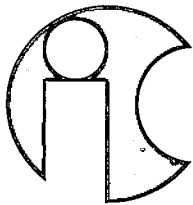


CMS



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-026546- -00000-0000

Fecha: 2014-02-07 16:41:30 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 113

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO _____
AGLOMERACION DE NANOPARTICULAS RECUBIERTAS CON
ALCOXISILANO MAGNETICO

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____
MAGFORCE AG

DOMICILIO _____
BERLIN , ALEMANIA

74. APODERADO _____
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C,C 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C., _____



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-026546- -00000-0000

Fecha: 2014-02-07 16:41:30 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 113

cación

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención	☐ Patente de Modelo de Utilidad
		☐ Capítulo I	☒ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
	Solicitud Internacional No.	PCT/EP2012/003381	Fecha 2012/08/07
	Publicación Internacional No.	WO 2013/020701 A3	Fecha 2013/02/14
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN		
	AGLOMERACION DE NANOPARTICULAS RECUBIERTAS CON ALCOXISILANO MAGNETICO		
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
	H01F 001/000		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
	APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
	MAGFORCE AG		
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
	DIRECCIÓN	Max-Planck-Straße 3, 12489 Berlin,	No. TELÉFONO 3 47 36 11
	CIUDAD	Alemania	
	DEPARTAMENTO/ESTADO	Berlin	CORREO ELECTRÓNICO clientes@cavelier.com
	PAÍS DE RESIDENCIA	Alemania	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN Alemania
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
	APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
	1. WALDÖFNER	Norbert	Alemán
	2. JORDAN	Andreas	Alemán
	DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:		
8	DATOS INVENTOR (ES)		
	PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD DIRECCIÓN
	1. Alemania		Duisburg Holtener Str. 208, 47167 Duisburg, Alemania
	2. Alemania		Berlin Am Waldhaus 41, 14129 Berlin, Alemania
	OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S) INVENTOR(ES)		
	☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.		
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
	APELLIDOS	NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
	De Páez	Luz Clemencia	C.C . 35.456.344 T.P . 23.555
	DIRECCIÓN	Carrera 4ª No. 72-35	No. TELÉFONO 3 47 36 11
	CIUDAD	BOGOTA	CORREO ELECTRÓNICO cavelier@cavelier.com
	PAÍS	COLOMBIA	No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL

10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO			
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
U.S.A		US	61/522,217	2011/0810
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS			
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>				
☐ SI ☐ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.				
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES			
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>				
☐ SI ☐ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.				
13	REDUCCIÓN DE TASAS			
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>				
☐ SI ☐ NO				
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐				
Universidades públicas o privadas ☐				
Entidades sin ánimo de lucro ☐				
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos				
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO			
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.				
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	No. 14-0012787 No. 14-0013650	Fecha: 2014/02/04 Fecha: 2014/02/06	
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL			
<i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>				
Nombre del Firmante LUZ CLEMENCIA DE PAEZ		Firma <i>[Firma manuscrita]</i> TP #23555055		
C.C 35.456.344 de Usaquén		Tarjeta Profesional 23.555		

17 ANEXOS	
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano 1. ☒ Descripción N° de folios: <u>52</u> 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: <u>30</u> 3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: <u>3</u> 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☐ Arte final 12 x 12. 8. ☐ Anexo formato digital. ☒ Forma PCT/IB/306. Notificación correspondiente a la inscripción del cambio de dirección del solicitante MAGFORCE AG	Documentación Jurídica 9. ☐ Poderes, si fuera el caso. 10. ☒ Dos (2) documentos que legalmente prueban la cesión de los dos (2) inventores al solicitante o a su causante. 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$515.000. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☒ Comprobante de pago por 20 reivindicaciones adicionales a 10 por \$620.000.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(10) International Publication Number
WO 2013/020701 A3

(43) International Publication Date
14 February 2013 (14.02.2013)

(51) International Patent Classification:
H01F 1/00 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2012/003381

(22) International Filing Date:
7 August 2012 (07.08.2012)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/522,217 10 August 2011 (10.08.2011) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **MAG-
FORCE AG** [DE/DE]; Max-Dohm-Str. 8, Haus B 5.2,
10589 Berlin (DE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **WALDÖFNER,**
Norbert [DE/DE]; Holtener Str. 208, 47167 Duisburg
(DE). **JORDAN, Andreas** [DE/DE]; Am Waldhaus 41,
14129 Berlin (DE).

(74) Agent: **LAHRTZ, Fritz**; Isenbruck Bösl Hörschler LLP,
Patentanwälte, Prinzregentenstraße 68, 81675 München
(DE).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,

BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

— before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments (Rule 48.2(h))

(88) Date of publication of the international search report:
4 April 2013

(54) Title: AGGLOMERATING MAGNETIC ALKOXYSILANE-COATED NANOPARTICLES

(57) Abstract: The present invention relates to a method for producing a suspension of agglomerates of magnetic alkoxy-
silane-coated metal nanoparticles, wherein an aqueous suspension of magnetic metal nanoparticles is incubated with alkoxy-
silane, wherein the incubation is carried out essentially in the absence of an organic solvent. The present invention further relates to suspen-
sion of agglomerates of magnetic alkoxy-silane-coated metal containing nanoparticles obtainable by the method of the present inven-
tion and to a composition comprising agglomerates of magnetic alkoxy-silane-coated metal nanoparticles, wherein the agglomerates
have an average size of 30 to 450 nm, preferably of 50 to 350 nm and especially of 70 to 300 nm as determined by light scattering.

WO 2013/020701 A3

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(10) International Publication Number
WO 2013/020701 A2

(43) International Publication Date
14 February 2013 (14.02.2013)

(51) International Patent Classification:
H01F 1/00 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2012/003381

(22) International Filing Date:
7 August 2012 (07.08.2012)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/522,217 10 August 2011 (10.08.2011) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **MAG-
FORCE AG** [DE/DE]; Max-Dohm-Str. 8, Haus B 5.2,
10589 Berlin (DE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **WALDÖFNER,
Norbert** [DE/DE]; Holtener Str. 208, 47167 Duisburg
(DE). **JORDAN, Andreas** [DE/DE]; Am Waldhaus 41,
14129 Berlin (DE).

(74) Agent: **LAHRTZ, Fritz**; Isenbruck Bösl Hörschler LLP,
Patentanwälte, Prinzregentenstraße 68, 81675 München
(DE).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report (Rule 48.2(g))

(54) Title: AGGLOMERATING MAGNETIC ALKOXY-SILANE-COATED NANOPARTICLES

(57) Abstract: The present invention relates to a method for producing a suspension of agglomerates of magnetic alkoxy-silane-coated metal nanoparticles, wherein an aqueous suspension of magnetic metal nanoparticles is incubated with alkoxy-silane, wherein the incubation is carried out essentially in the absence of an organic solvent. The present invention further relates to suspension of agglomerates of magnetic alkoxy-silane-coated metal containing nanoparticles obtainable by the method of the present invention and to a composition comprising agglomerates of magnetic alkoxy-silane-coated metal nanoparticles, wherein the agglomerates have an average size of 30 to 450 nm, preferably of 50 to 350 nm and especially of 70 to 300 nm as determined by light scattering.

WO 2013/020701 A2

AGLOMERACION DE NANOPARTICULAS RECUBIERTAS CON ALCOXISILANO MAGNETICO

Antecedentes de la Invención

A pesar de los recientes avances en la terapia de tumores de tumores sólidos, tales como anticuerpos, se mantiene la necesidad por opciones de tratamiento más eficaces y rentables.

La termoterapia o más específicamente la hipertermia es un acercamiento atractivo para el tratamiento de cáncer, que, en comparación con la quimioterapia o terapia de radiación, se espera un menor número de efectos secundarios para un amplio rango de enfermedades tumorales debido a su modo de acción físico. Sin embargo, las modalidades disponibles en la actualidad siguen siendo subóptimas (Moroz et al. 2002) y prometen mejora.

Una modalidad preferida de la termoterapia es un método en donde las nanopartículas magnéticas se introducen directamente en un tumor. Las nanopartículas se calientan posteriormente en un campo magnético alterno. Dependiendo de la duración del tratamiento y las temperaturas intratumorales alcanzadas, las células tumorales son destruidas ya sea directamente (ablación térmica) o sensibilizadas para quimio o radioterapia concomitante (hipertermia). Con este nuevo procedimiento, es posible combatir el tumor desde dentro

hacia fuera, evitando de ese modo el tejido sano circundante. Esta modalidad de tratamiento ha mostrado tener efectos terapéuticos prometedores en el tratamiento del glioblastoma (Maier-Hauff et al. 2011).

A pesar de los resultados positivos de los primeros ensayos clínicos todavía hay margen para mejorar la eficacia y/o reducir los efectos secundarios potenciales o limitaciones de la terapia. Un problema no resuelto es que durante la instilación de las nanopartículas, los depósitos de las nanopartículas magnéticas fuera del área objetivo se producen en el tejido circundante. Tales depósitos externos o bien causan efectos secundarios no deseados, ya que conduce a un aumento de la temperatura exterior del área objetivo durante el calentamiento en el campo magnético alterno, o que limitan la fuerza del campo magnético aplicable utilizado para calentar los depósitos de nanopartículas si se evita tal calentamiento del tejido circundante. Este problema puede ser debido a una alta presión dentro del tejido del tumor inyectado que conduce a un flujo de salida de las nanopartículas depositadas durante o inmediatamente después de la inyección. Por otra parte, aun cuando se requieren partículas a nanoescala con el fin de tener altas tasas de absorción específica (SAR, por sus siglas en inglés), tales nanopartículas pueden viajar fácilmente dentro del espacio intersticial y de esta manera pueden perderse del tejido

objetivo. Además, la cantidad de calor que puede ser 'depositado' dentro del tumor -depositando primero nanopartículas que posteriormente son excitadas por el campo magnético alterno - está limitada debido a una tasa de absorción específica subóptima (SAR) de las nanopartículas/el fluido magnético que se utiliza hasta ahora en la clínica.

Además, las nanopartículas tienen que ser fabricadas de una manera controlada en gran escala y costo razonable, y tienen que ser capaces de ser formuladas en una formulación estable con el fin de convertirse en un producto comercializable.

El arte previo describe un número de métodos y usos de tales nanopartículas, tal como fue revisado por Gupta y Gupta (2005).

Lesniak et al. (1997) describen un proceso para la preparación de nanopartículas libres de aglomerados. El proceso incluye (i) preparar una suspensión acuosa de nanopartículas de óxido de hierro que parcialmente forman aglomerados, (ii) agregar trialcóxidosilanos y un disolvente orgánico polar miscible en agua, por ejemplo etilen glicol, (iii) tratar la suspensión resultante con ultrasonido con el fin de reducir la aglomeración, (iv) eliminar el agua mediante destilación bajo la acción de ultrasonido, y (v) eliminar los aglomerados restantes. El proceso resulta en nanopartículas libres de aglomerados con un recubrimiento

resistente a la hidrólisis basado en alcóxidosilanos. Sin embargo, estas nanopartículas, si se aplican localmente a tumores sólidos, permanecen sólo parcialmente en el sitio de la inyección probablemente debido a sus propiedades de estar libres de aglomerados. Estas nanopartículas quedan ampliamente distribuidas en el cuerpo limitando de este modo tanto la cantidad restante de nanopartículas dentro del área objetivo, así aumentando el riesgo de efectos secundarios debido a la acumulación de nanopartículas en los tejidos circundantes o en otras partes en el cuerpo. Además, el etilenglicol utilizado es muy difícil deshacerse debido a su interacción con los grupos amino del recubrimiento de alcóxidosilano y su alto punto de ebullición (197°C). Por lo tanto, la presencia de etilen glicol en el producto final limita la aplicabilidad de las nanopartículas bajo aspectos de seguridad y regulatorios.

Ruefenacht et al. (2006) describen una formulación a base de polímero inyectable de nanopartículas que generan calor en un portador líquido, que es capaz de formar implantes *in situ* al entrar en contacto con un fluido o tejido corporal. Considerando que la presente formulación parece resolver el problema de flujo de salida de las nanopartículas del tumor, el sistema utiliza preferiblemente solventes tales como N-metil-2-pirrolidona (NMP) o sulfóxido de dimetilo (DMSO). Ambos solventes son considerados

generalmente que tienen baja toxicidad y son de uso frecuente para las formulaciones de fármacos orales y transdérmicos. Sin embargo, poco se sabe de la inyección de los solventes en los tejidos o tumores, especialmente en el cerebro en el caso de tumores cerebrales. Por lo tanto, tales solventes deben ser evitados. Además, tales formulaciones se forman durante la inyección de un implante definido, mientras que en el contexto de la presente invención se ha previsto lograr una cierta distribución de las nanopartículas inyectadas dentro del tumor/tejido, que sin embargo se limita al tumor/tejido. Otra desventaja de este sistema es el aumento de volumen previsto dentro del tumor, si estas formulaciones a base de polímeros inyectables se inyectan en los tumores, lo que puede causar problemas en ciertas indicaciones tumorales, especialmente en tumores cerebrales, en donde el espacio dentro del cráneo es limitado. Juntas, tales formulaciones a base de polímeros no son apropiadas para el tratamiento de tumores no operables.

Breve Descripción de la Invención

El objeto de la presente invención es, por lo tanto, proporcionar nanopartículas magnéticas biocompatibles mejoradas. En particular, el objeto de la presente invención es proporcionar una nanopartícula magnética biocompatible mejorada para el tratamiento de tumores.

Como se muestra en los ejemplos, los inventores ahora

han encontrado sorprendentemente que la aminosilanización controlada de nanopartículas de óxido de hierro en la ausencia de solventes orgánicos conduce a nanopartículas magnéticas con una condensación incompleta de los aminosilanos superficiales que resulta en una formulación a base de agua estable de nanopartículas magnéticas (fluidos magnéticos), que pueden ser altamente concentradas. Durante la inyección en el tejido o tumor estos fluidos magnéticos forman depósitos favorables con una alta velocidad de retención dentro del tejido objetivo. En consecuencia, los inventores proporcionan un método mejorado para la fabricación, nanopartículas mejoradas, y suspensiones y composiciones apropiadas (fluidos magnéticos) con una biocompatibilidad mejorada, formación de depósitos mejorados dentro del área objetivo y menos efectos secundarios debido a la ausencia de solventes orgánicos y/o flujo de salida reducido de las nanopartículas depositadas del área de tratamiento.

En consecuencia, la presente invención proporciona nanopartículas magnéticas biocompatibles con una alta velocidad de absorción específica (SAR) que se pueden inyectar en la rutina diaria en el tejido tumoral, que permanecen en o cerca del sitio de la inyección dentro del área de tratamiento prevista, por ejemplo, el tumor, y no se extiende sustancialmente al tejido circundante. Además, la

presente invención proporciona un proceso de fabricación robusto y eficiente en costo para tales nanopartículas magnéticas biocompatibles.

Definiciones

"Tasa de absorción específica" (SAR) es una medida de la tasa a la que la energía es absorbida por las nanopartículas después de la exposición al campo magnético alternante. Es dependiente de la intensidad de campo magnético y la frecuencia de la alternancia de la polarización del campo magnético. La SAR se determina preferiblemente de acuerdo con el método desarrollado por Jordan et al. (1993) a una frecuencia de 100 kHz y una intensidad de campo de hasta 18 kA/m, preferiblemente a 3.5 kA/m y se refiere a la masa de metal utilizado, por ejemplo, hierro (unidad W/g de metal).

"Potencial zeta" se refiere al potencial eléctrico medido de una nanopartícula coloidal en medio acuoso, medido con un instrumento tal como un Zetasizer Malvern 3000 HSA a un pH de 5.2 y una conductividad de 2.0 mS/cm (cada una determinado a 25°C). El potencial zeta describe el potencial en el límite entre solución a granel y la región de cizallamiento hidrodinámico o capa difusa.

En el contexto de la presente invención, el término "aproximadamente" significa una desviación del número dado o el valor de $\pm 10\%$, preferiblemente de $\pm 5\%$ y, especialmente, de $\pm 1\%$.

El término "magnético" incorpora magnético, paramagnético, ferromagnético, anti-ferromagnético, ferrimagnético anti-ferrimagnético y superparamagnético. Preferiblemente, las nanopartículas de acuerdo con esta invención son paramagnéticas, más preferiblemente ferromagnéticas, ferrimagnéticas, antiferrimagnéticas o superparamagnéticas.

En una modalidad particularmente preferida, las nanopartículas son superparamagnéticas.

El término "nanopartículas" se entenderá nanopartículas en el intervalo de nanómetros, es decir, nanopartículas de 1 a 100 nm con respecto a su núcleo de metal como se puede determinar mediante microscopía electrónica. Preferiblemente, las nanopartículas tienen un tamaño de 5 a 25 nm, más preferiblemente de 7 a 20 nm y especialmente de 9 a 15 nm.

"Nanopartícula de metal" se refiere a nanopartículas magnéticas, que contienen metal o iones metálicos.

"Solvente orgánico" significa un compuesto orgánico líquido, en este caso, un carbohidrato, con el poder para disolver los sólidos, gases o líquidos. Ejemplos de solventes orgánicos de acuerdo con la presente invención, incluyen, pero no se limitan a, etilen glicol, acetona, tolueno y equivalentes.

El término "recubrimiento de alcoxisilano" se refiere a un recubrimiento que resulta de la policondensación de

alcoxisilanos, un proceso que también se conoce como "recubrimiento de aminosilano". El término "policondensación" tal como se utiliza en este documento generalmente se refiere a cualquier reacción de condensación de un monómero con dos grupos funcionales que conduce a la formación de un polímero.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir una suspensión de aglomerados de nanopartículas de metal recubiertas con alcoxisilano magnético, en donde una suspensión acuosa de nanopartículas de metal magnéticas se incuban con alcoxisilano, caracterizado porque la incubación se lleva a cabo esencialmente en la ausencia de un solvente orgánico.

En el contexto de la presente invención, el término "incubando" o "incubación" significa cualquier configuración experimental, condición experimental o mezcla de reacción que permiten la policondensación de alcoxisilanos y por lo tanto para el recubrimiento de aminosilano de las nanopartículas.

Como se muestra en los ejemplos, se ha encontrado en el contexto de esta invención que, para el tratamiento de tumores y otras enfermedades, aglomerados de nanopartículas de metal recubiertas con alcoxisilano magnético mejor pueden formar depósitos dentro del área objetivo y menos nanopartículas se pierden en circulación o forman depósitos fuera del área objetivo que las nanopartículas de metal recubiertas con alcoxisilano magnético que no forman

aglomerados. 'Aglomeración' en este contexto significa que varias nanopartículas individuales forman aglomerados o grupos de nanopartículas. "Aglomerados" se refieren a nanopartículas aglomeradas o grupos de nanopartículas.

El paso esencial de la presente invención es la incubación/reacción con alcoxisilanos esencialmente en ausencia de un solvente orgánico. "Esencialmente en la ausencia" en el contexto de solventes orgánicos significa que pequeñas trazas de solventes orgánicos pueden estar presentes, preferiblemente la cantidad de solventes orgánicos es menor que 10% en volumen, más preferiblemente menor que 5% en volumen, más preferiblemente menor que 1% en volumen, especialmente menor que 0.5% en volumen. Por ejemplo, pequeñas cantidades de metanol pueden ser producidas durante la reacción y, por lo tanto, en cierta medida, pueden permanecer en el producto. En una modalidad preferida, el recubrimiento se lleva a cabo en ausencia de un solvente orgánico, especialmente el recubrimiento o se lleva a cabo en ausencia de un solvente orgánico agregado. El solvente preferido para la reacción de recubrimiento es agua. Sin estar limitado a ninguna teoría científica, los inventores asumen que estas condiciones de reacción conducen sin embargo a una reacción de condensación incompleta definida de los alcoxisilanos que se traduce en las propiedades de aglomeración de las nanopartículas.

El método de la presente invención se lleva a cabo preferiblemente en ausencia de etilen glicol. El etilen glicol interfiere con la reacción de recubrimiento de esta invención. Además, es por lo menos muy difícil, pero no imposible eliminar por completo de la preparación de nanopartículas, puesto que usualmente relativamente grandes cantidades de etilen glicol permanecen unidas al recubrimiento de las nanopartículas y debido a su alto punto de ebullición de 197°C. Esto aplica también a las preparaciones elaboradas de acuerdo con Lesniak et al. (1997, supra). De acuerdo con la Farmacopea Europea solamente 600 ppm de etilenglicol se permiten en el producto médico final, lo que hace que las preparaciones de nanopartículas con cantidades más altas de etilenglicol sean inaceptables para uso clínico comercial.

En una modalidad, las nanopartículas de metal comprenden hierro, compuestos de complejo de hierro, compuestos de carbonilo de hierro o sales de hierro, mientras que se prefieren las sales de hierro. Se prefieren las nanopartículas que comprenden hierro debido a su baja toxicidad en comparación con otros metales magnéticos tales como cobalto o níquel. En una modalidad preferida, el compuesto de complejo de hierro, los compuestos de carbonilo de hierro o sales de hierro están esencialmente libres de otros metales y otros contaminantes con el fin de evitar

toxicidades. Es bien conocido en el arte previo que los productos químicos pueden contener trazas de contaminantes. Por lo tanto, "esencialmente libre" en este contexto significa preferiblemente que menos del 1% en peso, preferiblemente, menos de 0.1% en peso de otros contaminantes está comprendido dentro de los compuestos de complejo de hierro, compuestos de carbonilo de hierro o sales de hierro. Especialmente preferidas son las sales de hierro esencialmente libres de otros contaminantes.

En una modalidad especialmente preferida, la sal de hierro es un óxido de hierro, preferiblemente magnetita y/o maghemita. Tales nanopartículas de hierro hechas de óxido de hierro pueden ser fabricadas por precipitación de una solución que contiene una mezcla cloruro de hierro (III) y cloruro de hierro (II) con hidróxido de sodio. "Nanopartículas de hierro", de acuerdo con esta invención son nanopartículas que contienen átomos de Fe o iones de Fe.

Por lo tanto, en una modalidad preferida, la suspensión acuosa de las nanopartículas de óxido de hierro es proporcionada por precipitación de una solución que contiene una mezcla de cloruro hierro (III) y cloruro de hierro (II) con hidróxido de sodio.

Aquí, la proporción entre cloruro de hierro (III) y cloruro de hierro (II) es preferiblemente de aproximadamente 2:1.

En el contexto de la presente invención, los términos "nanopartículas de hierro" y "nanopartículas de óxido de hierro" se utilizan de manera equivalente.

Reacciones y condiciones de precipitación apropiadas han sido descritas por Massart (1981) y revisadas por Mohapatra y Anand (2010). Las condiciones preferidas para la reacción de precipitación son: (i) una proporción de cloruro de Fe (III) y cloruro de Fe (II) de aproximadamente 2:1, (ii) verter el cloruro de Fe (III) y cloruro de Fe (II) en una solución de hidróxido de sodio en una solución con una concentración de aproximadamente 2.13 M; (iii) la temperatura de precipitación de aproximadamente 25°C, y (iv) tiempo para la reacción de precipitación de aproximadamente 52 min. Opcionalmente, la solución de hidróxido de sodio se vierte en la solución de cloruro de hierro (en lugar de vice versa) durante un período de aproximadamente 39 minutos a aproximadamente 15°C. Un método para producir nanopartículas de óxido de hierro recubiertas por medio de la precipitación de sales de hierro en solución es, por ejemplo, ejemplificado en el Ejemplo 1.1.

Alternativamente, la suspensión acuosa de las nanopartículas de óxido de hierro puede ser proporcionada por la descomposición térmica de una sal de hierro o un compuesto de complejo de hierro. El término "compuesto de complejo de hierro" como se usa en este documento generalmente se refiere a cualquier complejo que contiene hierro, preferiblemente

cualquier compuesto que comprende hierro complejo. Los métodos apropiados han sido descritos por Waldoefner y Stief (2011). En resumen, un compuesto que contiene hierro y un solvente orgánico se mantienen durante 10 min a una temperatura entre 50°C y 50°C por debajo de la temperatura de reacción. A continuación, la solución se calienta a 200 hasta 400°C para producir nanopartículas. Las nanopartículas se oxidan con oxígeno, peróxido o un oxido de amina terciario, y se trataron con ácido nítrico y nitrato de hierro resultante en nanopartículas de maghemita. Otro método apropiado para la preparación de nanopartículas de óxido de hierro por la descomposición térmica ha sido descrito por Guardia et al. (Guardia et al 2010 a; Guardia et al 2010 b; Guardia et al 2012). En resumen, acetilacetonato de hierro (III) se mezcla con ácido decanoico en dibencil éter. La solución se calienta constantemente hasta 200°C. Después de 2 horas a 200°C, la solución se calienta hasta reflujo y se mantiene a esta temperatura durante 1 hora y finalmente se enfría a temperatura ambiente, se lava y se recoge por centrifugación. Ambos métodos son los preferidos debido a la alta SAR de las nanopartículas resultantes. Un método para producir nanopartículas de óxido de hierro por medio de la descomposición térmica de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, se describe en el Ejemplo 1.2.

Por lo tanto, en una modalidad preferida alternativa, la

suspensión acuosa de las nanopartículas de óxido de hierro es proporcionada por la descomposición térmica de una sal de hierro o un compuesto de complejo de hierro.

Las sales de hierro y complejos de hierro que son aplicables en el método de la presente invención son bien conocidos por la persona experimentada en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, cloruro de hierro (III), cloruro de hierro (II), acetilacetonato de hierro (III), carbonilos de hierro y equivalentes.

En una modalidad preferida, las nanopartículas de metal son tratadas con H_2O_2 antes de la incubación/reacción con alcoxisilano. Se prefiere este paso opcional puesto que el hierro se oxida completamente a Fe_2O_3 (maghemita) bajo condiciones definidas y, como consecuencia, pasos de reacción subsiguientes pueden llevarse a cabo en ausencia de un gas protector (por ejemplo, argón). De lo contrario, en la ausencia de H_2O_2 , se prefiere trabajar bajo gas protector, tal como argón, con el fin de controlar las condiciones de reacción.

El alcoxisilano es preferiblemente un trialcoxisilano. Se selecciona preferiblemente del grupo que consiste de 3-(2-aminoetilamino)-propil-trimetoxisilano (DIAMO), 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES), trimetoxisililpropil-dietilentriamina (TRIAMO) y N-(6-amino-hexil)-3-aminopropil-trimetoxisilano. En una modalidad especialmente preferida, el

alcoxisilano es 3-(2-aminoetil-amino)-propil-trimetoxisilano.

En una modalidad preferida adicional, la reacción de recubrimiento se lleva a cabo mediante la adición de 0.3 a 0.6×10^{-3} mol, preferiblemente de 0.4 a 0.5×10^{-3} mol y especialmente desde 0.43 hasta 0.45×10^{-3} mol de trialcoxisilano por 0.9 mol del metal.

De acuerdo con una modalidad preferida de la invención, la incubación/reacción con alcoxisilano se lleva a cabo a un pH de entre 2 y 6 (lo que significa que también un pH de 2 o 6 se incluye en este intervalo), preferiblemente de entre 2.5 y 5.5, especialmente de 4.5 ± 1 . Durante la incubación/reacción, el pH puede ajustarse a tales valores, si es necesario. El ácido acético se puede utilizar para ajustar el pH en consecuencia.

Preferiblemente, las nanopartículas magnéticas de metal se desintegran antes de la incubación/reacción con alcoxisilano. Las nanopartículas se desintegran preferiblemente por tratamiento con ultrasonido con el fin de generar una suspensión de nanopartículas densas de electrones en forma de balón o cúbicas que después pueden ser sometidas a la reacción de recubrimiento. En una modalidad, el tratamiento de ultrasonido se realiza en un baño de ultrasonido a 45 kHz 30 minutos a 2 horas, especialmente durante aproximadamente 1 hora. Este método de desintegración se lleva a cabo preferiblemente en condiciones ácidas,

preferiblemente entre pH 2.5 y 3.0. La desintegración de las nanopartículas de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, se describe en el Ejemplo 1.1.

Otro método apropiado para la desintegrar las nanopartículas es la técnica de desaglomeración a base de láser/fragmentación de láser (Schnoor et al. 2010).

El método de esta invención además puede comprender el paso de desintegración de los aglomerados después de comenzar la reacción/incubación con alcoxisilano, que se puede llevar a cabo como se describió anteriormente. En una modalidad, la desintegración de las nanopartículas comienza con o después del paso de recubrimiento. Sin embargo, en una modalidad preferida adicional, la etapa de desintegración comienza antes del paso de recubrimiento y se lleva a cabo adicionalmente simultáneamente con y/o después del paso de recubrimiento. Especialmente, la desintegración se inicia antes del paso de recubrimiento y continúa durante y después del paso de recubrimiento. Preferiblemente, la desintegración se lleva a cabo para un total de aproximadamente de 24 horas o más.

Durante el recubrimiento y la desintegración, se puede generar una suspensión de forma estable que se puede almacenar a temperatura ambiente por lo que es una modalidad preferida. No limitado a ninguna teoría científica se asume que la mayoría de nanopartículas individuales están

completamente recubiertas con el alcoxisilano, que se adhieren fácilmente a las nanopartículas vecinas y forman los aglomerados de acuerdo con esta invención, como se puede ver en la Figura 1. Sin embargo, la suspensión es suficientemente fluida para pasar fácilmente a través de jeringas y para ser inyectable en el tejido tumoral.

En una modalidad preferida, se lleva a cabo un paso adicional para la eliminación de aglomerados recubiertos de forma incompleta y/o muy grandes (por ejemplo, aglomerados de más de 2,000 nanopartículas) de la suspensión. Los métodos apropiados para este paso son centrifugación (por ejemplo, por 10 min a 2000 rpm) y filtración (por ejemplo, a través de un filtro plegado con un tamaño de poro de 12-25 μm). En una modalidad especialmente preferida, se llevan a cabo tanto la centrifugación y la filtración. Se ha observado que predominantemente y completamente nanopartículas recubiertas con alcoxisilano no se sedimentan de la suspensión, por ejemplo si se centrifugan durante 10 minutos a 2000 rpm. En consecuencia, el sobrenadante de la centrifugación y/o el flujo a través de la filtración es/son una suspensión de acuerdo con la invención que muestra/no muestra sedimentación más de un día, preferiblemente una semana, especialmente de un mes, y por lo tanto se puede almacenar durante más de un largo tiempo.

Por otra parte, las nanopartículas recubiertas de forma

incompleta se pueden eliminar en gran medida de la suspensión por ejemplo por tal centrifugación. Se prefiere tal eliminación de las nanopartículas recubiertas de forma incompleta, puesto que las nanopartículas recubiertas de forma incompleta tienen una menor SAR, lo cual, por lo tanto, reduce el volumen de la SAR de una suspensión.

Los pasos de desintegración y, opcionalmente, el paso de eliminación es/son llevados a cabo preferiblemente hasta que los aglomerados de las nanopartículas de metal tienen un tamaño promedio (z promedio), de 30 a 450 nm, preferiblemente de 50 a 350 nm y especialmente de 70 a 300 nm, determinado por dispersión de luz. En este contexto, el tamaño promedio se determina en agua de acuerdo con el ejemplo 3. Con esta medida de dispersión de luz, el tamaño de los aglomerados de nanopartículas es determinado - en contraste con el tamaño de los nanopartículas individuales densas en electrones en forma de esfera o cúbicas que se están formando tales aglomerados. "z promedio" con respecto al tamaño de los aglomerados significa la lectura de la determinación del tamaño de la dispersión de luz se lleva a cabo como en el ejemplo 3. Los valores de z promedio anteriores de los intervalos previstos conducen a la sedimentación de las nanopartículas y son, por tanto, en general, no apropiados para las aplicaciones previstas de estas nanopartículas. Incluso si la dispersión se puede reconstituir antes de la instilación de un tumor,

aglomerados más grandes pueden conducir a problemas graves, puesto que la dispersión se puede separar parcialmente en solución amortiguadora y los aglomerados mientras pasna a través de la aguja que lleva a una distribución desigual de las nanopartículas dentro del tejido.

En otra modalidad preferida de la invención, la suspensión de aglomerados se concentra a una concentración de por lo menos aproximadamente 2 M, preferiblemente de por lo menos aproximadamente 3M, más preferiblemente de por lo menos aproximadamente 4M, más preferiblemente de por lo menos aproximadamente 5M, y especialmente de por lo menos aproximadamente 6M, determinado por su contenido de metal. La concentración de metal deseada dentro de la suspensión de acuerdo con esta invención se puede ajustar mediante la evaporación de agua en un evaporador de rotación. Muestras de suspensión pueden ser analizadas en cuanto al contenido de sólidos y la concentración de metal utilizando el método descrito a continuación (ver, por ejemplo, el Ejemplo 2).

Sorprendentemente, se ha encontrado que las nanopartículas en la composición de acuerdo con esta invención pueden ser concentradas a altas concentraciones de 2M de contenido de metal y superiores, sin perder su capacidad de uso como dispositivo médico o medicamento. Estas suspensiones altamente concentradas todavía pueden ser infundidas o inyectadas en la rutina diaria y, sobre todo, se

pueden almacenar durante meses. Después de la esterilización en autoclave de la suspensión, algo de gelificación se puede observar, lo que, sin embargo, puede ser revertido mediante agitación intensa (por ejemplo, durante aproximadamente 12 horas). En comparación con una suspensión con una concentración de metal inferior, estas suspensiones tienen una tasa de absorción específica (SAR) más alta en base a volumen y una alta viscosidad. Sorprendentemente, se ha mostrado que las nanopartículas de la invención que la formación de depósito de tales nanopartículas dentro del tejido deseado, por ejemplo, tumor, depende de la concentración de las nanopartículas, en este caso, concentraciones de nanopartículas incrementadas conducen a la formación de un depósito mejorado. Este resultado fue inesperado, puesto que uno puede suponer razonablemente que la concentración de nanopartículas inyectadas se iguala rápidamente para diferentes concentraciones dentro del tejido, de modo que las nanopartículas idénticas en diferentes concentraciones no se comportan de manera diferente.

Otro aspecto de la presente invención es una suspensión de aglomerados de nanopartículas de metal recubiertas con alcoxisilano magnético que se pueden obtener por un método descrito anteriormente. Como se muestra en los ejemplos a continuación esta suspensión se puede inyectar en la rutina

diaria en los tumores, se mantiene dentro del tejido tumoral y por lo tanto puede ser utilizado para la hipertermia y la termoablación. Sorprendentemente, se ha encontrado que el recubrimiento con alcóxido de silano de acuerdo con esta invención conduce a las propiedades de las nanopartículas para aglomerar en tal forma que durante la inyección en el tejido los aglomerados permanecen en su mayoría en las proximidades del sitio de inyección, pero todavía son fáciles de manejar. Esto hace que estos aglomerados sean especialmente apropiados para inyección en los tejidos tumorales por ejemplo; para hipertermia y/o termoablación.

Un aspecto adicional de la invención es una composición que comprende aglomerados de nanopartículas de metal recubiertas con alcóxido de silano magnético, en el que los aglomerados tienen un tamaño promedio de 30 a 450 nm, preferiblemente de 50 a 350 nm y especialmente de 70 a 300 nm como se determinado por la dispersión de luz. La medida del tamaño de las nanopartículas aglomeradas de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, se describe en el Ejemplo 3.

Preferiblemente, esta composición que comprende aglomerados está esencialmente libre de solventes orgánicos. "Esencialmente libre de solventes orgánicos" en este contexto significa que las pequeñas trazas de solventes orgánicos pueden estar presentes, por ejemplo, la cantidad de solventes orgánicos es menor que 5% en volumen, preferiblemente 1% en

78

volumen, más preferiblemente menor que 0.5% en volumen, especialmente menor que 0.1% en volumen. En una modalidad especialmente preferida, ningún solvente orgánico se puede detectar en la preparación de nanopartículas de acuerdo con métodos usuales.

Las nanopartículas de metal de tales composiciones son preferiblemente nanopartículas que tienen un núcleo de metal con un tamaño de 5 a 25 nm, preferiblemente con un tamaño de 7 a 20 nm y especialmente con un tamaño de 9 a 15 nm como es determinado por microscopía electrónica. Los aglomerados de la suspensión se componen preferiblemente de decenas a cientos de tales nanopartículas individuales, mientras que cualquiera o solamente muy pocos son aglomerados pequeños de menos de diez nanopartículas como es determinado en la microscopía de transmisión electrónica (TEM) - preferiblemente menos de 3 aglomerados de 10 o menos nanopartículas en una imagen TEM representante que muestra 700 por 700 nm y por lo menos 1000 nanopartículas. Microscopía de transmisión electrónica de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, se describe en el Ejemplo 6.

A su vez, en una imagen TEM representativa que muestra de 700 por 700 nm y por lo menos 1000 nanopartículas de menos de 10 nanopartículas individuales, preferiblemente menos de 5 nanopartículas individuales, especialmente una o ninguna de nanopartículas individuales pueden ser detectadas. Una

nanopartícula en este contexto es una nanopartícula densa en electrones, básicamente, en forma esférica o cúbica visible en micrografías electrónicas de transmisión. Una nanopartícula individual es una nanopartícula que no está unida a por lo menos otra nanopartícula.

Preferiblemente, la forma de las nanopartículas individuales está en forma esférica o cúbica. El tamaño y la forma de las nanopartículas se pueden adaptar mediante el ajuste de pH, fuerza iónica, temperatura, naturaleza de las sales (percloratos, cloruros, sulfatos y nitratos), o la proporción de concentración de Fe(II)/Fe(III) (revisado por Mohapatra y Anand 2010).

Preferiblemente, las nanopartículas de metal comprenden hierro, compuestos de complejo de hierro, compuestos de carbonilo de hierro o sales de hierro, preferiblemente sales de hierro. La sal de hierro es preferiblemente un óxido de hierro, especialmente magnetita. Las nanopartículas preferidas se pueden obtener por los métodos como se describió anteriormente, preferiblemente proporcionando la suspensión de nanopartículas de óxido de hierro por precipitación de una solución que contiene una mezcla de cloruro de hierro (III) y cloruro de hierro (II) con hidróxido de sodio.

En una modalidad preferida, la composición que comprende aglomerados de nanopartículas de metal recubiertas con

alcoxisilano magnético de la invención tienen un potencial zeta de 25 a 80 mV, preferiblemente de 35 a 70 mV, especialmente de 45 a 60 mV. El potencial zeta de la composición se determina como se describe en el Ejemplo 4 a un pH de 5.2 y a una conductividad de 2.0 mS/cm (cada uno determinado a 25°C). El potencial zeta es dependiente del recubrimiento exitoso de las nanopartículas ya que depende de los grupos amino de los alcoxisilanos. Potenciales zeta más bajos indican un recubrimiento insuficiente de las nanopartículas. El potencial zeta correcto dentro de los intervalos proporcionados contribuye a las propiedades de las nanopartículas durante la inyección en el tejido, en este caso, que la nanopartículas inyectadas permanecen en o cerca del sitio de inyección dentro de, por ejemplo, el tumor, y no se propagan a los tejidos circundantes, lo que limitaría el campo magnético aplicable y por lo tanto el éxito del tratamiento. Además, el potencial zeta en los intervalos proporcionados asegura la estabilidad coloidal óptima y por lo tanto extiende la vida útil de la composición de nanopartículas.

Una modalidad preferida adicional de esta invención es una composición que comprende aglomerados de nanopartículas de metal recubiertas con alcoxisilano magnético, en el que los aglomerados se suspenden en una solución amortiguadora a base de agua fisiológicamente aceptable. Las soluciones

amortiguadoras fisiológicamente aceptables son conocidas en el arte previo e incluyen, por ejemplo, acetato, citrato, carbonato o fosfato a un pH (a 25°C) entre 5 y 8, preferiblemente entre 5 y 6, y especialmente entre 5.1 y 5.8 y una conductividad (a 25°C) de 1.5 a 2.5 mS/cm, preferiblemente de 1.7 a 2.3 mS/cm. La osmolalidad de una suspensión apropiada es de 0.01 a 0.05 Osmol/kg, preferiblemente de 0.02 a 0.04 Osmol/kg. Tales suspensiones están preferiblemente listas para usar como infusiones para el tratamiento sistémico o inyecciones para aplicación intersticial o intratumoral.

La composición de esta invención tiene preferiblemente una concentración de nanopartículas de por lo menos aproximadamente 2M, preferiblemente de por lo menos aproximadamente 3M, más preferiblemente de por lo menos aproximadamente 4M, más preferiblemente de por lo menos aproximadamente 5M y especialmente de por lo menos aproximadamente 6M, como es determinado por su contenido de metal. Preferiblemente, la concentración de nanopartículas está por debajo de aproximadamente 8M, puesto que concentraciones demasiado altas, para ciertas aplicaciones, pueden conducir a dificultades durante la inyección debido a la alta viscosidad de la dispersión. Con respecto a hierro 2 M es igual a 112 mg/ml. La concentración de metal puede ser determinada por ciertos complejos de metales de fotometría,

por ejemplo, el hierro se puede determinar después de la transformación en un complejo de fenantrolina de hierro (II) como se describe en el Ejemplo 2.

Sorprendentemente, se ha encontrado que las nanopartículas en la composición de acuerdo con esta invención pueden ser concentradas a altas concentraciones de 2M de contenido de metal y superiores, sin perder su capacidad de uso como dispositivo médico o medicamento. Estas suspensiones altamente concentradas todavía pueden ser infundidas o inyectadas en la rutina diaria y, sobre todo, se pueden almacenar durante meses. Después de la esterilización en autoclave de la suspensión se puede observar algo de gelificación, que sin embargo puede ser revertida mediante agitación intensa (por ejemplo, 12 horas). En comparación con una suspensión con una concentración de metal inferior, estas suspensiones tienen una SAR superior con base en el volumen y una alta viscosidad. Sorprendentemente, se ha mostrado que las nanopartículas de la invención que la formación de depósito de tales nanopartículas dentro del tejido deseado, por ejemplo, tumor, depende de la concentración de las nanopartículas, en este caso, concentraciones de nanopartículas incrementadas conducen a la formación de un depósito mejorado. Este resultado fue inesperado, puesto que uno puede suponer razonablemente que la concentración de nanopartículas inyectadas se iguala rápidamente para

diferentes concentraciones dentro del tejido, de modo que las nanopartículas idénticas en diferentes concentraciones no se comportan de manera diferente.

Como se puede ver en el Ejemplo 9, más nanopartículas podrían ser depositadas dentro del tumor para composiciones altamente concentradas (por ejemplo, 95% de hierro inyectado para una suspensión 6M frente a 90% para una suspensión de 2M a 0 días). Este hallazgo es consistente con los resultados que menos hierro se encontró en el pulmón, el hígado y el bazo para la suspensión 6M en comparación con una suspensión 2M (por ejemplo, 3% frente a 14% en el día 0). Por lo tanto, se concluye que entre mayor es la concentración menos nanopartículas entran en la circulación y terminan en otros órganos.

Además, se encontró que el aumento de nanopartículas concentradas de la invención permanecen completamente dentro del tumor dentro de un marco de tiempo de 7 días (para suspensión 6 M: 95% en el día 0 frente a 96% en 7 días), mientras que algunas pérdidas de contenido de hierro pueden ser observadas en el mismo período de tiempo para una suspensión de concentración más baja (suspensión 2 M: 90% en el día 0 frente al 86% en el día 7). Este hallazgo es especialmente sorprendente, puesto que uno podría esperar que las nanopartículas se diluyan rápidamente durante la inyección en el tejido tumoral y no muestran un

comportamiento diferente durante períodos de tiempo más largos.

La composición de esta invención tiene preferiblemente una viscosidad a una velocidad de cizallamiento de 100/s de igual o más de 0.005 Pa s, preferiblemente igual o más de 0.01 Pa s, más preferiblemente igual o más de 0.1 Pa s, y especialmente igual o más de 1 Pa s, tal como es determinado por reometría rotacional. Reometría rotacional de acuerdo con la presente invención es, por ejemplo, ejemplificada en el Ejemplo 8. La viscosidad aumenta para suspensiones de acuerdo con esta invención con el aumento de nanopartículas o la concentración de hierro.

En una modalidad preferida, la tasa de absorción específica (SAR) de las nanopartículas dentro de la composición de la invención es mayor o igual de 2 W/g del metal respectivo (por ejemplo, hierro), preferiblemente mayor o igual a 3 W/g del metal respectivo y especialmente 4 a 50 W/g de metal respectivo, determinado a una intensidad de campo magnético de 3.5 kA m y una frecuencia de 100 kHz de acuerdo con el método descrito por Jordan et al. (1993). Generalmente, se prefieren altos valores de SAR, puesto que en consecuencia temperaturas más altas se pueden lograr durante la exposición a un campo magnético alterno. Si el valor de SAR de las nanopartículas es demasiado bajo, en este caso, inferior a los números proporcionados, es probable que

después de la exposición a un campo magnético alterno temperaturas alcanzadas en todo el tumor son demasiado bajas para alcanzar un efecto terapéutico.

Una modalidad preferida adicional de la invención es una composición de acuerdo con esta invención, en donde durante la inyección de la composición en un modelo de tumor isogénico en o después del día 7 después de la inyección por lo menos 90%, preferiblemente por lo menos 93%, más preferiblemente por lo menos 95 %, y especialmente por lo menos 98% de metal aplicado permanece dentro del tumor inyectado. Un modelo de tumor isogénico de acuerdo con esta invención es un modelo de tumor, en donde las células tumorales, que se utilizan para inducir un tumor, se corresponden genéticamente para el animal huésped. Por ejemplo, la línea celular de carcinoma mamario C3H RS1 se utiliza para generar tumores en ratones de la cepa C3H-HeN. El metal restante en el tumor se puede determinar mediante la medición de la recuperación de metal utilizando espectrometría, por ejemplo, mediante un espectrómetro de Tecan Infinito M 200.

Una modalidad adicional de la invención es una composición que se puede obtener mediante cualquiera de los métodos de la invención.

Un aspecto adicional de la invención es un dispositivo médico que comprende una suspensión o una composición de

acuerdo con esta invención. Puesto que las nanopartículas magnéticas ejercen su efecto terapéutico durante la exposición a un campo magnético alterno a través de la generación de calor como un modo de acción físico y no interactúan directamente con el metabolismo del paciente, estas nanopartículas se clasifican en múltiples jurisdicciones como dispositivos médicos. Sin embargo, ellos se pueden utilizar como herramientas poderosas para el tratamiento o profilaxis de enfermedades tumorales y otras enfermedades a través de la hipertermia y/o termoablación, en donde las células tienen mal funcionamiento en una cierta región del cuerpo.

Ejemplos de tales otras enfermedades que se pueden tratar de acuerdo con esta invención son reumatismo, artritis, artrosis e infecciones bacterianas. Enfermedades tumorales que pueden ser tratadas con las nanopartículas de acuerdo con la invención son preferiblemente tumores sólidos, especialmente tumores locales o localmente avanzados o enfermedades tumorales sistémicas que causan problemas locales, tales como metástasis inoperable. Ejemplos son los tumores cerebrales, por ejemplo, glioblastoma y astrocitoma, metástasis cerebrales, cáncer de próstata, cáncer pancreático, carcinoma hepatocelular, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, carcinoma de células renales, carcinoma de ovario, carcinoma de cuello

uterino, sarcoma, carcinoma de células basales y melanoma .

Un aspecto adicional de la invención es un medicamento que comprende una suspensión o una composición de acuerdo con esta invención. La suspensión o la composición de la invención se pueden formular con los productos farmacéuticos activos, tales como agentes anti-cáncer, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos (que se pueden agrupar en agentes alquilantes, antibióticos antineoplásicos, anti-metabolitos, derivados de origen natural), hormonas/factores de crecimiento o hormona/factor de crecimiento análogos o inhibidores, inhibidores de transducción de señal y terapéuticos inmunes. Farmacéuticos apropiados se enumeran por ejemplo en Waldoefner y Stief (2011, párrafos [0096] a [0102]). De acuerdo con ello, es un aspecto de la invención que las nanopartículas de acuerdo con esta invención se combinan con estos productos farmacéuticos activos.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una suspensión o a una composición de acuerdo con la presente invención para uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad proliferativa, cáncer, tumores, reumatismo, artritis, artrosis e infecciones bacterianas como se describió anteriormente y a continuación en un paciente tal como se define anteriormente y a continuación.

Un aspecto adicional de la invención es un método de tratar o prevenir una enfermedad proliferativa, cáncer,

tumores, reumatismo, artritis, artrosis e infecciones bacterianas que comprenden el paso de administrar la suspensión o la composición de la invención a un paciente humano o animal como se describió anteriormente y a continuación.

Preferiblemente, la suspensión o composición para su uso de acuerdo con esta invención o el método de tratar o prevenir enfermedades de acuerdo con esta invención incluye además exponer al paciente a un campo magnético alterno. Por lo general, el campo magnético alterno se aplica horas o días después de la inyección de la suspensión o la composición en la región objetivo, por ejemplo, tumor, del paciente (Johannsen et al 2007; Thiesen and Jordan 2008; Maier-Hauff et al. 2011).

En analogía a Jordan et al. (2008) la suspensión o composiciones de esta invención pueden utilizarse además en un método para aumentar la actividad de un agente anti-cáncer, que comprende los pasos de administrar a un paciente en necesidad del mismo una composición farmacéutica que comprende aglomerados de nanopartículas como se describe en el presente documento y en un paso separado administrar por lo menos un agente anti-cáncer junto con por lo menos un excipiente, vehículo y/o solvente farmacéuticamente aceptable. Las dos administraciones pueden ser al mismo tiempo o una después de la otra (primero nanopartículas, segundo agente anti-cáncer o vice versa), sin embargo de tal

manera que las nanopartículas y agente anti-cáncer están presentes al mismo tiempo dentro del cuerpo del paciente con el fin de ser capaz de actuar en conjunto y mejorar el efecto terapéutico del otro. Considerando que, de acuerdo con esta invención, los aglomerados de nanopartículas permanecen dentro del tejido durante meses o años dentro del área objetivo y pueden generar calor durante la exposición a un campo magnético alterno, un agente anti-cáncer administrado típicamente actúa durante horas o días. "Actuar juntos" en este contexto significa, por lo tanto, que todavía suficientes niveles farmacológicamente activos del agente anti-cáncer están presentes en el tejido. Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención son nanopartículas de la presente invención para uso en un método para la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades tumorales, en donde las nanopartículas se administran junto con agentes anti-cáncer de tal manera, que las nanopartículas y el agente anti-cáncer están presentes al mismo tiempo dentro del cuerpo del paciente.

En una modalidad preferida, los aglomerados de nanopartículas de acuerdo con esta invención son complejados o acoplados covalentemente a un agente farmacéutico activo o a un agente de dirección tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o ligandos tales como los conocidos en el arte previo. Por ejemplo, el acoplamiento de los productos farmacéuticos y/o ligandos activos a las nanopartículas se

describe en Jordan et al. (2008), Gao et al. (2011), Waldoefner and Stief (2011) e Ivkov et al. (2005).

Otras formas farmacéuticas o dispositivos médicos apropiados de los aglomerados de nanopartículas de acuerdo con esta invención que las suspensiones son, por ejemplo, polvos para inhalación o liofilizados, que pueden ser reconstituidos antes de la infusión o inyección, o implantes que comprenden aglomerados de nanopartículas de acuerdo con esta invención, por ejemplo, dispositivos sólidos o gelatinosos médicos, esponjas o películas como, por ejemplo, se describen además en Jordan (2009).

Generalmente, los medicamentos o dispositivos médicos de acuerdo con esta invención pueden ser fácilmente combinados con terapias convencionales que se utilizan para el tratamiento respectivo o profilaxis de la enfermedad, tal como quimioterapia o radiación. Se pueden utilizar ya sea para aumentar la eficacia del tratamiento individual y/o reducir los efectos secundarios de la terapia convencional por su menor dosis si se combina con los medicamentos o dispositivos médicos de esta invención.

A la luz de la discusión general anterior, las figuras y los ejemplos específicos presentados a continuación son sólo ilustrativos y no están destinados a limitar el alcance de la invención. Otras configuraciones genéricas y específicas serán evidentes para las personas experimentadas en la

técnica.

Breve Descripción de las Figuras

Figura 1: Micrografía de transmisión de electrones de una suspensión 2 M de nanopartículas de óxido de hierro magnético fabricado de acuerdo con el Ejemplo 1.

Figura 2: La viscosidad de las tres diferentes preparaciones de nanopartículas de óxido de hierro de acuerdo con el Ejemplo 1 ha sido determinada por reometría rotacional de acuerdo con el Ejemplo 8. La viscosidad de cizallamiento en Pa s se representa en dependencia de la velocidad de cizallamiento in/s para AS1 (Fe 6 M) [lleno de diamantes], AS2 (Fe 3 M) [círculos abiertos], y AS1 (Fe 2M) [cuadrados rellenos].

Figura 3: La SAR de tres preparaciones diferentes de nanopartículas de acuerdo con el Ejemplo 1 se ha determinado de acuerdo con el Ejemplo 5. La SAR en W/g de Fe se representa en la dependencia de la intensidad del campo magnético alterno en kA/m para AS1 (Fe 6M) [rombos rellenos], AS2 (Fe 3M) [círculos abiertos], y AS1 (Fe 2M) [cuadrados rellenos].

Descripción Detallada de la Invención

Ejemplos

1. Fabricación de nanopartículas de óxido de hierro magnético recubiertas

1.1. Por medio de la precipitación de óxido de hierro a partir de soluciones de sal de hierro (AS1 y AS2)

Precipitación y Lavado: NaOH se pesa en un matraz, se

disuelve en agua purificada a una concentración de 2.13 M y es posteriormente enfriada a 25°C. Cloruro de Fe (III) y cloruro de Fe (II) (proporción 2:1) se introducen en una botella de vidrio y se disuelven en agua purificada para obtener una solución de cloruro de Fe (III) 0.48 M/ cloruro de Fe (II) 0.24 M. La solución de cloruro de hierro se vierte en la solución de NaOH y se mezcla durante un período de aproximadamente 53 min, mientras la temperatura se mantiene constante a 25°C. Las nanopartículas generadas se dejan sedimentar y se elimina el sobrenadante. Las nanopartículas se lavan con agua desgasificada hasta que el sobrenadante alcanza una conductividad de <5mS/cm.

Opcionalmente, la solución de NaOH se vierte en la solución de cloruro de hierro (en lugar de vice versa) durante un período de aproximadamente 39 min a 15°C. Esta modificación del proceso se ha realizado para las nanopartículas de AS2.

Recubrimiento y desintegración

La suspensión de nanopartículas anterior se ajusta con HCl diluido hasta que el pH está entre 2.5 y 3.0. Después, el matraz se coloca en un baño ultrasonico y se trata con ultrasonido a 45 kHz por 1 hora mientras que se agita. Ahora durante un tiempo de 90 min 3-(2-aminoetilamino)-propil)trimetoxisilano (Fluka, 48 ml por 1.2 l de suspensión

de nanopartículas) se agrega gota a gota, mientras que el pH se mantiene por debajo de un umbral de 5.5 mediante la adición de gotas de ácido acídico, pero el pH no deberá ser más bajo que 5.0. Después de este paso, el pH se ajusta a 4.65 con HCl diluido y la suspensión se trata adicionalmente con ultrasonido durante 23 horas. Las partículas fabricadas de acuerdo a este protocolo (sin los pasos opcionales) se conocen como nanopartículas AS1.

Opcionalmente, las nanopartículas son tratadas con H_2O_2 durante dos días antes del recubrimiento con el fin de conseguir una dispersión más fina de las nanopartículas y una mejor estabilidad coloidal. Además H_2O_2 se puede utilizar con el fin de oxidar completamente Fe bajo condiciones controladas a Fe_2O_3 . Como resultado reacciones posteriores se pueden realizar en la ausencia de un gas de protección (por ejemplo, argón). Este paso opcional se ha realizado para las nanopartículas AS2 de arriba.

Diálisis: La suspensión se purificó con un cartucho de diálisis de sangre (Fresenius F8 HPS) contra agua ultrapura desgasificada hasta que se alcanza una conductividad de 400 $\mu S/cm$.

Centrifugación y Concentración: La mitad de la suspensión resultante se introduce en una cubeta centrífuga y se centrifuga durante 10 min a 2000 rpm. A continuación, el sobrenadante se filtró a través de un filtro plegado (12-25

µm) en una botella de vidrio, que ha sido previamente enjuagada durante 5 min con argón. Este procedimiento se repite de forma idéntica con el segundo de la suspensión. Después, la suspensión de nanopartículas se concentró con un evaporador de rotación a la concentración de Fe deseada (por ejemplo 112 mg/ml de Fe es igual a Fe 2 M, 168 mg/ml de Fe igual a Fe 3 M, o 335 mg/ml de Fe es igual a Fe6 M). Muestras de nanopartículas pueden ser analizadas en cuanto al contenido de sólidos y concentración de Fe.

1.2. Por medio de la descomposición térmica del complejo de hierro (AS4 y AS5)

Partículas AS4 se produjeron similares a los métodos descritos en Waldoefher y Stief (2011). En resumen, cloruro de hierro (III), acetato de sodio, diaminohexano y Etilenglicol se combinaron en un matraz de tres bocas y se agitaron hasta que se obtuvo una solución homogénea. A continuación, la mezcla se calentó fuertemente hasta cerca de ebullición, y se sometió a reflujo durante cinco horas. Después del lavado y la recolección de las partículas a través de centrifugación de las partículas secas se mezclaron con óxido de trimetileno en etilenglicol y se calienta a 130°C y se mantiene durante 2 horas. A continuación, la mezcla se calentó a reflujo durante 1 hora. Para el siguiente paso de oxidación las partículas lavadas se volvieron a suspender en ácido nítrico y se trataron con nitrato de hierro. Entonces, después del lavado y

recolección las partículas por centrifugación, las partículas se revistieron con tetraalcoxisilano con el fin de formar una cubierta de SiO₂ gruesa. Las partículas resultantes se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en agua. El recubrimiento final, la desintegración y la purificación (diálisis, centrifugación y concentración) se pueden hacer de la misma manera como se describió anteriormente para las partículas AS1.

Las partículas AS5 se produjeron similar a los métodos descritos por Guardia et al. (Guardia et al 2010 a; Guardia et al 2010 b; Guardia et al 2012).

Una solución de acetilacetato de hierro (III) y ácido decanoico en dibencil éter se calienta rápidamente hasta 200°C bajo agitación. A continuación, la mezcla se agitó durante 2 horas a esta temperatura y se calentó durante 15 min a 298°C. Esta temperatura se mantuvo durante una hora más. Finalmente la suspensión se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente.

Entonces, se agregó acetona a la mezcla y el precipitado se secó al aire. Las partículas se volvieron a suspender en agua. El recubrimiento final, la desintegración y la purificación se pueden realizar de la misma manera como se describió anteriormente para las partículas AS1.

2. Concentración de hierro/Determinación del Contenido de Sólidos

La determinación de la concentración de hierro dentro de

una suspensión se basa en la medición fotométrica de la extinción de un complejo de fenantrolina de hierro (II). El complejo es generado por la extracción de las nanopartículas con ácido clorhídrico hasta que la extracción es completa como se determina por inspección visual. Todo el hierro contenido se reduce a hierro (II) usando hidrocloreuro de hidroxilamina y se transforma en el complejo de fenantrolina en ácido acético/solución amortiguadora de acetato. La extinción del complejo se determina a 513 nm utilizando un Shimadzu UV-1700 Pharmaspec contra sulfato de etilendiamonio de hierro (II) estándar (Merck, Darmstadt).

El contenido de sólidos de una suspensión se determina mediante pesado por ejemplo, 1 ml de la suspensión antes y después de la evaporación del solvente (por ejemplo agua).

3. Medición del Tamaño de la Partícula

Para medir el tamaño promedio de las nanopartículas de un procedimiento de dispersión de la luz se utiliza para determinar el tamaño hidrodinámico de la preparación de nanopartículas (por ejemplo Malvern Zetasizer 3000 HSA o Malvern Zetasizer Nano ZS). El parámetro principal es el valor promedio z , que se mide por la intensidad de la dispersión. Por lo tanto, en caso de una distribución polidispersa, las nanopartículas más grandes son pesadas más fuertes que las más pequeñas. Además, este método determina el tamaño promedio de los aglomerados de nanopartículas, y no

el tamaño de las nanopartículas individuales o primarias.

Principio: Si las nanopartículas o moléculas están iluminadas con un láser, la intensidad de la luz dispersada fluctúa a una velocidad que depende del tamaño de la nanopartícula/aglomerados puesto que las nanopartículas más pequeñas son "eliminadas" adicionalmente por las moléculas de disolvente y moverse más rápidamente. El análisis de estas fluctuaciones de intensidad produce la velocidad del movimiento browniano y por lo tanto el tamaño de las nanopartículas utilizando la relación de Stokes-Einstein.

Procedimiento: Una pequeña parte de la sustancia de ensayo se diluye dependiente de su concentración (1:1000 hasta 1:3000). Una muestra de la suspensión diluida se coloca en el dispositivo de medición y se trata de acuerdo a las recomendaciones de Malvern Zetasizer 3000 HSA.

4. Medición de Potencial Zeta

Para medir el potencial zeta de las nanopartículas, una muestra se agitó con vórtex durante 30 seg. 75 ml de una dilución 1:1000 de la solución con una concentración de aproximadamente 0.1 a 1 mg/ml para Fe (u otro metal) en agua ultrapura se preparó y se trató durante 15 min con ultrasonido. Se inyectan 20 ml de la solución en la célula de medición de Malvern Zetasizer 3000 HSA (o Malvern Zetasizer Nano ZS) y se midieron de acuerdo con las recomendaciones de la fabricación. El pH de la solución se determina con un

medidor de pH separado.

5. Medición de SAR

La SAR de las muestras del Ejemplo 1 se determinó de acuerdo con el método desarrollado por Jordan et al. (1993) a una frecuencia de 100 kHz y una intensidad de campo de hasta 3.5 kA/m. Los resultados para 3.5 kA/m e intensidades de campo superiores se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Tasa de absorción específica

	Intensidad de campo en W/g a 100 kHz	SAR
AS1 112 mg/ml de Fe	3.5	3.5
AS1 112 mg/ml de Fe	7.5	9.45
AS2 168 mg/ml de Fe	3.5	4.0
AS2 168 mg/ml de Fe	6.0	8.56
AS1 335 mg/ml de Fe	6.0	7.22
AS1 112 mg/ml de Fe	3.0	4.02
AS1 112 mg/ml de Fe	4.0	15.69
AS1 112 mg/ml de Fe	6.0	11.99

Promedios de SAR de varias corridas de fabricación de nanopartículas de AS1 y AS2 de diferentes intensidades de campo magnéticos alternos se muestran en la Figura 3.

6. Microscopía de Transmisión Electrónica

La microscopía electrónica de las nanopartículas se puede hacer mediante análisis de TEM en analogía con el método descrito por Jordan et al. (1996, página 712, 3.2.2).

Una suspensión 2 M de nanopartículas de óxido de hierro magnético fabricada de acuerdo con el Ejemplo 1 ha sido analizada por TEM. La micrografía resultante se muestra como Figura 1. En la micrografía, se pueden ver aglomerados de nanopartículas grandes (una nanopartícula individual es apuntada por una flecha). No se pueden observar nanopartículas individuales dentro del área representada - todas las nanopartículas se unen a otras.

7. Especificaciones de la Suspensión

Una corrida de producción de acuerdo con el ejemplo 1 conducen a las especificaciones físicas/químicas como se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Especificaciones de una carga representativa

	AS1	AS4	AS5
Tamaño de la partícula (promedio z)	89 nm	179.6	180.8 nm
Potencial zeta	53.5 mV	4.78 mV	42.5 mV
Conductividad (25°C)	2.16 mS/cm	0.90 mS/cm	--
pH (25°C)	5.28	4.38	--
Osmolalidad	0.03 Osmol/kg	0.08 Osmol/kg	--
SAR (a 100 kHz, en intensidad del campo dada)	10 W/g Fe (7.5 KA/m)	14 W/g Fe (4 KA/m)	12 W/g Fe (6 KA/m)
Contenido del metal total (Fe)	15 % por peso	18 % por peso	--
Concentración (Fe)	1.99 mol/l	1.70 mol/l	1.88 mol/l

8. Reometría de rotación/Medición de la viscosidad

La viscosidad de las muestras de nanopartículas se determinó por servicios de caracterización de materiales Malvern usando reometría de rotación a 20°C, en donde la viscosidad de cizallamiento (en Pa s) se determinó en dependencia de la velocidad de cizallamiento (de 7 a 1500/s). Los resultados para preparaciones de nanopartículas de acuerdo con el Ejemplo 1 se muestran en la Figura 2.

9. Formación de depósitos de fluidos magnéticos *in vivo*

1×10^6 células tumorales de la línea celular de carcinoma mamario C3H RSI se inyectaron en la extremidad posterior derecha de los ratones de la cepa C3H-HeN (Harlan Laboratories, Borchon). Una vez que los tumores inducidos tenían un volumen de 0.57-0.85 cm³, los animales fueron asignados al azar (15 animales por grupo) y los tumores de la extremidad posterior derecha fueron inyectados con el fluido magnético del Ejemplo 1 que tiene una concentración de Fe de ya sea 112 o 335 mg/ml. El contenido exacto del volumen de inyección se determinó pesando la jeringa de inyección antes y después de la inyección y calculando la diferencia (en promedio 31 μ l $\pm$ 5.8 μ l).

El contenido de Fe total de tejido/tumor de los ratones se determinó después de 0 o 7 días de medición UV-

vis a 565 nm utilizando la prueba de Spektroquant 14761 (Merck, Darmstadt) y un Cary 50 (Agilent Technologies, Santa Clara, Ca, USA) y un espectrómetro Tecan Infinite M 200 (Tecan Group Ltd, Männedorf, Suiza). El contenido de Fe aplicado inicialmente se determinó restando del contenido de Fe total del contenido del tejido/tumor inicial del tejido (determinado midiendo el contenido de Fe de la pata izquierda no inoculada) y la pérdida de fluido magnético durante la inoculación, que fue absorbida por el hisopo utilizado. La recuperación de Fe (promedio de 15 tumores por grupo) se calculó como el contenido total de Fe, dividido por el contenido de Fe aplicado inicialmente.

Tabla 3: Recuperación de Fe como se determina por Cary 50

Cary		Recuperación de Fe Tumor [%]	Recuperación de Fe Pulmón/hígado/ bazo [%]	Recuperación de Fe tumor/pulmón/hígado/ bazo [%]
112 mg/ml Fe	día 0	90	14	104
	día 7	86	10	96
335 mg/ml Fe	día 0	95	3	98
	día 7	96	3	99

Tabla 4: Recuperación de Fe como es determinado por Tecan Infinite M 200

Tecan		Recuperación de Fe Tumor [%]	Recuperación de Fe Pulmón/hígado/bazo [%]	Recuperación de Fe tumor/pulmón/hígado/bazo [%]
112 mg/ml Fe	día 0	95	16	111
	día 7	93	13	106
335 mg/ml Fe	día 0	98	4	102
	día 7	98	4	102

Considerando el contenido inicial de Fe (como es determinado en la pata izquierda) y las pérdidas por el volumen de inoculación más pequeño de los fluidos magnéticos, las tasas de recuperación de Fe total en promedio para los cuatro grupos fueron del 99% para Cary 50 y 104% para Tecan Infinite M 200. En general, las cifras de recuperación eran más altas usando Tecan Infinite M 200 (Tabla 4) frente a Cary 50 (Tabla 3).

Comparando las tasas de recuperación de Fe entre la formulación de 112 mg/ml Fe y la formulación de 335 mg/ml de Fe, ambas determinaciones revelaron una tendencia que en el día 0 más nanopartículas de Fe fueron retenidas dentro del tumor para la formulación de 335 mg/ml (95% versus 90% como es determinado por Cary, y 98% frente a 95% como es determinado por Tecan). Por otro lado, cantidades de nanopartículas de Fe encontradas en otros tejidos (pulmón,

hígado y bazo) en el día 0 fueron mucho más altas para la formulación de 112 mg/ml de Fe (14%/16% para 112 mg/ml frente a 3% para 335 mg/ml). Por lo tanto, se puede concluir que más nanopartículas de Fe son expulsadas del tumor durante y potencialmente inmediatamente después de la aplicación dentro del día 0 para la formulación concentrada inferior en comparación con la formulación concentrada más alta.

Con el fin de determinar la proporción de Fe que queda después de 7 días dentro del tumor en comparación con Fe que efectivamente se aplica al tumor en el día 0, las tasas de recuperación de Fe en el día 0 se dividieron por las tasas de recuperación de Fe en el día 7 y se promediaron entre las determinaciones por el Cary 50 y Tecan Infinite M 200 (resultados mostrados en la Tabla 5). Del mismo modo, la tasa de Fe que se acumuló en el día 0 en el pulmón, hígado y bazo se analizó mediante la comparación de la cantidad a Fe todavía presente dentro de estos órganos en el día 7.

Tabla 5: Fe Restante dentro del tumor/órganos después de 7 días (proporción entre los días 0 y 7, promediado entre Cary y Tecan)

	Fe Restante Tumor [%]	Fe Restante Pulmón/hígado/ bazo [%]
112 mg/ml Fe	97%	75%
335 mg/ml Fe	101%	100%

Mientras que para la formulación de 112 mg/ml de Fe hubo una pérdida adicional de aproximadamente 3% de Fe del día 0 al día 7, el contenido de Fe para la formulación de 335 mg/ml de Fe se mantuvo constante durante este periodo de tiempo. Curiosamente, aproximadamente $\frac{1}{4}$ de Fe que ha encontrado su camino hacia el pulmón, el hígado y el bazo para la formulación de 112 mg/ml de Fe desapareció dentro de una semana, mientras que todo el Fe de la formulación de 335 mg/ml que se encuentra en estos órganos en el día 0 permaneció allí hasta el día 7 (aunque hay que considerar que las cantidades totales de Fe encontradas en estos órganos para la formulación de 335 mg/ml de Fe fueron en total solamente aproximadamente la cantidad de Fe encontrada en estos órganos para la formulación de 112 mg/ml de Fe, ver la Tabla 3 y la Tabla 4, columna "recuperación de Fe pulmón/hígado/bazo").

Por lo tanto, la formulación de nanopartículas superior concentrada muestra adicionalmente una tasa de retención mejorada de las nanopartículas dentro del tumor durante un período de 7 días, lo que es de gran importancia, si los pacientes son sometidos a múltiples tratamientos con un campo magnético durante semanas o meses.

Literatura

Gao, J., et al. (2011). WO 201 1/082796.

Guardia, P., et al. (2012). ACS Nano 6(4): 3080-91.

Guardia, P., et al. (2010 a). Chem Commun (Camb) 46(33): 6108-10.

Guardia, P., et al. (2010 b). Langmuir 26(8): 5843-7.

Gupta, A. K. and M. Gupta (2005). Biomaterials. 26(18): 3995-4021.

Ivkov, R., et al. (2005). Therapy via Targeted Delivery of Nanoscale Particles. US 2005/0090732.

Johannsen, M, et al. (2007). Eur Urol. 52(6): 1653-61. Epub 2006 Nov 17.

Jordan, A. (2009). Implantable Products comprising Nanoparticles. WO 2009/100716.

Jordan, A., et al. (2008). Nanoparticle/Active Ingredient Conjugates. US 2008/0268061.

Jordan, A., et al. (2008). Method of Carrying Therapeutic Substances into Cells. US 2008/0187595. Jordan, A., et al. (1993). Int J Hyperthermia. 9(1): 51-68.

Jordan, A., et al. (1996). Int J Hyperthermia. 12(6): 705-22.

Lesniak, C, et al. (1997). US 6,183,658.

Maier-Hauff, K., et al. (2011). J Neurooncol 103(2): 317-24.

Massart, R. (1981). IEEE Trans. Magn. 17(2): 1247-48.

Mohapatra, M. and S. Anand (2010). Int J of Engineering, Science and Technology. 2(8): 127-46.

Moroz, P., et al. (2002). Int J Hyperthermia. 18(4):

267-84.

Ruefenacht, D., et al. (2006). WO 2006/125452.

Schnoor, A., et al. (2010). Chemie Ingenieur Technik 82(3): 317-26.

Thiesen, B. and A. Jordan (2008). Int J Hyperthermia. 24(6): 467-74.

Waldoefher, N. and K. Stief (2011). Magnetic Transducers. US 2011/0052609.

Gao, J., et al. (2011). El documento WO 2011/082796.

Guardia, P., et al. (2012). ACS Nano 6 (4): 3080-91.

Guardia, P., et al. (2010a). Chem. Commun (CAMB) 46 (33): 6108-10.

Guardia, P., et al. (2010b). Langmuir 26 (8): 5843-7.

Gupta, AK y M. Gupta (2005). Biomateriales. 26 (18): 3995 hasta 4021.

Ivkov, R., et al. (2005). Terapia a través de la entrega selectiva de partículas a nanoescala. EE.UU. 2005/0090732.

Johannsen, M, et al. (2007). Eur Urol. 52 (6): 1653-1661. Epub 2006 Nov 17.

Jordan, A. (2009). Implantables productos que comprende nanopartículas. El documento WO 2009/100716.

Jordan, A., et al. (2008). Nanopartículas / Ingrediente Activo conjugados. EE.UU. 2008/0268061.

Jordan, A., et al. (2008). Método de Llevar sustancias terapéuticas en las células. EE.UU. 2008/0187595. Jordan, A.,

et al. (1993). Int J hipertermia. 9 (1): 51-68.

Jordan, A., et al. (1996). Int J hipertermia. 12 (6): 705-22.

Lesniak, C, et al. (1997). EE.UU. 6.183.658.

Maier-Hauff, K., et al. (2011). J Neurooncol 103 (2): 317-24.

Massart, R. (1981). IEEE Trans. Magn. 17 (2): 1247-1248.

Mohapatra, M. y S. Anand (2010). Int J de Ingenieria, Ciencia y Tecnología. 2 (8): 127-46.

Moroz, P., et al. (2002). Int J hipertermia. 18 (4): 267-84.

Ruefenacht, D., et al. (2006). WO 2006/125452.

Schnoor, A., et al. (2010). Chemie Ingenieur Technik 82 (3): 317-26.

Thiesen, B. y A. Jordan (2008). Int J hipertermia. 24 (6): 467-74.

Waldoefher, N. y K. Stief (2011). Transductores magnéticos. EE.UU. 2011/0052609.

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes reivindicaciones:

1. Un método para producir una suspensión de aglomerados de nanopartículas de metal recubiertas con alcoxisilano magnético, en donde una suspensión acuosa de nanopartículas de metal magnético se incuba con alcoxisilano, caracterizado porque la incubación es realizada esencialmente en ausencia de un solvente orgánico.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque las nanopartículas de metal comprenden hierro, compuestos de complejo de hierro, compuestos de carbonilo de hierro o sales de hierro, preferiblemente sales de hierro.

3. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque la sal de hierro es un óxido de hierro, preferiblemente magnetita y/o maghemita.

4. El método de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque la suspensión acuosa de nanopartículas de óxido de hierro es

a) proporcionada por precipitación de una solución que contiene una mezcla de cloruro de hierro (III) y cloruro de hierro (II) con hidróxido de sodio, o

b) por descomposición térmica de una sal de hierro o un

compuesto de complejo de hierro.

5. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque las nanopartículas de metal magnético son tratadas con H_2O_2 antes de la incubación.

6. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el alcoxisilano es un trialcoxisilano, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste de 3-(2-aminoetilamino)-propil-trimetoxisilano, 3-aminopropiltriethoxisilano, trimetoxisililpropil-dietilentriamina y N-(6-amino-hexil)-3-aminopropiltrimetoxisilano, especialmente 3-(2-aminoetilamino)-propil-trimetoxisilano.

7. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque 0.3 a 0.6×10^{-3} mol, preferiblemente de 0.4 a 0.5×10^{-3} mol y especialmente desde 0.43 hasta 0.45×10^{-3} mol de trialcoxisilano se agregan por 0.9 mol de metal.

8. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque la incubación se realiza a un pH entre 2 y 6.

9. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque las nanopartículas magnéticas de metal son desintegradas antes de la incubación con alcoxisilano.

10. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque comprende además el paso de desintegrar las nanopartículas magnéticas después de comenzar la incubación con alcoxisilano.

11. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque comprende además el paso de eliminar nanopartículas recubiertas de forma incompleta.

12. El método de conformidad con las reivindicaciones 9 a 11, caracterizado porque los aglomerados son desintegrados hasta que se logra un tamaño promedio de 30 a 450 nm, preferiblemente de 50 a 350 nm y especialmente de 70 a 300 nm, determinado mediante dispersión de luz.

13. El método de conformidad con las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque la suspensión de aglomerados se concentra a una concentración de por lo menos aproximadamente 2 M, preferiblemente de por lo menos aproximadamente 3 M, más preferiblemente de por lo menos aproximadamente 4 M, incluso más preferiblemente de por lo menos aproximadamente 5 M, y especialmente de por lo menos aproximadamente 6 M, determinado por su contenido de metal.

14. Una suspensión de aglomerados de nanopartículas que contienen metal recubiertas con alcoxisilano magnético caracterizada porque se pueden obtener por un método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

15. Una composición que comprende aglomerados de nanopartículas de metal magnéticas recubiertas con alcoxisilano, caracterizada porque los aglomerados tienen un tamaño promedio de 30 a 450 nm, preferiblemente de 50 a 350 nm y especialmente de 70 a 300 nm como es determinado por dispersión de luz.

16. La composición de conformidad con la reivindicación 15, caracterizada porque está esencialmente libre de solventes orgánicos.

17. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15 o 16, caracterizada porque las nanopartículas de metal tienen un núcleo de metal con un tamaño de 5 a 25 nm, preferiblemente de 7 a 20 nm y especialmente de 9 a 15 nm como es determinada por microscopía electrónica.

18. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, caracterizada porque las nanopartículas de metal adicionalmente se caracterizan como es definido en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4.

19. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, caracterizada porque el potencial zeta de las nanopartículas de metal es de 25 a 80 mV, preferiblemente de 35 a 70 mV, especialmente de 45 a 60 mV, a un pH de 5.2 y una conductividad de 2.0 mS/cm.

20. La composición de conformidad con cualquiera de las

reivindicaciones 15 a 19, caracterizada porque los aglomerados se suspenden en una solución amortiguadora a base de agua fisiológicamente aceptable.

21. La composición de conformidad con la reivindicación 20, caracterizada porque las nanopartículas tienen una concentración de por lo menos aproximadamente 2M, preferiblemente de por lo menos aproximadamente 3M, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 4M, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 5M y especialmente por lo menos aproximadamente 6 M, como es determinado por el contenido de metal.

22. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 20 o 21, caracterizada porque la viscosidad de la suspensión a una velocidad de cizallamiento de 100/s es igual o mayor que 0.005 Pa s, preferiblemente igual o más de 0.01 Pa s, más preferiblemente igual o más de 0.1 Pa s, y especialmente igual o mayor que 1 Pa s, tal como es determinado por reometría rotacional.

23. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, caracterizada porque la tasa de absorción específica (SAR) de las nanopartículas en suspensión es mayor o igual de 2 W/g de Me, preferiblemente mayor o igual a 3 W/g de Me y especialmente de 4 a 12 W/g de Me, determinada a una intensidad de campo magnético de 3.5 kA/m y una frecuencia de 100 kHz.

24. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, caracterizada porque durante la inyección de la suspensión en un modelo de tumor isogeno o después del día 7 después de la inyección por lo menos 90%, preferiblemente por lo menos 93%, más preferiblemente por lo menos 95%, y especialmente por lo menos 98% de metal aplicado permanece dentro del tumor inyectado.

25. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 20 a 24, caracterizada porque se puede obtener por el método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

26. El dispositivo médico caracterizado porque comprende la suspensión de conformidad con la reivindicación 14, o la composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 25.

27. El medicamento caracterizado porque comprende la suspensión de conformidad con la reivindicación 14, o la composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 25.

28. La suspensión de conformidad con la reivindicación 14, o la composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 25, para usarse en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad proliferativa, cáncer, tumores, reumatismo, artritis, artrosis e infecciones bacterianas en un paciente.

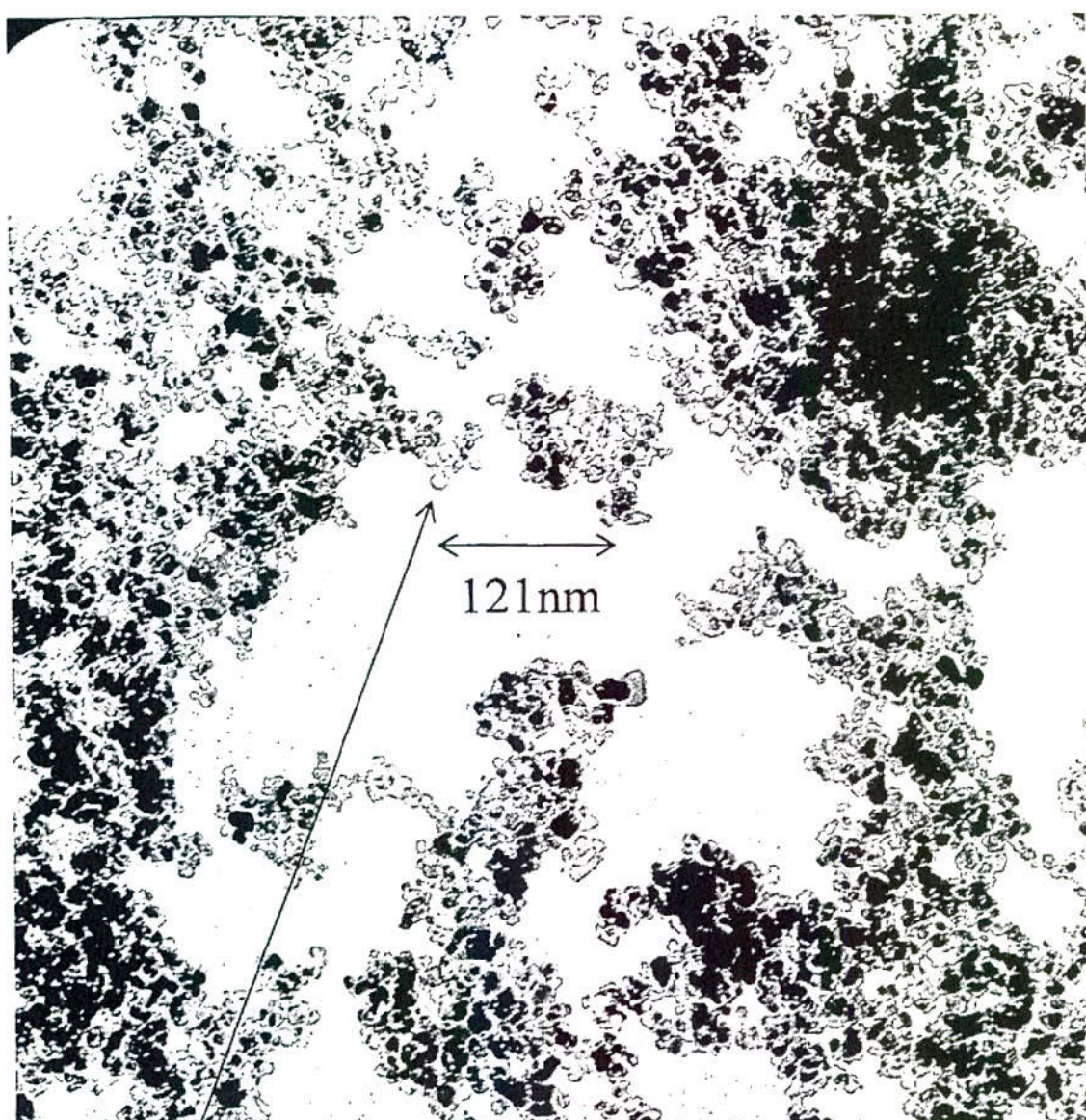
29. El método de tratamiento o prevención de una enfermedad proliferativa, cáncer, tumores, reumatismo, artritis, artrosis e infecciones bacterianas, caracterizado porque comprende el paso de administrar la suspensión de conformidad con la reivindicación 14, o la composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 25, a un paciente humano o animal.

30. La suspensión o composición para usarse de conformidad con la reivindicación 28, o el método de conformidad con la reivindicación 29, caracterizado porque incluye, además, exponer el paciente a un campo magnético alterno.

RESUMEN DE LA INVENCION

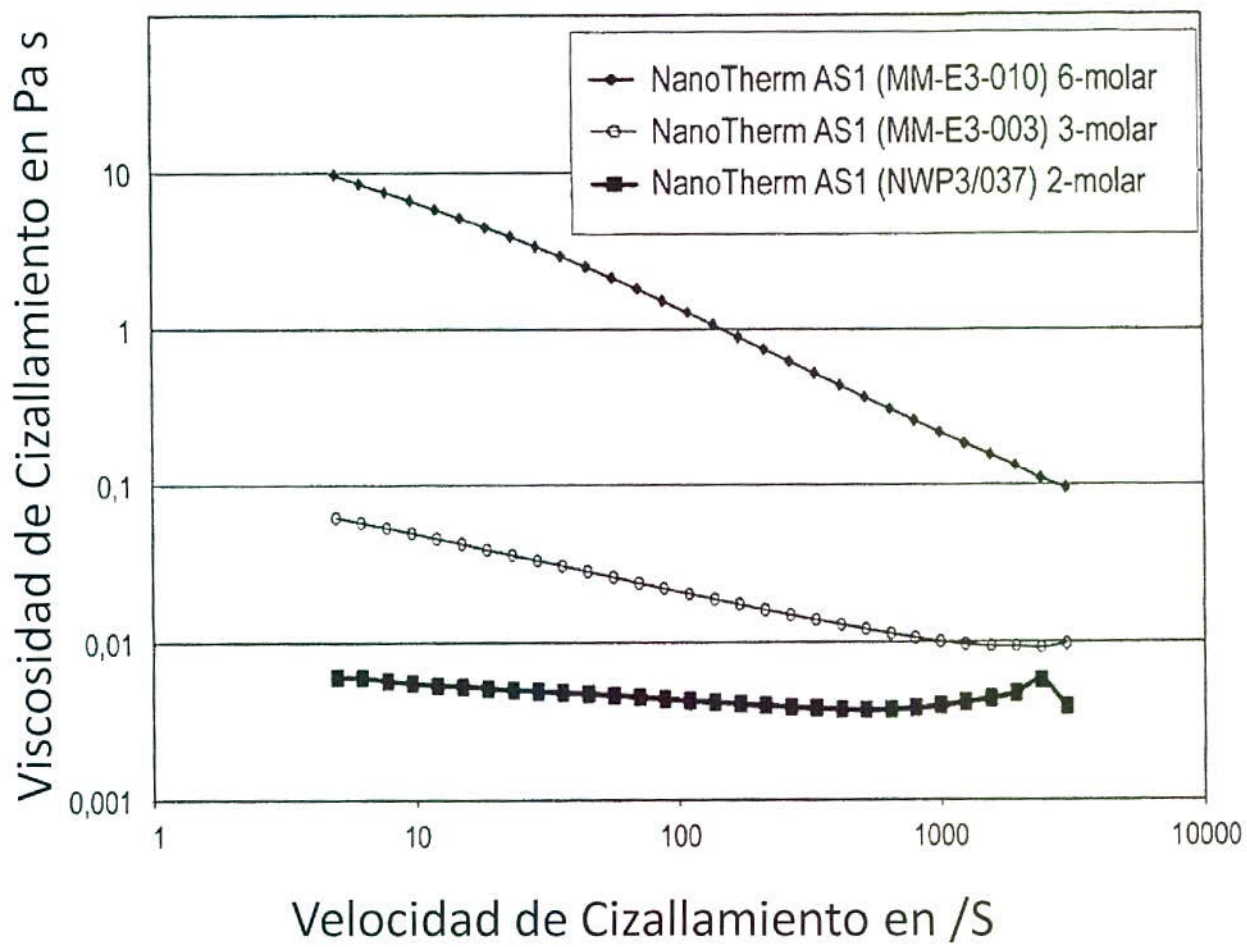
La presente invención se refiere a un método para producir una suspensión de aglomerados de nanopartículas de metal recubiertas con alcoxisilano magnético, en donde una suspensión acuosa de nanopartículas de metal magnético se incuba con alcoxisilano, en donde la incubación se lleva a cabo esencialmente en ausencia de un solvente orgánico. La presente invención se refiere además a la suspensión de aglomerados de nanopartículas que contienen metal recubiertas con alcoxisilano magnético que se pueden obtener por el método de la presente invención y a una composición que comprende aglomerados de nanopartículas de metal recubiertas con alcoxisilano magnético, en donde los aglomerados tienen un tamaño promedio de 30-450 nm, preferiblemente de 50 a 350 nm y especialmente de 70 a 300 nm como es determinado por dispersión de luz.

Figura 1



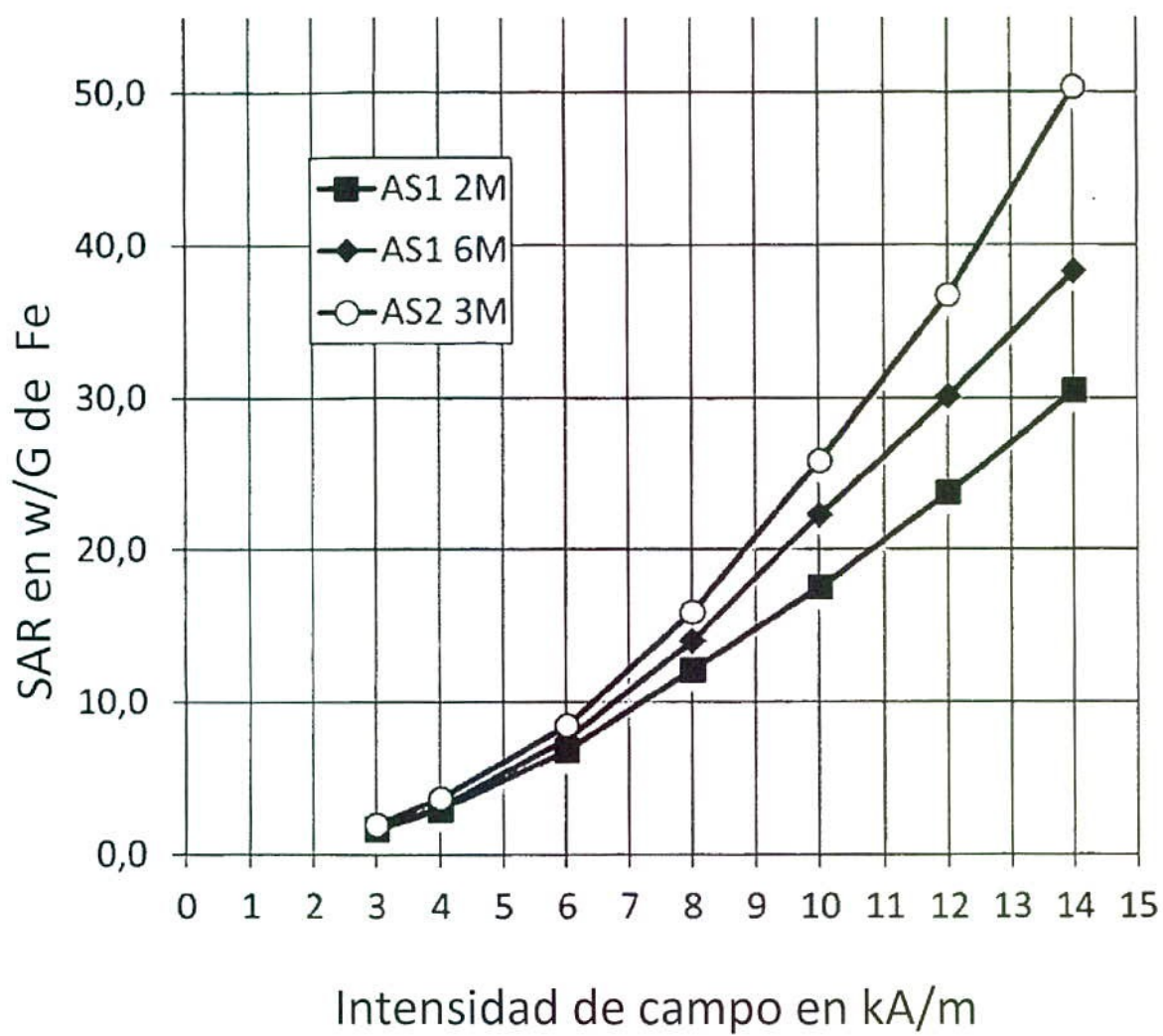
Nanopartícula

Figura 2



3/3

Figura 3



PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:
Lahrtz, Fritz
Isenbruck Bösl Hörschler LLP
Patentanwälte
Prinzregentenstraße 68
81675 München
ALLEMAGNE

ISENBRUCK|BÖSL|HÖRSCHLER LLP
Patentanwälte
Postfach 860 880
D-81635 München

26. Sep. 2013

Frist: 16.2.14 PCT 30 / 10.3.14 PCT 31 (PCT Rule 71.1)
Vorfrist:
VV: 10.10.13 / PCT 31

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY

PCT

B 1	85
B 2	FLZ
B 3	PCT

Date of mailing
(day/month/year) 25.09.2013

Applicant's or agent's file reference
M67776PC

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/EP2012/003381

International filing date (day/month/year)
07.08.2012

Priority date (day/month/year)
10.08.2011

Applicant
MagForce AG

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the international
preliminary examining authority:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized Officer

Marnell, Joanna

Tel. +49 89 2399-2557



70

PATENT COOPERATION TREATY
PCT
INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY
(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)
(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference M67776PC	FOR FURTHER ACTION	See Form PCT/PEA/416
International application No. PCT/EP2012/003381	International filing date (day/month/year) 07.08.2012	Priority date (day/month/year) 10.08.2011
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. H01F1/00		
Applicant MagForce AG		
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>8</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ sent to the applicant and to the International Bureau) a total of <u>15</u> sheets, as follows: ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see paragraph 3bis of Annex C of the Administrative Instructions).		
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☒ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application		
Date of submission of the demand 10.06.2013	Date of completion of this report 25.09.2013	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized officer Primus, Jean-Louis Telephone No. +49 89 2399-7592 	

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/EP2012/003381

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on
- ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
 - ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))
2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report):*

Description, Pages

1-23 as originally filed

Claims, Numbers

1-30 filed with the letter of 10-06-2013

Drawings, Sheets

1/3-3/3 as originally filed

- ☐ a sequence listing - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.
3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):
4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since either they are considered to go beyond the disclosure as filed, or they were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rules 70.2(c) and (c-bis)):
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
5. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 70.2 (e)).
6. ☐ Supplementary international search report(s) from Authority(ies) have been received and taken into account in drawing up this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2012/003381

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation to restrict or pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:
- ☐ restricted the claims.
 - ☒ paid additional fees.
 - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee.
 - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid.
 - ☐ neither restricted the claims nor paid additional fees.
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is:
- ☐ complied with.
 - ☒ not complied with for the following reasons:
see separate sheet
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☒ all parts.
 - ☐ the parts relating to claims Nos. .

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-30</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>1-30</u>
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-30</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2012/003381

As already indicated in the "Invitation to Restrict or to Pay Additional Search Fees", the International Preliminary Examination Authority has considered the amendments made to the international application as allowable and provides the following report:

Re Item IV

Lack of unity of invention

1. Reference is made to the following document:

D1 FENG B ET AL: "Synthesis of Fe₃O₄/APTES/PEG diacid functionalized magnetic nanoparticles for MR imaging",
COLLOIDS AND SURFACES. A, PHYSICACHEMICAL AND ENGINEERING ASPECTS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL,
vol. 328, no. 1-3, 1 October 2008 (2008-10-01), pages 52-59, XP024340266,
ISSN: 0927-7757, DOI: 10.1016/J.COLSURFA.2008.06.024
[retrieved on 2008-06-19]

2. This Authority considers that there are 2 inventions covered by the claims indicated as follows:

I: Claims 1-25 directed to a method for producing alkoxysilane-coated magnetic nanoparticles and corresponding suspension/composition, wherein the coating of the particles is performed with no organic solvent.

II: Claims 26-30 directed to a medical device/medicament and method of treating or preventing proliferative disease.

The reasons for which the inventions are not so linked as to form a single general inventive concept, as required by Rule 13.1 PCT, are as follows:

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2012/003381

The problem underlying the first invention (claims 1-25) can be defined as how to obtain biocompatible magnetic alkoxy silane-coated nanoparticles.

As solution to this problem the applicant proposes a method of preparation of said nanoparticles without using organic solvents.

The problem underlying the second invention (claims 26-30) can be defined as how to cure proliferative diseases.

As solution to this problem the applicant proposes medicament, medical apparatus and methods to perform hyperthermia treatment on patients using alkoxy silane-coated magnetic nanoparticles.

The common technical feature linking together the different groups of claims is the following: alkoxy silane-coated magnetic nanoparticles.

The closest prior art has been identified as document D1 and discloses (page 53, column 2, paragraph 1; table 1; page 55, column 2, paragraph 1 - column 1, paragraph 1; page 57, column 2, paragraph 3 - page 58, column 2, paragraph 1):

A suspension of magnetite nanoparticles coated with 3-aminopropyltriethoxysilane.

The technical feature: "alkoxy silane-coated magnetic nanoparticles" is therefore known and/or trivial in the art, and cannot be considered as a single general inventive concept linking the individual subjects in which the application has been divided.

As there is no other technical feature which could fulfil the role of corresponding special technical feature in the sense of Rule 13.1 PCT, the technical relationship between the subject-matter of the two groups of claims is lacking, and the present application lacks unity of invention.

In conclusion, groups of claims I (claims 1-25) and II (claims 26-30) are not linked by a common or corresponding special technical feature and define 2 different inventions not linked by a single general inventive concept.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2012/003381

Although amendments were filed by the applicant, they do not overcome the non-unity objection raised by the International Preliminary Search Authority in its written opinion. The application, hence still does not meet the requirements of unity of invention as defined in Rules 13.1 and 13.2 PCT.

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1.1 Opinion on the first group of claims: group of claim I (claims 1-25):

Document D1 is regarded as being the prior art closest to the subject-matter of claims 1, 14 and 15 and discloses (page 53, column 2, paragraph 1; table 1; page 55, column 2, paragraph 1 - column 1, paragraph 1; page 57, column 2, paragraph 3 - page 58, column 2, paragraph 1):

A suspension of magnetite nanoparticles coated with 3-aminopropyltriethoxysilane and prepared in water, showing agglomerates above 30 nm and below 450 nm.

The subject-matter of claims 1, 14 therefore differs from these known method and suspension in that the molar ratio between the magnetic metal nanoparticles and the alkoxysilane coating precursor is explicitly given and estimated much higher than the ratio of document D1 and is therefore new (Article 33(2) PCT).

Further the subject-matter of claim 15 therefore differs from these known method and suspension in that the value of the zeta potential of the coated magnetic metal nanoparticles is explicitly given and is therefore new (Article 33(2) PCT).

The problem to be solved by the present invention may be regarded as obtaining coated magnetic nanoparticles with a better biocompatibility and which easily form aggregates.

The solution to this problem proposed in claims 1, 14 and 15 of the present application is considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT) as the use of more than 10^3 -fold excess of magnetic nanoparticles with respect to the coating agent leads to a surface coating with an incomplete silane condensation and a given positive zeta-

potential giving a surface with better biocompatibility and not hampering particles aggregation. This specific ratio is not foreseen or suggested in document D1 which moreover teaches away from obtaining aggregates as nanoparticles aggregation is not aimed at (see p. 53, 1st paragraph).

1.2 Claims 2-13 respectively 16-25 are dependent on claim 1 respectively 15 and as such also meet the requirements of the PCT with respect to novelty and inventive step.

2.1 Opinion on the second group of claims: group of claim II (claims 26-30):

Document D1 is regarded as being the prior art closest to the subject-matter of claims 26, 27, 28 and 29 and discloses (page 53, column 2, paragraph 1; table 1; page 55, column 2, paragraph 1 - column 1, paragraph 1; page 57, column 2, paragraph 3 - page 58, column 2, paragraph 1):

An intravenous injection device containing a magnetic fluid, comprising a suspension of magnetite nanoparticles coated with 3-aminopropyltriethoxysilane and prepared in water, showing agglomerates above 30 nm and below 450 nm. Said magnetic fluid is injected to a living rabbit in order to trace a VX2 malignant tumor (to help treating it) and monitored by MRI (under variable magnetic field).

The subject-matter of claims 26, 27, 28 and 29 therefore differs from these known device, medicament, use and method of treatment in that they use coated magnetic nanoparticles being prepared with more than 10^3 -fold molar excess of magnetic metal nanoparticles with respect to the alkoxysilane coating agent and is therefore new (Article 33(2) PCT).

The problem to be solved by the present invention may be regarded as curing proliferative diseases.

The solution to this problem proposed in claims 26, 27, 28 and 29 of the present application is considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT) as the use of a coated magnetic nanoparticle suspension prepared with more than 10^3 -fold excess of magnetic nanoparticles with respect to the coating agent is not suggested in document D1.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2012/003381

2.2 Claim 30 is dependent on claims 28 and 29 and as such also meet the requirements of the PCT with respect to novelty and inventive step.

ISENBRUCK | BÖSL | HÖRSCHLER LLP
Patentanwälte

Patentanwälte · Postfach 86 08 80 · D-81635 München

European Patent Office

80298 München

Munich, June 10, 2013

PCT/EP2012/003381 / WO 2013/020701

MagForce AG

Agglomerating magnetic alkoxysilane-coated nanoparticles

Our Ref: M67776PC BÖ/FLZ/NOT

Further to the request for International Preliminary Examination (Demand under Art. 31 PCT) and in response to the Written Opinion dated February 11, 2013 (Statement under Art. 34 PCT)

I. Requests

It is herewith requested to base the International Preliminary Examination on the enclosed amended claims 1 to 30 (provided on the enclosed replacement sheets with highlighted amendments and in clean copy).

II. Amendments to the claims and basis for the amendments

1. Claims 1, 6, 7, 15, and 19 have been amended. Claims 2 to 5, claims 8 to 14, claims 16 to 18, and claims 20 to 30 are unchanged.
2. In detail, claim 1 has been amended by specifying the claimed feature "alkoxysilane" as "trialkoxysilane". Basis for this amendment can be found in original claim 6 including the disclosure of the original application on page 7, line 12. The wording of claim 6 has accordingly been

Dr. Fritz Lahrtz
Postfach 86 08 80
81635 München
Tel. +49 (89) 99 88 54-0
Fax +49 (89) 99 88 54-99
lahrtz@ib-patent.de

Patentanwälte¹
European Patent Attorneys²
European Trade Mark &
Design Attorneys³

Namens der LLP:

MANNHEIM

Günter Isenbruck
Dr.phil.nat. - Dipl.-Chem.
Wolfram Hörschler
Dipl.-Ing.
Markus Jacobi
Dr.phil.nat. - Dipl.-Chem.
Alexander Schuck
Dr.rer.nat. - Dipl.-Chem.
Hans Christoph Rippel
Dr.rer.nat. - Dipl.-Chem. - LL.M.
Edwin Büchel
Dr.rer.nat. - Dipl.-Chem.
Karsten Kudia
Dr.-Ing. - Dipl.-Ing.
Dagmar Schnalke²
Dr.rer.nat. - Dipl.-Chem.
Susanne Möller²
Dipl.-Ing.

MÜNCHEN

Raphael Bösl
Dr.rer.nat. - Dipl.-Chem.
Fritz Lahrtz
Dr.rer.nat. - Dipl.-Natw. ETH
Andrea Teschemacher
Dr.rer.nat. - Dipl.-Biol.
Andrea Laufer-Rieske²
Dr.rer.nat. - Dipl.-Biol.
Jörg Hoffmann
Dr.rer.nat. - Dipl.-Biochem.
Ulrike Herr
Dr.rer.nat. - Dipl.-Chem.
Tanja Pintsch
Dr.rer.nat. - Dipl.-Biol. II
Stephanie Nottrott
Dr.rer.physiol. - Dipl.-human biol.
Thorsten Brüntjen
Dipl.-Phys. - Bacc. Math.
Florian Laus
Dipl.-Ing.
Sandra Zinner^{1, 2}
Dr.rer.nat. - M.Sc. (Chem.)

DÜSSELDORF

Stefan Féaux de Lacroix
Dr.rer.nat. - Dipl.-Chem.
Dorothee Hollah
Dr.rer.nat. - Dipl.-Chem.
Daniel Steinbusch
Dr.rer.nat. - Dipl.-Chem.
Marc Gerauer^{1, 2}
Dr.rer.nat. - Dipl.-Chem.

MANNHEIM
Info-man@ib-patent.com

MÜNCHEN
Info-muc@ib-patent.com

DÜSSELDORF
Info-dus@ib-patent.com

Website: www.ib-patent.com

Isenbruck Bösl Hörschler LLP is registered in England and Wales as a Limited Liability Partnership with registered number OC 340012. Registered Office: Isenbruck Bösl Hörschler LLP, 10 Orange Street, Haymarket, London WC2H 7DQ, UK. The German branch is registered at the registration court at the Mannheim county court under No. PR 700145. A patent lawyer of the LLP referred to as a "partner" is not necessarily a member (*Gesellschafter*) but maybe an employee of the LLP in a senior position. This equally applies to patent lawyers that cannot be classified as either a partner or a member. A list of members and non-members and further information regarding the LLP is available at www.ib-patent.com. VAT-Reg.No. DE 226 569 505

adapted to comply with the subject-matter of revised claim 1.

3. Claim 1 has further been amended by specifying that 0.3 to 0.6×10^{-3} mol trialkoxysilane is added per 0.9 mol metal. Basis for this amendment can be found in original claim 7 including the disclosure of the original application on page 7, lines 18-20. The wording of claim 7 has accordingly been adapted to comply with the subject-matter of revised claim 1.
4. The subject-matter of claim 15 has been specified by defining that the zeta potential of the metal nanoparticles in the claimed composition is 25 to 80 mV at pH 5.2 and at a conductivity of 2.0 mS/cm. Basis for this amendment can be found in original claim 19 including the disclosure of the original application on page 11, lines 1 to 5. The wording of claim 19 has accordingly been adapted to comply with the subject-matter of revised claim 15.
5. Accordingly, the subject-matter of the amended set of claims, provided herewith, is supported by the PCT application as originally filed.

III. Patentability of the subject-matter of the amended set of claims under Article 33 (2) PCT and Article 33 (3) PCT

1. Novelty in view of D1

1.1 Novelty of claim 1 in view of D1

D1 relates to the synthesis of Fe_3O_4 /APTES/PEG diacid functionalized magnetic nanoparticles for magnetic resonance (MR) imaging and, particularly, describes a method for the production of magnetic nanoparticles by precipitating magnetite in the presence of hydrazine, including a coating procedure by silanization reaction with a subsequent washing step of the product in the presence of deionized water and ethanol (see D1 on page 53, right column, paragraph 2.4: "*Preparation of MNPs and coating procedure by silanization reaction*"). D1 also discloses the step of pegylation by describing the synthesis of diacid-functionalized nanoparticles (see page 53 of D1, right column, paragraph 2.5: "*PEG diacid coated MNPs*"). As evident from the disclosure of D1 on page 57, paragraph 3.5, D1 generally aims at producing non-agglomerating/aggregating particles: "*While after being coated with PEG diacid, the nanoparticles were well dispersed, as shown in Fig. 6c. PEG diacid coating reduced the aggregation and improved the particle dispersion (emphasis added)*".

The subject-matter of amended claim 1, in contrast, is directed towards a method for producing a suspension of agglomerates of magnetic alkoxysilane-coated metal nanoparticles, achieved by incubating the nanoparticles essentially in the absence of an organic solvent and with a particular molar ratio of aminosilane to metal. D1, however, is completely silent on a method in which an aqueous suspension of magnetic metal nanoparticles is incubated with trialkoxysilane, more in particular using the molar ratio of trialkoxysilane to metal as presently claimed. Accordingly, the method of amended claim 1 is novel in view of D1.

1.2 Novelty of claim 14 in view of D1

As outlined in the application, the *“controlled aminosilanization of iron oxide nanoparticles in the absence of organic solvents leads to magnetic nanoparticles with an incomplete condensation of the surface aminosilanes which results in a stable, water-based formulation of magnetic nanoparticles, which can be highly concentrated. Upon injection into tissue or tumor these magnetic fluids form favorable depots with a high retention rate within the target tissue”* (see page 3 of WO 2013/020701, first paragraph, lines 1 to 6). Hence, magnetic alkoxysilane-coated metal nanoparticles obtained by the method of claim 1 including suspensions thereof have improved properties as compared to those described in D1 since they reveal a better biocompatibility due to an improved depot formation within the target area, i.e. when administered to the human body, including less side effects as a consequence of their manufacture procedure (see, for example, disclosure of the application as originally filed on page 3, lines 6-10 or page 4, last paragraph: *“As shown in the examples, it has been found in the context of this invention that, for the treatment of tumors and other diseases, agglomerates of magnetic alkoxysilane-coated metal nanoparticles can better form deposits within the target area and fewer nanoparticles get lost into circulation or form deposits outside of the target area than magnetic alkoxysilane-coated metal particles which do not form agglomerates.”*).

The improved capacity of forming agglomerates is not only achieved by incubating the nanoparticles essentially in the absence of an organic solvent, but also by incubating the nanoparticles in the presence of a particular molar ratio of aminosilane to metal which defines the exact structural and, thereby, also physical properties of the alkoxysilane coating, including, for example, the zeta potential (see disclosure on page 11 of WO 2013/020701, first paragraph, lines 5 to 7; *“The zeta potential is dependent on the successful coating of the nanoparticles as it depends on the amino groups of the alkoxysilanes”*). The term “zeta potential” as referred to herein generally means the electrical potential of a colloidal nanoparticle in aqueous solution (see also disclosure on page 3, lines 26 to 29 of the application as filed). Particularly, it has surprisingly been

found that a positive zeta potential of the surface's coating results in a favorable and improved agglomerating behavior of the respective nanoparticles. Hence, the improved functional properties of agglomerates obtained by the method of claim 1 are a result of the particular way of how to provide the nanoparticle's surface coating (and as defined in claim 1), with the consequence that the suspension of agglomerates of magnetic alkoxy silane-coated metal containing nanoparticles obtainable by the method of claim 1 is clearly distinct from the nanoparticles disclosed in D1. Accordingly, the subject-matter of claim 14 is novel over D1.

1.3 Novelty of claim 15 in view of **D1**

Revised claim 15 is directed to a composition comprising agglomerates of magnetic alkoxy silane-coated metal nanoparticles, wherein the agglomerates have an average size of 30 to 450 nm and wherein the zeta potential of the metal particles is 25 to 80 mV at pH 5.2 and at a conductivity of 2.0 mS/cm. D1 discloses particles having an average diameter of 20 nm which is outside of the range defined in claim 15 (see D1 on page 57, paragraph 3.5). Furthermore, D1 is completely silent on particles having a zeta potential of 25 to 80 mV. Hence, the subject-matter of claim 15 is novel over D1.

1.4 Novelty of claims 26, 27, 28 and 29 in view of **D1**

Claim 26 pertains to a medical device comprising the suspension of claim 14 or the composition of claim 15, while claim 27 pertains to a medicament comprising either of the same. Claims 28 and 29 are both directed towards the medical use of said suspension or composition. As set forth above, the subject-matter of claim 14 and 15 is both novel in view of D1 (see paragraphs 1.2 and 1.3). Consequently, also the subject-matter of claims 26, 27, 28 and 29 has to be considered novel in view of D1.

1.5 For the reasons as set forth above, amended claims 1 to 30 are novel in view of D1.

2. Novelty in view of **D2**

2.1 Novelty of claim 1 in view of **D2**

D2 describes a method for the production of magnetic nanoparticles by precipitation, silica coating, subsequent aminosilane coating and finally coupling to oligonucleotides (see disclosure on pages 35 and 36 of D2, paragraphs 2.3, 2.4. and 2.6). D2, however, is completely silent on any molar ratio of trialkoxy silane to metal, more in particular on

the molar ratio of trialkoxysilane to metal as presently claimed. Hence, the subject-matter of amended claim 1 is novel in view of D2.

2.2 Novelty of claim 14 view of D2

As stated above, the nanoparticles obtained by the method of claim 1 are characterized by an improved biocompatibility for the treatment of tumors based on the fact that the claimed method provides nanoparticle with an incomplete condensation of the surface aminosilanes which, in turn, allows for the provision of an highly concentrated, stable, water-based formulation with high retention rates within the human body, i.e. within the targeted tumor tissue (see, for example, disclosure on page 3, first paragraph of the application as filed including arguments as outlined above under section 1.2). Since D2 is silent on the method of the present invention (see paragraph 2.1), D2 is also silent on the suspension of agglomerates as presently claimed, with the consequence that the subject-matter of claim 14 is novel in view of D2.

2.3 Novelty of claim 15 view of D2

The particles obtained by the method of D2 have sizes in the range of 30 to 100 nm (see D2 on page 37, first paragraph, including Fig. 1). Nothing in D2, however, teaches the skilled person that these nanoparticles also have a zeta potential of 25 to 80 mV at a pH of 5.2 and at a conductivity of 2.0 mS/cm. Hence, the subject-matter of amended claim 15 is novel in view of D2.

2.4 Since both the suspension of claim 14 and the composition of claim 15 are novel over D2, the subject-matter of independent claims 26, 27, 28 and 29 must also be considered novel.

2.5 For the reasons stated above, the subject-matter of amended claims 1 to 30 is novel in view of D2.

3. Novelty in view of D3

3.1 Novelty of claim 1 in view of D3

Claim 1 is directed to a method for producing a suspension of agglomerates of magnetic alkoxyasilane-coated metal nanoparticles, the method of which provides nanoparticles

with an incomplete condensation of coated aminosilanes and, thereby, with an improved surface coating resulting in nanoparticles with an improved biocompatibility.

D3 describes, among others, nanoparticles coated with aminosilanes as an intermediate for grafting of gum Arabic (GA) (see page 314, paragraph 2.3. of D3, including Fig. 1 on page 315). GA is a natural composite polysaccharide (see D3, first sentence of introduction). Of the resulting particles, only MNP-GA(APTES) relates to nanoparticles comprising an aminosilane coating. These particles, however, have opposite properties as compared to the particles of the present invention. That is, MNP-GA(APTES) particles have a negative zeta potential (i.e. about -25 mV, see Fig. 4B on page 317 of D3) due to the chemical nature of gum Arabic, in particular its CO₂ groups. In contrast, particles of the present invention have a positive zeta potential due to the presence of the aminogroups as part of aminosilane (and the lack of CO₂ groups).

Moreover, agglomerates are only described for GA coated particles (see page 317 of D3). But D3, however, is silent on the properties of aminosilane-coated intermediates prior to GA coating. In other words, D3 does not describe agglomerates of aminosilane coated nanoparticles, but instead different ways to graft gum Arabic to nanoparticles including one way using aminosilane. Moreover, D3 does not disclose the claimed molar ratio of trialkoxysilane to metal. Consequently, D3 does not disclose the method of the present invention for producing a suspension of agglomerates, with the consequence that the subject-matter of amended claim 1 is novel in view of D3.

3.2 Novelty of claim 14 in view of D3

As stated above, the nanoparticles obtained by the method of claim 1 are characterized by an improved biocompatibility for the treatment of tumors based on the fact that the claimed method provides nanoparticle with an incomplete condensation of the surface aminosilanes which, in turn, allows for the provision of highly concentrated stable, water-based formulation with high retention rates within the human body, i.e. within the targeted tumor tissue (see, for example, disclosure on page 3, first paragraph of the application as filed including arguments as outlined above under section 1.2). Since D3 is silent on the method of the present invention (see paragraph 3.1), D3 is also silent on the suspension of agglomerates as presently claimed. Furthermore, D3 discloses hydrodynamic diameters for MNP-GA(APTES) nanoparticles in the range of 600 nm (see D3 on page 317, Fig. 4 A). The agglomerates of magnetic alkoxysilane-coated nanoparticles obtained by the method of present claim 1, in contrast, have an average size from 30 to 450 nm (see disclosure on page 8 of the application as filed, first and last paragraph). Accordingly, D3 does neither describe agglomerates nor a suspension thereof as

presently claimed, with the consequence that the subject-matter of claim 14 is novel in view of D3.

3.3 Novelty of claim 15 view of **D3**

The particles obtained by the method of D3 have sizes in the range of 600 nm (see D3 on page 317, Fig. 4 A). The agglomerates of magnetic alkoxysilane-coated nanoparticles obtained by the method of present claim 1, in contrast, have an average size from 30 to 450 nm (see disclosure on page 8 of the application as filed, first and last paragraph). Furthermore, nothing in D3 teaches the skilled person that these interim nanoparticles have a zeta potential of 25 to 80 mV at a pH of 5.2 and at a conductivity of 2.0 mS/cm. Hence, the subject-matter of amended claim 15 is novel in view of D3.

3.4 Since, as outlined above, both the suspension as defined by claim 14 and the composition as defined by claim 15 are novel in view of D3, also the subject-matter of independent claims 26, 27, 28 and 29 complies with the requirement of novelty in view of D3.

3.5 Accordingly, the subject-matter of amended claims 1 to 30 is novel in view of **D3**.

4. Novelty in view of **D4**

4.1 Novelty of claim 1 in view of **D4**

In comparison to the present method of claim 1, D4 describes a very different method of producing nanoparticles. That is, D4 discloses a method for adsorption of 3-aminopropyltriethoxysilane (APTS) on magnetic nanoparticles during its formation (see D4 on page 7567, left column, second paragraph: “[i]n this paper, amine derivatised magnetite nanoparticles have been synthesized in a single step by co-precipitation of $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ in presence of (...) APTS”), whereas the present invention relates to a method wherein a suspension of (existing) magnetic nanoparticles is incubated with alkoxysilane.

In detail, D4 discloses the addition of APTS to the stirred reaction mixture over a period of 15 min during which a black precipitate formed (see page 7567 of D4, right column, 1st paragraph). Furthermore, in this setting, D4 analyses the dependency of the mean effective hydrodynamic diameter from the molar ratio of $\text{APTS}:\text{Fe}_3\text{O}_4$ (see Figure 1 on page 7568). Here, the authors of D4 conclude that „it is clear that using equimolar

amount of APTS as Fe_3O_4 (AS-3) the particle of minimum diameter has been obtained" (see page 7569, left column, last sentence of 2nd paragraph). In contrast, in the method of the present invention, only very little amounts of aminosilane (i.e. only 0.3 to 0.6×10^{-3} mol trialkoxysilane per 0.9 mol metal) are used for incubation. Consequently, D4 is silent on the method of the present invention, with the consequence that the subject-matter of claim 1 is also novel over D4.

4.2 Novelty of claim 14 in view of D4

As stated above, the nanoparticles obtained by the method of claim 1 are characterized by an improved biocompatibility for the treatment of tumors based on the fact that the claimed method provides nanoparticle with an incomplete condensation of the surface aminosilanes which, in turn, allows for the provision of highly concentrated stable, water-based formulation with high retention rates within the human body, i.e. within the targeted tumor tissue (see, for example, disclosure on page 3, first paragraph of the application as filed including arguments as set forth above under section 1.2). Since D4 is silent on the method of the present invention (see paragraph 3.1), D4 is also silent on the suspension of agglomerates as presently claimed.

Furthermore, the nanoparticles obtained by the method of the present invention are characterized by a zeta potential of 25 to 80 mV at a pH of 5.2 and at a conductivity of 2.0 mS/cm which results from the claimed production method (see, for example, page 19, paragraph 5 of the original application). In particular, D4 discloses the use of molar ratios of APTS: Fe_3O_4 in the range of 0.2 to 2.0 (see, for example, Table 1 of D4 on page 7569). The molar ratio of aminosilane vs. metal which is employed by the method of the present invention is, in contrast, in a range of more than 3 magnitudes lower. Hence, while D4 aims at providing suspensions of particularly small agglomerates as a result of using the indicated molar ratios of APTS: Fe_3O_4 outlined in Table 1, the present invention aims at providing suspensions of agglomerates with an average size of 30 to 450 nm, and therefore at providing distinct, i.e. structurally larger and in view of their biocompatibility improved, nanoparticle agglomerates. The suspension of agglomerates as claimed by claim 14 is, therefore, different from the suspension of agglomerates as described in D4. Consequently, the subject-matter of claim 14 is novel over D4.

4.3 Novelty of claim 15 view of D4

D4 is completely silent with respect to the zeta potential of the APTS: Fe_3O_4 particles obtained by the method of D4. Accordingly, nothing in D3 teaches the skilled person that these particles have a zeta potential of 25 to 80 mV at a pH of 5.2 and at a conduc-

tivity of 2.0 mS/cm. Hence, the subject-matter of amended claim 15 is novel in view of D4.

- 4.4 Accordingly, since the suspension of claim 14 and the composition of claim 15 are not disclosed by D4, the subject-matter of independent claims 26, 27, 28 and 29 must also be regarded to fulfill the requirement of novelty in view of D4.
- 4.5 For the reasons stated above, the subject-matter of amended claims 1 to 30 is novel in view of D4.

4. Inventive step in view of D4

D4 can be considered the closest prior art with respect to the subject-matter of amended claims 1 to 30 as D4 is concerned with, among other aspects, investigating the effect of increasing the concentration of APTS on the hydrodynamic diameter of synthesized nanoparticles (see page 7568, right column, 2nd paragraph).

The skilled person, however, would not have considered the teaching of D4 for achieving the subject-matter of the present invention, as D4 primarily pertains to aminosilane as a coating for the attachment of biomolecules (see, for example, page 7566 of D4, right column, middle of second paragraph: *"The most important factor which influences the applicability of these magnetic particles is the successful attachment of biomolecules to the solid magnetic particle support. ... In this context, surface modification with organosilanes is an interesting approach as these are compatible with many material used for biological purposes."*).

Furthermore, agglomeration is seen as a problem. As can be taken from the disclosure on page 7568 of D4, right column, middle of second paragraph, D4 even teaches away from lowering the molar ratio of aminosilane to Fe_3O_4 to a level of below the one which is described as example AS-1 0.25 in Table 1 on page 7569: *"Aqueous naked Fe_3O_4 particles have tendency to agglomerate and form clusters as observed in case of AS-0 due to magnetic dipole interaction. But the use of APTS prevents the magnetic interaction and hence the particle-aggregate size decreases. But after a certain concentration of APTS again agglomeration is observed which can be explained on the basis of DLVO theory based on the consideration of balance between the molecular forces of attraction and ionic forces of repulsion that act between the particles."* Hence, neither the method of claim 1 for producing a suspension of agglomerates, nor a suspension or a composition comprising said agglomerates according to the present invention is taught to the skilled person by the disclosure of D4.

Moreover, as can be taken from both Table 1 and Figure 1 of D4, the particle preparations disclosed in D4 are only stable for a couple of hours, with the consequence that the particles of D4 are not suitable at all for use in commercial products, such as medical devices or medicaments (see, for example, the subject-matter of claim 26 and 27). In contrast, the suspension of agglomerates of magnetic alkoxysilane-coated nanoparticles as defined by claim 14 is storable over months (see page 11, line 36 of the application as filed). This fact stresses the importance of the characteristic of the coating which is obtained by the method of the present invention and its influence on the physical and/or chemical properties of the particles derived thereof.

Accordingly, neither the method of claim 1, nor the products obtainable by the method of the invention, defined by the subject-matter of claims 14, 15, 26 and 27, respectively, are taught or suggested by the disclosure of D4. Hence, the claimed subject-matter must be considered inventive in view of D4.

For the reasons outlined above, the subject-matter of amended claims 1 to 30 is inventive in view of D4.

5. Inventive step in view of D1, D2 and D3

D1 aims at providing a method for producing well dispersed particles for use as an MRI contrast agent upon intravenous administration. Aggregation and/or agglomeration is seen as a problem which needs to be overcome (page 53, left column, end of 1st paragraph). Therefore, D1 teaches away from the solution underlying the technical problem of the present invention, but instead teaches towards nanoparticle suspensions with small aggregates, i.e. with an average diameter of 20 nm, in order to be suitable for intravenous administration. To the contrary, the subject-matter of the present application aims at providing a suspension of aggregates/agglomerates for achieving improved retention rates within the human body.

D2 relates to the technical problem of providing suitable surfaces as acceptor surfaces for the coupling of oligonucleotides.

D3 compares aminosilane-coated particles with GA-coated particles in view of their function as nanocarrier and/or nanoadsorbant for drug delivery (see, for example, page 319 of D3, left column, 1st paragraph of conclusions). As already mentioned, the nanoparticles described in D3 have a negative zeta potential, in contrast to the nanoparticles of the present invention with a positive zeta potential (see, for example, D3 on page 317, Figure 4).

ISENBRUCK | BÖSL | HÖRSCHLER LLP
Patentanwälte

Accordingly, none of these documents pertains to the same technical field and teaches the solution of the problem underlying the present application, i.e. the provision of improved nanoparticle agglomerates with particularly favorable biocompatibility including improved zeta potential for use in tumor treatment.

It, therefore, follows that the subject-matter of amended claims 1 to 30 is also inventive in view of D1, D2 and D3.



Dr. Fritz Lahrtz
European Patent Attorney

Enclosures

Request for International Preliminary Examination (Demand under Article 31 PCT)
Replacement sheet with amended claims 1 to 30 (with highlighted amendments)
Replacement sheet with amended claims 1 to 30 (clean copy)

PCT/EP2012/003381
MagForce AG

June 10, 2013
M67776PC

Replacement sheet

5

Amendments under Article 34 PCT

Claims

(clean copy)

- 10 1. A method for producing a suspension of agglomerates of magnetic alkoxysilane-coated metal nanoparticles, wherein an aqueous suspension of magnetic metal nanoparticles is incubated with alkoxysilane, characterized in that said incubation is carried out essentially in the absence of an organic solvent, wherein the alkoxysilane is trialkoxysilane and wherein 0.3 to 0.6×10^{-3} mol trialkoxysilane is added per 0.9 mol metal.
- 15 2. The method according to claim 1, wherein the metal nanoparticles comprise iron, iron complex compounds, iron carbonyl compounds or iron salts, preferably iron salts.
3. The method according to claim 2, wherein the iron salt is an iron oxide, preferably magnetite and/or maghemite.
- 20 4. The method according to the claim 3, wherein the aqueous suspension of iron oxide nanoparticles is
- 25 a) provided by precipitating a solution containing a mixture of iron(III) chloride and iron(II) chloride with sodium hydroxide, or
- b) by thermal decomposition of an iron salt or an iron complex compound.
- 30 5. The method according to any of the claims 1 to 4, wherein the magnetic metal nanoparticles are treated with H_2O_2 prior to the incubation.
- 35 6. The method according to any of the claims 1 to 5, wherein the trialkoxysilane is selected from the group consisting of 3-(2-aminoethylamino)-propyl-trimethoxysilane, 3-aminopropyltriethoxysilane, trimethoxysilylpropyl-diethylenetriamine and N-(6-aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilane, especially 3-(2-aminoethylamino)-propyl-trimethoxysilane.
7. The method according to any of claims 1 to 6, wherein 0.4 to 0.5×10^{-3} mol, preferably 0.43 to 0.45×10^{-3} mol trialkoxysilane is added per 0.9 mol metal.

AMENDED SHEET

8. Method according to any of claims 1 to 7, wherein the incubation is performed at a pH between 2 and 6.
9. Method according to any of claims 1 to 8, wherein the metal magnetic nanoparticles are disintegrated prior to the incubation with alkoxysilane.
10. Method according to any of the claims 1 to 9, further comprising the step of disintegrating the magnetic nanoparticles after starting the incubation with alkoxysilane.
11. Method according to any of claims 1 to 10, further comprising the step of removing incompletely coated nanoparticles.
12. Method according to claims 9 to 11, wherein the agglomerates are disintegrated until an average size of 30 to 450 nm, preferably of 50 to 350 nm and especially of 70 to 300 nm as determined by light scattering is achieved.
13. Method according to claims 1 to 12, wherein the suspension of agglomerates is concentrated to a concentration of at least about 2 M, preferably of at least about 3 M, more preferably of at least about 4 M, even more preferably of at least about 5 M, and especially of at least about 6 M as determined by its metal content.
14. A suspension of agglomerates of magnetic alkoxysilane-coated metal containing nanoparticles obtainable by a method according to any of the claims 1 to 13.
15. A composition comprising agglomerates of magnetic alkoxysilane-coated metal nanoparticles, wherein the agglomerates have an average size of 30 to 450 nm, preferably of 50 to 350 nm and especially of 70 to 300 nm as determined by light scattering, and wherein the zeta potential of the metal nanoparticles is 25 to 80 mV at pH 5.2 and a conductivity of 2.0 mS/cm.
16. The composition according to claim 15, wherein the composition is essentially free of organic solvents.
17. The composition according to any of claim 15 or 16, wherein the metal nanoparticles have a metal core with a size of 5 to 25 nm, preferably 7 to 20 nm and especially 9 to 15 nm as determined by electron microscopy.

18. The composition according to any of claims 15 to 17, wherein the metal nanoparticles are further characterized as defined in any of claims 2 to 4.
19. The composition according to any of claims 15 to 18, wherein the zeta potential of the metal nanoparticles is 35 to 70 mV, especially 45 to 60 mV, at pH 5.2 and a conductivity of 2.0 mS/cm.
20. The composition according to any of claims 15 to 19, wherein the agglomerates are suspended in a water-based physiologically acceptable buffer.
21. The composition according to claim 20, wherein the nanoparticles have a concentration of at least about 2 M, preferably of at least about 3M, more preferably of at least about 4 M, more preferably of at least about 5 M and especially of at least about 6 M, as determined by metal content.
22. The composition according to any of claims 20 or 21, wherein the viscosity of the suspension at a shear rate of 100/s is equal or more than 0.005 Pa s, preferably equal or more than 0.01 Pa s, more preferably equal or more than 0.1 Pa s, and especially equal or more than 1 Pa s, as determined by rotational rheometry.
23. The composition of any of claims 20 to 22, wherein the specific absorption rate (SAR) of the nanoparticles in suspension is larger or equal than 2 W/g Me, preferably larger or equal than 3 W/g Me and especially 4 to 12 W/g Me as determined at a magnetic field strength of 3.5 kA/m and a frequency of 100 kHz.
24. The composition of any of claims 20 to 23, wherein upon injection of the suspension into an isogen tumor model at or after day 7 after the injection at least 90 %, preferably at least 93 %, more preferably at least 95 %, and especially at least 98 % of applied metal remains within the injected tumor.
25. The composition of any of claims 20 to 24, obtainable by the method of any of claims 1 to 12.
26. Medical device comprising the suspension of claim 14 or the composition of any of claims 15 to 25.
27. Medicament comprising the suspension of claim 14 or the composition of any of claims 15 to 25.

28. The suspension of claim 14 or the composition of any of claims 15 to 25 for use in a method of treating or preventing proliferative disease, cancer, tumors, rheumatism, arthritis, arthrosis and bacterial infections in a patient.
- 5 29. Method of treating or preventing proliferative disease, cancer, tumors, rheumatism, arthritis, arthrosis and bacterial infections comprising the step of administering the suspension of claim 14 or the composition of any of claims 15 to 25 to a human or animal patient.
- 10 30. The suspension or composition for use of claim 28 or the method of claim 29, wherein said method further includes exposing the patient to an alternating magnetic field.

REIVINDICACIONES MODIFICADAS

PARA REALIZAR EL EXAMEN DE

PATENTABILIDAD

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una suspensión de aglomerados de nanopartículas de metal recubiertas con alcoxisilano magnético, en donde una suspensión acuosa de nanopartículas de metal magnético se incubaba con alcoxisilano, caracterizado porque la incubación es realizada esencialmente en ausencia de un solvente orgánico, en donde el alcoxisilano es trialcoxisilano y en donde 0.3 a 0.6×10^{-3} mol de trialcoxisilano son agregados por 0.9 mol de metal.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque las nanopartículas de metal comprenden hierro, compuestos de complejo de hierro, compuestos de carbonilo de hierro o sales de hierro, preferiblemente sales de hierro.

3. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque la sal de hierro es un óxido de hierro, preferiblemente magnetita y/o maghemita.

4. El método de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque la suspensión acuosa de nanopartículas de óxido de hierro es

a) proporcionada por precipitación de una solución que contiene una mezcla de cloruro de hierro (III) y cloruro de hierro (II) con hidróxido de sodio, o

b) por descomposición térmica de una sal de hierro o un compuesto de complejo de hierro.

5. El método de conformidad con cualquiera de las

reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque las nanopartículas de metal magnético son tratadas con H_2O_2 antes de la incubación.

6. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el alcóxisisilano es un trialcóxisilano, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste de 3-(2-aminoetilamino)-propil-trimetoxisilano, 3-aminopropiltriétoxisisilano, trimetoxisililpropil-dietilentriamina y N-(6-amino-hexil)-3-aminopropiltrimetoxisilano, especialmente 3-(2-aminoetilamino)-propil-trimetoxisilano.

7. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque 0.3 a 0.6×10^{-3} mol, preferiblemente de 0.4 a 0.5×10^{-3} mol y especialmente desde 0.43 hasta 0.45×10^{-3} mol de trialcóxisilano se agreagan por 0.9 mol de metal.

8. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque la incubación se realiza a un pH entre 2 y 6.

9. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque las nanopartículas magnéticas de metal son desintegradas antes de la incubación con alcóxisisilano.

10. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque comprende además el paso de desintegrar las nanopartículas magnéticas después

de comenzar la incubación con alcoxisilano.

11. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque comprende además el paso de eliminar nanopartículas recubiertas de forma incompleta.

12. El método de conformidad con las reivindicaciones 9 a 11, caracterizado porque los aglomerados son desintegrados hasta que se logra un tamaño promedio de 30 a 450 nm, preferiblemente de 50 a 350 nm y especialmente de 70 a 300 nm, determinado mediante dispersión de luz.

13. El método de conformidad con las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque la suspensión de aglomerados se concentra a una concentración de por lo menos aproximadamente 2 M, preferiblemente de por lo menos aproximadamente 3 M, más preferiblemente de por lo menos aproximadamente 4 M, incluso más preferiblemente de por lo menos aproximadamente 5 M, y especialmente de por lo menos aproximadamente 6 M, determinado por su contenido de metal.

14. Una suspensión de aglomerados de nanopartículas que contienen metal recubiertas con alcoxisilano magnético caracterizada porque se pueden obtener por un método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

15. Una composición que comprende aglomerados de nanopartículas de metal magnéticas recubiertas con alcoxisilano, caracterizada porque los aglomerados tienen un tamaño promedio de 30 a 450 nm, preferiblemente de 50 a 350

nm y especialmente de 70 a 300 nm como es determinado por dispersión de luz, y en donde el potencial z de las nanopartículas de metal es 25 a 80 mV a pH 5.2 y una conductividad de 2.0 mS/cm.

16. La composición de conformidad con la reivindicación 15, caracterizada porque está esencialmente libre de solventes orgánicos.

17. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15 o 16, caracterizada porque las nanopartículas de metal tienen un núcleo de metal con un tamaño de 5 a 25 nm, preferiblemente de 7 a 20 nm y especialmente de 9 a 15 nm como es determinada por microscopía electrónica.

18. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, caracterizada porque las nanopartículas de metal adicionalmente se caracterizan como es definido en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4.

19. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, caracterizada porque el potencial zeta de las nanopartículas de metal es de 25 a 80 mV, preferiblemente de 35 a 70 mV, especialmente de 45 a 60 mV, a un pH de 5.2 y una conductividad de 2.0 mS/cm.

20. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, caracterizada porque los aglomerados se suspenden en una solución amortiguadora a base de agua fisiológicamente aceptable.

21. La composición de conformidad con la reivindicación 20, caracterizada porque las nanopartículas tienen una concentración de por lo menos aproximadamente 2M, preferiblemente de por lo menos aproximadamente 3M, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 4M, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 5M y especialmente por lo menos aproximadamente 6M, como es determinado por el contenido de metal.

22. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 20 o 21, caracterizada porque la viscosidad de la suspensión a una velocidad de cizallamiento de 100/s es igual o mayor que 0.005 Pa s, preferiblemente igual o más de 0.01 Pa s, más preferiblemente igual o más de 0.1 Pa s, y especialmente igual o mayor que 1 Pa s, tal como es determinado por reometría rotacional.

23. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, caracterizada porque la tasa de absorción específica (SAR) de las nanopartículas en suspensión es mayor o igual de 2 W/g de Me, preferiblemente mayor o igual a 3 W/g de Me y especialmente de 4 a 12 W/g de Me, determinada a una intensidad de campo magnético de 3.5 kA/m y una frecuencia de 100 kHz.

24. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, caracterizada porque durante la inyección de la suspensión en un modelo de tumor isogeno o después del día 7 después de la inyección por lo menos 90%,

preferiblemente por lo menos 93%, más preferiblemente por lo menos 95%, y especialmente por lo menos 98% de metal aplicado permanece dentro del tumor inyectado.

25. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 20 a 24, caracterizada porque se puede obtener por el método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

26. El dispositivo médico caracterizado porque comprende la suspensión de conformidad con la reivindicación 14, o la composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 25.

27. El medicamento caracterizado porque comprende la suspensión de conformidad con la reivindicación 14, o la composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 25.

28. La suspensión de conformidad con la reivindicación 14, o la composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 25, para usarse en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad proliferativa, cáncer, tumores, reumatismo, artritis, artrosis e infecciones bacterianas en un paciente.

29. El método de tratamiento o prevención de una enfermedad proliferativa, cáncer, tumores, reumatismo, artritis, artrosis e infecciones bacterianas, caracterizado porque comprende el paso de administrar la suspensión de conformidad con la reivindicación 14, o la composición de

100

conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 25, a un paciente humano o animal.

30. La suspensión o composición para usarse de conformidad con la reivindicación 28, o el método de conformidad con la reivindicación 29, caracterizado porque incluye, además, exponer el paciente a un campo magnético alterno.

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

LAHRTZ, Fritz
Isenbruck Bösl Hörschler LLP
Patentanwälte
Prinzregentenstraße 68
81675 München
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 17 April 2013 (17.04.2013)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference M67776PC	
International application No. PCT/EP2012/003381	International filing date (day/month/year) 07 August 2012 (07.08.2012)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☒ the applicant	☐ the inventor	☐ the agent
☐ the common representative		
Name and Address MAGFORCE AG Max-Dohm-Str. 8, Haus B 5.2 10589 Berlin Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☐ the person	☐ the name	☒ the address
☐ the nationality		
☐ the residence		
Name and Address MAGFORCE AG Max-Planck-Straße 3 12489 Berlin Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to:		
☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority	
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned	
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned	
	☐ other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Berger Caroline
Facsimile No. +41 22 338 89 70	e-mail pt06.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 06

102

ASSIGNMENT

For good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which are hereby acknowledged, each undersigned inventor (hereinafter referred to singly and collectively as "ASSIGNOR") has sold, assigned, and transferred, and by these presents hereby sells, assigns, and transfers, unto

MagForce AG
Max-Planck-Strasse 3
12489 Berlin, Germany
(hereinafter referred to as "ASSIGNEE")

its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest for the entire world in and to this invention relating to

AGGLOMERATING MAGNETIC ALKOXYSILANE-COATED NANOPARTICLES

as set forth in

US provisional application US 61/522,217, filed 08/10/2011, and
international patent application PCT/EP2012/003381, filed 08/07/2012

as well as in and to (a) all improvements and modifications of the above-identified invention or inventions, (b) the above-identified application and all other patent applications of any country in the world for above-identified invention or inventions and all improvements and modifications thereof, (c) all patents which may issue from said applications in any country in the world, (d) all divisions, continuations, reissues, extensions and derived utility models of said applications and patents, and (e) the right to claim for any of said applications the full benefits and priority rights under the Patent Cooperation Treaty, the Paris Convention and any other international agreement; such right, title, and interest to be held and enjoyed by ASSIGNEE, its successors and assigns, to the full end of the term or terms for which any and all such patents may be granted as fully and entirely as would have been held and enjoyed by ASSIGNOR had this Assignment not been made.

ASSIGNOR HEREBY AUTHORIZES AND REQUESTS the patent offices or other competent authority to issue said patents to ASSIGNEE as assignee of the entire interest, for the sole use and benefit of ASSIGNEE, its successors and assigns.

ASSIGNOR HEREBY AGREES (a) to communicate to ASSIGNEE, its successors and assigns, or their representative or agents, all facts and information known or available to ASSIGNOR respecting said invention or inventions, improvements, and modifications including evidence for interference, reexamination, reissue, opposition, revocation, extension, or infringement purposes or other legal, judicial, or administrative proceedings, whenever requested by ASSIGNEE; (b) to testify in person or by affidavit as required by ASSIGNEE, its successors and assigns, in any such proceeding in the world; (c) to execute and deliver, upon request by ASSIGNEE, all lawful papers including, but not limited to, original, divisional, continuation, and reissue applications, renewals, assignments, powers of attorney, oaths, affidavits, and declarations, depositions; and (d) to provide all reasonable assistance to ASSIGNEE, its successors and assigns, in obtaining and enforcing proper title in and protection for said invention or inventions, improvements, and modifications under the intellectual property laws of the countries.

ASSIGNOR HEREBY REPRESENTS AND WARRANTS that ASSIGNOR has the full and unencumbered right to sell, assign, and transfer the interests sold, assigned, and transferred herein, and that ASSIGNOR has not executed and will not execute any document or instrument in conflict herewith.

Name and Signature of Inventor

Name: NORBERT WALDÖFNER Signature: N. Waldöfner Date: 2013-04-14

Name and Signature of Witnesses

Name: Christoph Reifjuep Signature: Christoph Reifjuep Date: 2013-04-18

Name: _____ Signature: _____ Date: _____

Name and Signature of Inventor

Name: ANDREAS JORDAN Signature: _____ Date: _____

Name and Signature of Witnesses

Name: _____ Signature: _____ Date: _____

Name: _____ Signature: _____ Date: _____

CESIÓN

Por una buena y valorable contraprestación, cuyo recibo y suficiencia se reconocen por medio del presente, cada uno de los inventores suscritos (en adelante denominados de manera singular y colectivamente como el "CEDENTE") han vendido, cedido y transferido, y por medio del presente documento venden, ceden y transfieren a

MagForce AG

Max-Planck-Strasse 3

12489 Berlín, Alemania

(en adelante denominado como el "CESIONARIO")

sus sucesores y cesionarios, el completo y exclusivo derecho, título e interés en el mundo completo en y para la invención relacionada con

NANOPARTÍCULAS CUBIERTAS DE ALQUILALCOXISILANO MAGNETICO AGLOMERADO

Como se establece en

La Solicitud Provisional de los Estados Unidos **61/522,217**, presentada el **08/10/2011** y
la Solicitud de patente Internacional **PCT/EP2012/003381**, presentada el **08/07/2012**

Así como también, en y para (a) todas las mejoras y modificaciones a la antes mencionada invención o invenciones, (b) la solicitud antes identificada de cualquier país en el mundo para la antes identificada invención y todas las mejoras y modificaciones a la misma, (c) todas las patentes que puedan ser expedidas de tales solicitudes en cualquier país en el mundo, (d) todas las divisiones, continuaciones, re-expediciones, prorrogas y modelos de utilidad derivados de la mencionada solicitud y patentes, y (e) el derecho a reivindicar para cualesquiera de las mencionadas solicitudes los beneficios plenos y los derechos de prioridad bajo el Tratado de Cooperación de patentes, la Convención de París y cualquier otro acuerdo internacional; tal derecho, título e interés a ser poseído y disfrutado por el CESIONARIO, sus sucesores y cesionarios, hasta la finalización total del término para el cual cualesquiera y todas las tales patentes puedan ser otorgadas como si completa y totalmente hubieren sido poseídas y disfrutadas por el CEDENTE si esta Cesión no se hubiese llevado a cabo.

EL CEDENTE POR EL PRESENTE AUTORIZA Y SOLICITA a las oficinas de patentes y a cualquier otra autoridad competente expedir las mencionadas patentes al CESIONARIO como cesionario del completo interés, para el único uso y beneficio del CESIONARIO, sus sucesores y cesionarios.

EL CEDENTE POR EL PRESENTE ACUERDA (a) comunicar al CESIONARIO, a sus sucesores y cesionarios, o a sus representantes o agentes, todos los derechos e información conocidos o que se encuentren a disposición del CEDENTE con respecto a la mencionada invención, mejoras y modificaciones, incluyendo pruebas para fines de interferencia, re-examen, re-expedición, oposición, revocación, extensión, o infracción o cualesquiera otros procesos legales, judiciales o administrativos, cuando así sea solicitado por el CESIONARIO; (b) testificar personalmente o mediante declaración juramentada como sea requerido por el CESIONARIO, sus sucesores y cesionarios, en cualquier tal proceso en el mundo; (c) suscribir y entregar, bajo solicitud del

CESIONARIO, todos los papeles lícitos, incluyendo, pero sin limitación, las solicitudes originales, de división, de continuación, de re-expedición, las renovaciones, cesiones, poderes, juramentos, declaraciones juramentadas, testimonios; y (d) suministrar toda la asistencia razonable al CESIONARIO, a sus sucesores y cesionarios, para la obtención y cumplimiento del título apropiado y la protección para tal invención o invenciones, mejoras y modificaciones bajo las leyes de propiedad intelectual de los países.

EL CEDENTE POR EL PRESENTE DECLARA Y GARANTIZA que el CEDENTE tiene el pleno y libre derecho de vender, ceder y transferir los intereses vendidos y transferidos en el presente, y que el CEDENTE no ha suscrito y no suscribirá cualesquiera documentos o instrumentos en conflicto con ellos.

Nombre y Firma del Inventor		
Nombre: NORBERT WALDÖFNER	Firma: (Firmado)	Fecha: 2013-04-14
Nombre y Firma de los Testigos		
Nombre: Cristoph Rehjueys	Firma: (Firmado)	Fecha: 2013-04-14

Traducción inglés/español efectuada por Hilda Aguilera de Piedrahita
 COLO 20867 841 001 9 - Id. 259648

ASSIGNMENT

For good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which are hereby acknowledged, each undersigned inventor (hereinafter referred to singly and collectively as "ASSIGNOR") has sold, assigned, and transferred, and by these presents hereby sells, assigns, and transfers, unto

MagForce AG
Max-Planck-Strasse 3
12489 Berlin, Germany
(hereinafter referred to as "ASSIGNEE")

its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest for the entire world in and to this invention relating to

AGGLOMERATING MAGNETIC ALKOXYSILANE-COATED NANOPARTICLES

as set forth in

US provisional application US 61/522,217, filed 08/10/2011, and
international patent application PCT/EP2012/003381, filed 08/07/2012

as well as in and to (a) all improvements and modifications of the above-identified invention or inventions, (b) the above-identified application and all other patent applications of any country in the world for above-identified invention or inventions and all improvements and modifications thereof, (c) all patents which may issue from said applications in any country in the world, (d) all divisions, continuations, reissues, extensions and derived utility models of said applications and patents, and (e) the right to claim for any of said applications the full benefits and priority rights under the Patent Cooperation Treaty, the Paris Convention and any other international agreement; such right, title, and interest to be held and enjoyed by ASSIGNEE, its successors and assigns, to the full end of the term or terms for which any and all such patents may be granted as fully and entirely as would have been held and enjoyed by ASSIGNOR had this Assignment not been made.

ASSIGNOR HEREBY AUTHORIZES AND REQUESTS the patent offices or other competent authority to issue said patents to ASSIGNEE as assignee of the entire interest, for the sole use and benefit of ASSIGNEE, its successors and assigns.

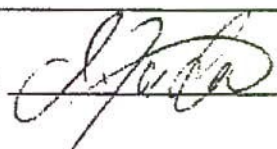
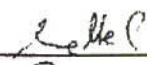
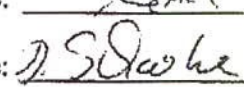
ASSIGNOR HEREBY AGREES (a) to communicate to ASSIGNEE, its successors and assigns, or their representative or agents, all facts and information known or available to ASSIGNOR respecting said invention or inventions, improvements, and modifications including evidence for interference, reexamination, reissue, opposition, revocation, extension, or infringement purposes or other legal, judicial, or administrative proceedings, whenever requested by ASSIGNEE; (b) to testify in person or by affidavit as required by ASSIGNEE, its successors and assigns, in any such proceeding in the world; (c) to execute and deliver, upon request by ASSIGNEE, all lawful papers including, but not limited to, original, divisional, continuation, and reissue applications, renewals, assignments, powers of attorney, oaths, affidavits, and declarations, depositions; and (d) to provide all reasonable assistance to ASSIGNEE, its successors and assigns, in obtaining and enforcing proper title in and protection for said invention or inventions, improvements, and modifications under the intellectual property laws of the countries.

107

Symbol 100 000 1
METTASPC

ASSIGNOR HEREBY REPRESENTS AND WARRANTS that ASSIGNOR has the full and unencumbered right to sell, assign, and transfer the interests sold, assigned, and transferred herein, and that ASSIGNOR has not executed and will not execute any document or instrument in conflict herewith.

Name and Signature of <u>Inventor</u>		
Name: NORBERT WALDÖFNER	Signature: _____	Date: _____
Name and Signature of <u>Witnesses</u>		
Name: _____	Signature: _____	Date: _____
Name: _____	Signature: _____	Date: _____

Name and Signature of <u>Inventor</u>		
Name: ANDREAS JORDAN	Signature: 	Date: 18 Jan 2013
Name and Signature of <u>Witnesses</u>		
Name: Markus Mettel	Signature: 	Date: 18 Jan 2013
Name: Denise Schache	Signature: 	Date: 18 Jan 2013

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0012787

Bogotá D.C., Febrero 04 de 2014 - 12:27:04

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	651483895	04/02/2014	22.509.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	515.000.00	515.000.00
			\$515.000.00

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-026546-00000-0000

Fecha: 2014-02-07 16:41:30 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 113

0010120867-842-001-9

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Febrero 4 de 2014 - 12:27:09

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0013650

Bogotá D.C., Febrero 06 de 2014 - 08:02:11

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	651483954	05/02/2014	13.472.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
20 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	31.000.00	620.000.00
			\$620.000.00

SON: **SEISCIENTOS VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-026546-00000-0000

Fecha: 2014-02-07 16:41:30

Tra. 11 PATENTE IYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR. NUEVAS CR

Eve: 379 FASE NACIONAL II

Folios: 113

Código: 20867-84-001-9

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Febrero 6 de 2014 - 08:02:30

112

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD FASE NACIONAL PCT	
(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) Prioridad (32) Fecha (33) País 61/522,217 2011/08/10 US		(51) Int Cl: H01F 001/000 (71) Solicitante(s) MAGFORCE AG (72) Inventor(es) NORBERT WALDÖFNER ANDREAS JORDAN (74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 2014/03/10 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 2012/08/07 No. de solicitud PCT/EP2012/003381		(87) Publicación internacional Fecha: 2013/02/14 N° publicación: WO 2013020/701 A3	
(54) Titulo: AGLOMERACION DE NANOPARTICULAS RECUBIERTAS CON ALCOXISILANO MAGNETICO			

Resumen:

La presente invención se refiere a un método para producir una suspensión de aglomerados de nanopartículas de metal recubiertas con alcoxisilano magnético, en donde una suspensión acuosa de nanopartículas de metal magnético se incubaba con alcoxisilano, en donde la incubación se lleva a cabo esencialmente en ausencia de un solvente orgánico. La presente invención se refiere además a la suspensión de aglomerados de nanopartículas que contienen metal recubiertas con alcoxisilano magnético que se pueden obtener por el método de la presente invención y a una composición que comprende aglomerados de nanopartículas de metal recubiertas con alcoxisilano magnético, en donde los aglomerados tienen un tamaño promedio de 30-450 nm, preferiblemente de 50 a 350 nm y especialmente de 70 a 300 nm como es determinado por dispersión de luz.



No. 14-026546- -00000-0000

Fecha: 2014-02-07 16:41:30 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 113

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILI

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐