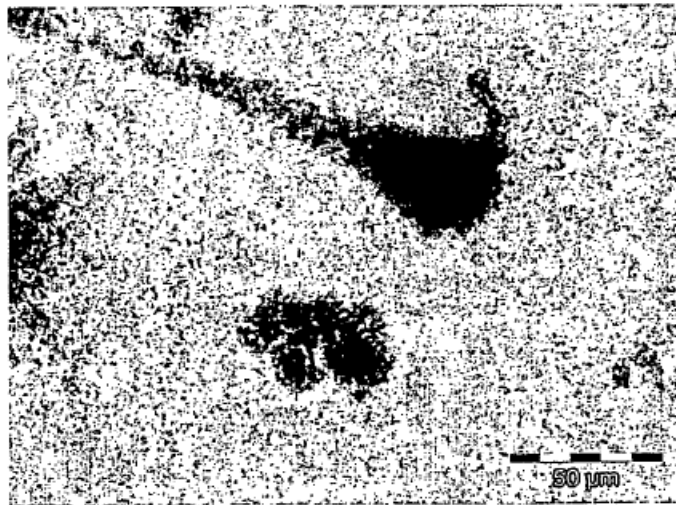


Figura 4

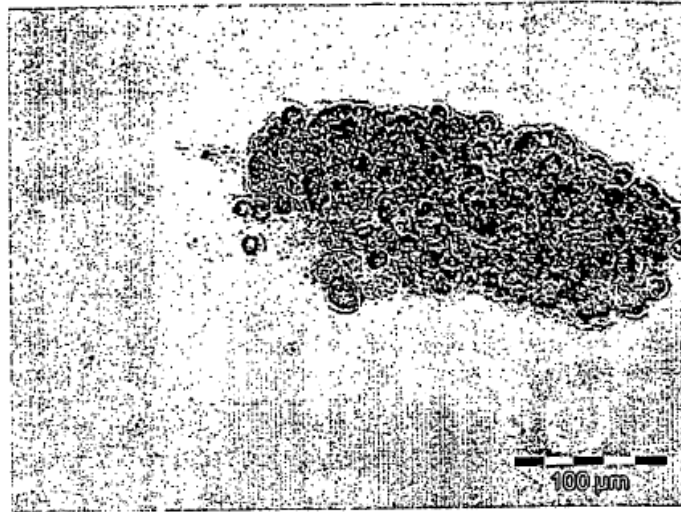


Figura 5

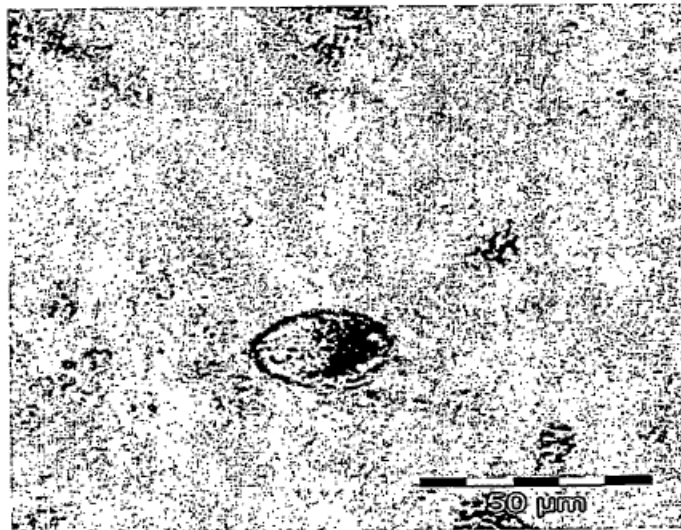


Figura 6



Figura 7

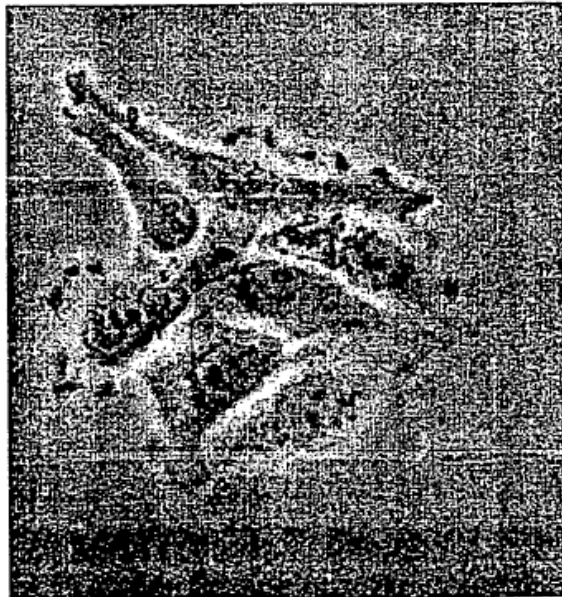


Figura 8



Figura 9



Figura 10

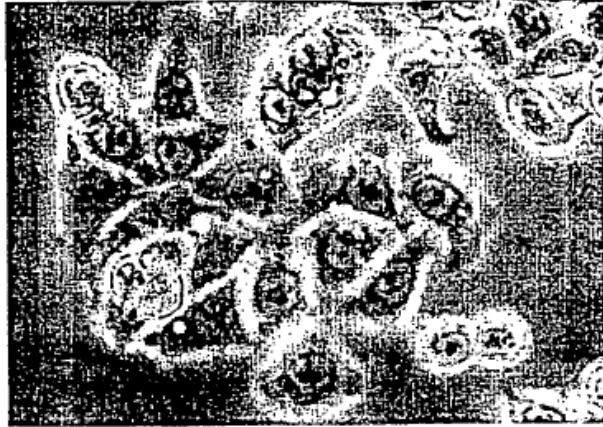


Figura 11

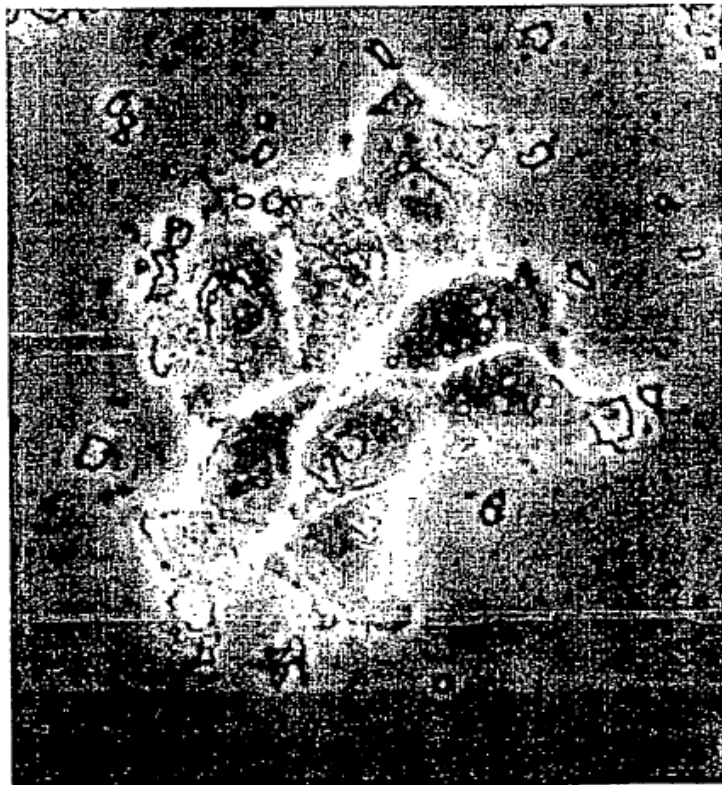


Figura 12

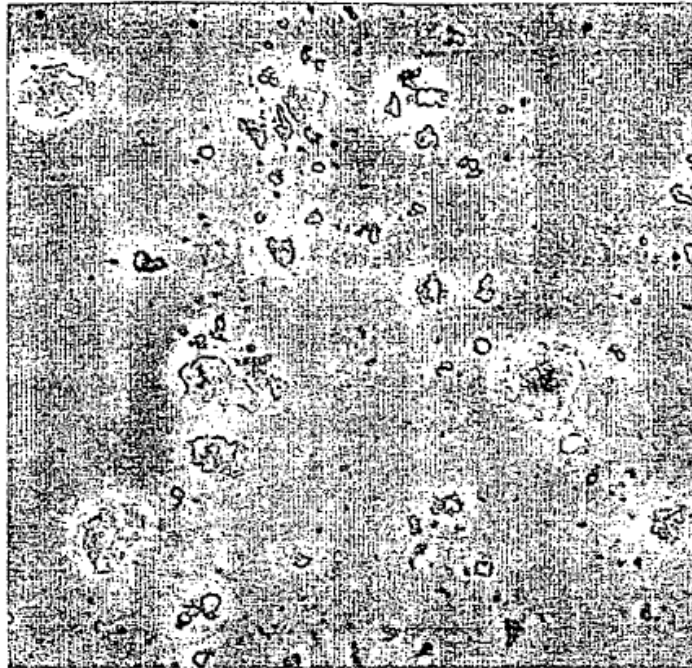


Figura 13