

(19)



URZĄD  
PATENTOWY  
RZECZYPOSPOLITEJ  
POLSKIEJ

(10)

**PL 248068 B1**

(12)

## Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **424901**

(22) Data zgłoszenia: **2018.03.15**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2019.09.23 BUP 20/2019**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.10.13 WUP 41/2025**

(51) MKP:

**B82Y 30/00** (2011.01)

**B82Y 40/00** (2011.01)

**A61K 49/00** (2006.01)

**A61K 51/00** (2006.01)

**H01F 1/053** (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Warszawski, Warszawa, PL**  
**Instytut Chemii i Techniki Jądrowej,**  
**Warszawa, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**PAWEŁ KRYSIŃSKI, Warszawa, PL**  
**MAGDALENA OSIAŁ, Milanówek, PL**  
**PAULINA RYBICKA, Radom, PL**  
**ALEKSANDER BILEWICZ, Warszawa, PL**  
**WERONIKA GAWĘDA, Wilczeniec, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Agnieszka Żebrowska-Kucharzyk,**  
**Warszawa, PL**

(54) Tytuł:

**Superparamagnetyczna nanocząstka na bazie tlenków żelaza**

**PL 248068 B1**

## Opis wynalazku

### PRZEDMIOT WYNALAZKU

Przedmiotem niniejszego wynalazku jest superparamagnetyczna nanocząstka na bazie tlenków żelaza. Niniejszy wynalazek znajduje zastosowanie w biotechnologii i medycynie, w szczególności w technikach rozdziału, technikach obrazowania, terapii celowanej, a zwłaszcza w terapii celowanej nowotworów.

### DZIEDZINA WYNALAZKU

Zgodnie z aktualizowanymi corocznie danymi Światowej Organizacji Zdrowia liczba zachorowań na nowotwory stale rośnie. Co bardziej niepokojące, mimo stałych postępów medycyny, rośnie także śmiertelność związana z występowaniem nowotworów. Niestety prognozy na nadchodzące lata są równie zatrważające. Światowa Organizacja Zdrowia podaje, że szacuje się, iż liczba zachorowań na nowotwory w 2025 r. wzrośnie z 14 do 19 mln rocznie, w 2030 – do 22 mln, a w 2035 – aż do 24 mln (Ventith World Health Assembly Geneva, 22–31 maja 2017).

Tym samym wciąż poszukiwane są nowsze i bardziej adekwatne sposoby zapobiegania, wczesnego wykrywania i leczenia nowotworów. W szczególności zainteresowaniem cieszą się te opracowania, które koncentrują się na takich metodach leczenia, które umożliwiają selektywne uszkodzenie komórek rakowych bez wywierania niepożądanego wpływu na otaczające je zdrowe tkanki.

Ostatnio coraz częściej do praktyki medycznej wkraczają dwie nowe metody: ukierunkowana terapia radionuklidami (TRT) i magnetyczna hipertermia (MH).

TRT obejmuje podawanie wymagającemu tego pacjentowi radioaktywnego leku, określanego również jako radiofarmaceutyk, skierowanego przeciwko komórkom nowotworowym. Ten rodzaj leczenia jest nazywany "terapią celowaną" i jest ukierunkowany na specyficzne geny rakowe, białka lub środowisko tkankowe, które przyczyniają się do wzrostu i przeżycia raka. Do dziś zatwierdzono skuteczną ukierunkowaną radioterapię polegającą na biologicznie aktywnej celowanej biomolekule i radioaktywnych atomach dla kilku rodzajów nowotworów. Niezależnie, wciąż trwają prace nad poszukiwaniem najbardziej optymalnych spośród wykorzystywanych radionuklidów, w tym w szczególności pod kątem zastosowań terapeutycznych takich emiterów jak  $^{67}\text{Ga}$  ( $t_{1/2} = 3.3$  d),  $^{111}\text{In}$  ( $t_{1/2} = 2.8$  d), cząstek  $\beta$   $^{90}\text{Y}$  ( $t_{1/2} = 64$  h),  $^{188}\text{Re}$  ( $t_{1/2} = 16,7$  h),  $^{177}\text{Lu}$  ( $t_{1/2} = 6.7$  d),  $^{161}\text{Tb}$  ( $t_{1/2} = 6.9$  d),  $^{166}\text{Ho}$  ( $t_{1/2} = 26,8$  h) i cząstek emiterów  $\alpha$   $^{211}\text{At}$  ( $t_{1/2} = 7.2$  h),  $^{225}\text{Ac}$  ( $t_{1/2} = 10$  d),  $^{213}\text{Bi}$  ( $t_{1/2} = 45,6$  m).

Ważnym czynnikiem branym pod uwagę podczas wyboru radionuklidu jest jego potencjalna cytotoksyczność, wyrażana przede wszystkim przez takie parametry jak czas półtrwania i rodzaj związanych z nim emisji. Co więcej, doboru radionuklidu dokonuje się zależnie od rodzaju nowotworu. W przypadku guzów litych za najbardziej obiecujące uznaje się zazwyczaj  $\beta$ -emitery o wysokiej i średniej energii, takie jak  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{131}\text{I}$  i  $^{166}\text{Ho}$ . Skuteczny zakres tkankowy cząstek  $\beta$  nie jest jednakże optymalny do leczenia nowotworów przyjmujących postać małych skupisk komórek lub pojedynczych komórek i mikroprzerzutów, ponieważ znaczna część energii zanika osadza się poza granicą guza. Leczenie takich zmian nowotworowych może być bardziej skuteczne w przypadku niskoenergetycznych  $\beta$ -emiterów, które łączą krótkotrwałą i wysoki liniowy transfer energii. Powszechnie stosowanymi emiterami  $\beta$  o niskiej energii są  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{161}\text{Tb}$  i  $^{47}\text{Sc}$ . Obecnie zarejestrowane są dwa przeciwciała terapeutyczne: tositumomab znakowany  $^{131}\text{I}$  (BEXXAR), do stosowania w leczeniu chłoniaka grudkowego oraz ibritumomab znakowany  $^{90}\text{Y}$  (Zevalin) do stosowania w leczeniu nieziarniczego chłoniaka z limfocytów B.

Innym podejściem terapii celowanej, obecnie w fazie rozwoju, jest hipertermia magnetyczna (MH). Podstawą tej metody jest uszkodzanie lub uśmiercanie komórek nowotworowych w ciele pacjenta prowadzone w podwyższonej temperaturze. Liczne badania komórkowe wykazały, że hipertermia wywołuje programowaną śmierć komórki (apoptozę), jak również śmierć komórki (nekrozę) w zależności od rodzaju komórki i stosowanej temperatury. Zgodnie z tym sposobem, wtryskiwane do ciała nanocząstki magnetyczne są poddawane działaniu zmiennego pola magnetycznego o odpowiedniej intensywności i częstotliwości, dzięki czemu, w wyniku zachodzących w nich procesów namagnesowania, uwalniane jest ciepło. Poprzez dobranie parametrów pola magnetycznego (amplitudy, częstotliwości i czasu) można kontrolować lokalny wzrost temperatury do poziomu wystarczającego dla zniszczenia guza. W zastosowaniach medycznych zazwyczaj stosuje się częstotliwości radiowe od kilku kHz do 1 MHz, które są całkowicie bezpieczne i zapewniają dostateczną głębokość penetracji, umożliwiającą dostęp do narządów wewnętrznych w ciele. Hipertermię magnetyczną prowadzi się zwykle w dwóch różnych zakresach temperatur, wywołujących różne uszkodzenie komórek. Umiarkowane temperatury

(41– 46°C) wpływają na funkcjonalność białek międzykomórkowych, prowadząc do degradacji komórkowej i ostatecznie wywołując apoptozę. Traktowanie komórek temperaturami powyżej 46°C może prowadzić bezpośrednio do śmierci komórki. Hipertermia w tych temperaturach jest ogólnie określana jako termoablacja i charakteryzuje się nekrozą tkanek, koagulacją lub karbonizacją.

Zaletą takiego podejścia terapeutycznego jest to, że kontrolując miejsce nanoszenia/wprowadzania nanocząstek magnetycznych kontrolujemy miejsce wydzielania ciepła, a tym samym działania podwyższoną temperaturą na komórki. Z uwagi na rozmiar nanocząstek, wyrażany w jednostkach wynoszących  $10^{-9}$  m, są one łatwo transportowane wewnątrz organizmu osobnika i mogą przenikać zarówno fizyczne, jak i fizjologiczne bariery.

Ostatnio odkryto, że kombinacja idei wyrażanej przez wskazane obie metody, a więc zewnętrznego promieniowania jonizującego i hipertermii magnetycznej, zapewnia korzystny efekt synergistyczny uszkodzania lub uśmiercania komórek nowotworowych w porównaniu z efektem obserwowanym w odniesieniu do każdej z tych metod oddzielnie. Pozwoliło to na spektakularną poprawę efektów terapeutycznych, przykładowo na znaczne wydłużenie życia pacjentów, nawet przy najbardziej agresywnych nowotworach mózgu. Zakłada się, że ten efekt będzie również obecny, lub będzie jeszcze większy, gdy zamiast promieniowania zewnętrznego zastosuje się radionuklidy emitujące promieniowanie jonizujące wewnątrz guza.

#### STAN TECHNIKI

Zawierające paramagnetyczny, superparamagnetyczny, polimerowy lub złoty rdzeń nanocząstki są powszechnie znane w dziedzinie i znajdują liczne zastosowania terapeutyczne. Są one przede wszystkim wykorzystywane w różnorodnych testach bioanalitycznych, bioseparatorach i pomiarach biofizycznych.

Znane jest także zastosowanie takich paramagnetycznych i superparamagnetycznych nanocząstek do rozdzielania i oczyszczania komórek i mikroorganizmów, takich jak wirusy i biologiczne makrocząstki. Ponadto, nanocząstki paramagnetyczne i superparamagnetyczne można również stosować do prowadzenia pomiarów biofizycznych. Na przykład, zdolność paramagnetycznych i superparamagnetycznych nanocząstek do wytwarzania pola pod wpływem zewnętrznego pola magnetycznego wykorzystano do rozróżniania oddziaływania specyficznego i niespecyficznego, jak również do charakteryzowania specyficznych oddziaływań.

W stanie techniki znany jest również udział nanocząstek paramagnetycznych i superparamagnetycznych w dostarczaniu leków i obrazowaniu. Jak zasygnalizowano powyżej, nanocząstki paramagnetyczne i superparamagnetyczne stosuje się w połączeniu z polem magnetycznym i/albo polem wytwarzanym przez prąd zmienny do kierowania środków terapeutycznych do określonych komórek docelowych.

Na procesy zachodzące wewnątrz patologicznych komórek macierzystych i innych komórek można skuteczniej wpływać i je regulować przez wewnątrzkomórkowe dostarczanie różnych biologicznie aktywnych cząsteczek. Te bioaktywne cząsteczki mogą normalizować docelową funkcję komórkową lub prowadzić do uśmiercenia komórki. Jednakże, błona komórkowa stanowi istotną barierę chroniącą procesy zachodzące wewnątrz komórki przed bodźcami egzogennymi. Z tego też powodu, zdolność przenikania przez błonę komórkową jest często kluczowym parametrem dla opracowania skutecznych leków na bazie małych cząsteczek. Takie małe cząsteczki, które są specyficzne względem zmutowanego powodującego chorobę czynnika, zasadniczo nie są dostępne. Tak więc, istnieje istotne zapotrzebowanie na związki terapeutyczne i kompozycje, które mogą skutecznie przenikać przez błonę komórkową, aby dostarczyć do wnętrza komórki biologicznie aktywne cząsteczki, które są zdolne do modulowania pożądanej funkcji komórkowej.

Niestety, mimo znacznych postępów w dziedzinie technologii nanocząstek, zapotrzebowanie na środki, wykazujące specyficzny dostęp do przedziałów wewnątrzkomórkowych komórki docelowej oraz umożliwiające regulację, modulację, normalizację i/albo przywracanie jednej lub większej liczby pożądanych funkcji komórkowych, wciąż nie jest zaspokojone.

Skutecznym kierunkiem leczenia nowotworów stają się metody celowane, takie jak celowana terapia radionuklidowa, wykorzystująca radionuklidy, emitery promieniowania korpuskularnego, które przyłączone do cząsteczek biologicznie aktywnych selektywnie akumulują się w chorej tkance. Ich wyjątkową zaletą jest niszczenie chorych tkanek bez jednoczesnego uszkodzania zdrowych. Jednakże, takie podejście pozwala jedynie na wytworzenie radiofarmaceutyku, w którym naprowadzająca biomolekuła jest znakowana jednym lub paroma atomami radioizotopu (P Carmaliel, R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature* **42** (2000) 249–257).

Ostatnio, radioaktywne nanocząstki znajdują coraz szersze zastosowanie, zarówno w diagnostyce, jak i terapii medycznej. Ich główną zaletą jest fakt, że każda nanocząstka zawiera co najmniej setki radioaktywnych atomów. Dotychczas badano znakowane radionuklidami nanocząstki takie jak, liposomy, kropki kwantowe, nanocząstki złota, dendrymery, tlenki żelaza czy polimery. Przyszłość nanocząstek w medycynie związana jest jednak z ich multimodalnością polegającą na połączeniu wielu metod terapeutycznych, np. chemio- i radioterapii, czy radioterapii i hipertermii w jednej nanocząstce, co jest niezwykle istotne ze względu na dużą oporność komórek nowotworowych.

Bardzo obiecującą metodą terapii nowotworów jest również tak zwana magnetyczna hipertermia. Metoda ta umożliwia precyzyjne niszczenie nowotworów przez lokalne zwiększenie ich temperatury. Charakterystyczne jedynie w nanoskali właściwości, w tym, na przykład, możliwe do przełączania właściwości magnetyczne, sprawiają, że za unikalne uznaje się superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza (określane również jako „SPION”, ang. „Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles”), które są obecnie z powodzeniem stosowane w biomedycynie, między innymi w obrazowaniu medycznym i śledzeniu wędrówki komórek. Tlenki żelaza są uważane za biokompatybilne i stosunkowo nietoksyczne, w wyniku czego nanocząstki tlenku żelaza zostały zsyntetyzowane i wykorzystane do wielu zastosowań biomedycznych (patrz np. D. Huber, Small 2005, 1, nr 5, s. 482–501 Wiley-VCH: Gupta i wsp., *Biomaterials*, tom 26, str. 3995–4021 (2005)). Jak wiadomo w przypadku zastosowań *in vivo*, nanocząstki, które są wystarczająco małe, aby przejść przez układ filtracji nerki, mogą być skutecznie oczyszczone i usuwane z krwioobiegu. Wiadomo także, że wielkość wymagana do filtracji nerkowej wynosi mniej niż 10 nm, a bardziej korzystnie mniej niż około 6 nm. W związku z tym biologicznie kompatybilne nanocząstki, zdolne do przejścia przez otwór sitowy o średnicy 10 nm i korzystnie 6 nm, mogą być wykorzystane do zastosowań *in vivo*, w tym do obrazowania, diagnostyki i terapii. Odpowiednią równowagę między czasem krążenia i klirensu uzyskuje się przez kontrolowanie właściwości fizykochemicznych nanocząstki. SPIONy spełniają wszystkie wymagania stawiane takim nanocząstkom do zastosowań *in vivo*. Po podaniu dożylnym, SPIONy są usuwane z krwi na drodze fagocytozy przez układ siateczkowo-śródbłonkowy (RES), a następnie pobierane przez wątrobę, śledzionę, szpik kostny i węzły chłonne. Po wewnątrzkomórkowym pobraniu, SPIONy są metabolizowane w komórkowych lizosomach w rozpuszczalną, nieparamagnetyczną postać żelaza, która staje się częścią normalnej puli żelaza i włącza się do ferrytyny i hemoglobiny *in vivo*.

SPIONy, jako nanocząstki paramagnetyczne, poddane działaniu zmiennego pola magnetycznego, ogrzewają się i stają się lokalnym źródłem ciepła. Umożliwia to podgrzanie nowotworu do temperatur 43–46°C (hipertermia) albo doprowadzenie do termoablacji w temperaturze >47°C. Metoda ta jest na tyle selektywna, że otaczające zdrowe tkanki nie nagrzewają się i tym samym nie są niszczone.

Stosując klinicznie hipertermię stwierdzono występowanie synergicznego efektu pomiędzy lokalną hipertermią a zewnętrznym naświetlaniem promieniowaniem jonizującym (T.M. Zagar, J.R. Olson, Z. Vujaskovic et al, Hyperthermia combined with radiation therapy for superficial breast cancer and chest wall recurrence: A review of the randomised data, *Int. J. Hyperthermia*. 26 (2010) 612–617). Wykorzystanie wiązki promieniowania  $\gamma$  oraz lokalnego podgrzewania umożliwiło niszczenie nawet opornych radiacyjnie i lekowo komórek nowotworowych oraz znaczne wydłużenie życia pacjentów z tak agresywnymi nowotworami jak np. glejak wielopostaciowy (P. Kaur, M.D. Hurwitz, S. Krishnan, A. Asea, Combined hyperthermia and radiotherapy for the treatment of cancer, *Cancers* 3 (2011) 3799–3823) czy guzy sutka posiadające receptory HER2 (E. Alphonse, Perspectives of breast cancer therapeutics, *J. Cancer* 5 (2014) 472–479).

Zastosowanie magnetycznej hipertermii w połączeniu z radioterapią pozwala na zmniejszenie w istotnym stopniu stosowanych dawek promieniowania. W dotychczasowych pracach niejednokrotnie stosowano kombinacje lokalnej hipertermii z zewnętrznymi źródłami promieniowania, takimi jak promieniowanie  $\gamma$ , czy wiązka elektronów. Jednakże, bardzo rzadko stosowano skoniugowany efekt terapeutyczny hipertermii i terapii radionuklidowej, gdzie źródłem emisji promieniowania jonizującego oraz ciepła jest ta sama nanocząstka zlokalizowana na powierzchni lub wewnątrz tkanki nowotworowej.

W ostatnich latach podjęto liczne próby zaproponowania takich właśnie układów wykazujących jednocześnie zdolność do hipertermii i terapii radionuklidowej.

Przykładowo, dokument WO 2017/210666 A2 ujawnia funkcjonalizowane nanocząstki umożliwiające penetrację przez błonę komórkową ssaka i dostarczanie wewnątrzkomórkowo jednej lub większej liczby biologicznie aktywnych cząsteczek, zawierających rdzeń nanocząstki, jedną lub większą liczbę cząsteczek penetrujących błonę komórkową, i jedną lub większą liczbę biologicznie czynnych cząste-

czek do wprowadzenia lub oddziaływania na funkcje komórkowe. W publikacji tej opisano również sposoby wytwarzania sfunkcjonalizowanych nanocząstek oraz stosowanie takich sfunkcjonalizowanych nanocząstek do leczenia chorób i zaburzeń indukujących przeprogramowanie komórek i zmienianie genów.

Bardziej szczegółowo, w zgłoszeniu tym ujawniono sfunkcjonalizowane nanocząstki zawierające bioaktywne cząsteczki do wewnątrzkomórkowego dostarczania i regulowania, modulowania i/albo normalizowania funkcji komórkowych, w tym, na przykład, wzrostu/prolifracji komórek, różnicowania i/albo przeżycia komórek. Ujawniono tam również sposoby wytwarzania sfunkcjonalizowanych nanocząstek zawierających cząsteczki bioaktywne i sposoby stosowania sfunkcjonalizowanych nanocząstek do dostarczania cząsteczek bioaktywnych do komórek docelowych *ex vivo* lub *in vivo*, w tym: sposoby leczenia chorób i zaburzeń; sposoby generowania komórek macierzystych (np. pluripotencjalnych komórek macierzystych indukowanych nanocząstkami (niPSC)) z komórek somatycznych; sposoby generowania dojrzałych typów komórek przez indukowanie różnicowania komórek macierzystych (np., niPSC); sposoby generowania różnych dojrzałych typów komórek bezpośrednio z innych dojrzałych typów komórek somatycznych (tj. bezpośrednie przeprogramowanie) i sposoby zmieniania genów.

W stanie techniki znane są również nanocząstki do leczenia nowotworów stosowane w połączeniu z radioterapią przy zastosowaniu promieni rentgena. Przykłady takich cząstek stanowią nanocząstki z tlenków metali, takich jak ditlenek tytanu, tlenek cynku, tlenek ceru i mieszaniny dwóch lub więcej spośród nich, domieszkowane dodatkowo rzadkimi pierwiastkami. Przykładowo, radioaktywny  $^{166}\text{Ho}$  na polimerowych mikrosferach poli-L-laktydowych (PLLA) znany jest jako środek skuteczny do leczenia nowotworów złośliwych wątroby. Wadą takich załadowanych na mikrosferach PLLA radioaktywnego holmu jest ograniczona ładowność nośnika dla wprowadzania radionuklidu. Średnie ładowanie holmem w zaproponowanych mikrosferach wynosi około 17% (wagowo).

Nanocząstki magnetyczne zawierające  $^{165}\text{Ho}$  i  $^{164}\text{Dy}$  wraz z lekiem przeciwnowotworowym mogą być stosowane do magnetycznie ukierunkowanej radioterapii i chemioterapii w tym samym czasie.

Przykładowo, amerykańskie zgłoszenie US 2015/0202337 ujawnia nanocząstki ferrogranatu i/albo cząstki ferrogranatu zawierające różnorodne, podatne na aktywację nuklidy, takie jak holm-165 ( $^{165}\text{Ho}$ ) i dysproz-164 ( $^{164}\text{Dy}$ ). Nanocząstki ferrogranatu (np. HoIG i DyIG) i cząstki ferrogranatu mogą być wytwarzane z zastosowaniem współstrącania metodą wodorotlenkową. Zgodnie z przykładami wykonania opisanymi w publikacji US 2015/0202337, radiosensytyzery (radiosensybilizatory) mogą być załadowane na radioaktywne nanocząstki magnetyczne lub radioaktywne cząstki ferrogranatu i, ewentualnie, pokryte odpowiednimi dwuwarstwami lipidowymi. Publikacja ta opisuje również sposoby stosowania ujawnionych tamże nanocząstek i cząstek dla celów terapeutycznych, w szczególności w chorobach, których leczenie opiera się na radioterapii. Zgodnie z ujawnieniem nanocząstki, jak ujawnione w publikacji, wykazują wysoką zdolność ładowania leków, które mogą zapewnić pożądane efekty radio-terapeutyczne.

Z kolei dokument patentowy US 2005/0265922 A1 ujawnia nanostruktury multimodalne, sposoby tworzenia takich nanostruktur i sposoby ich zastosowania. Przykładowa nanostruktura multimodalna według US 2005/0265922 obejmuje, między innymi, co najmniej jedną nanogrupę mającą pierwszą wykrywalną funkcjonalność i drugą cząsteczkę mającą drugą wykrywalną funkcjonalność. Druga cząsteczka jest przyłączona do nanocząstki, przy czym pierwsza wykrywalna funkcjonalność i druga wykrywalna funkcjonalność są różne. Nanostruktury takie, funkcjonalizowane więcej niż jedną cząsteczką związaną z nanostrukturalnym rdzeniem multimodalnej nanostruktury, mogą być stosowane w wielu zastosowaniach, takich jak, ale nie wyłącznie, jako środki kontrastowe do obrazowania wielomodalnego (*in vitro* i *in vivo*), biobarwienie, badania i analiza ekspresji genów oraz białek, diagnostyka medyczna, biblioteki diagnostyczne, systemy mikroprzepływowe, do obrazowania, wykrywania i/albo wizualizacji.

Ponadto nanostruktury te można modyfikować (przykładowo przez przyłączenie sond biomolekularnych do nanostruktury) w taki sposób, że nanostruktury oddziałują z określonymi cząsteczkami docelowymi, co umożliwia wykrywanie cząsteczek docelowych przy użyciu jednej lub większej liczby technik obrazowania. Na przykład, jak wskazano w cytowanym opisie, nanostruktury multimodalne w połączeniu z obrazowaniem spektralnym mogą być stosowane do multipleksowania, obrazowania optycznego i wykrywania genów, białek i leków małocząsteczkowych w pojedynczych żywych komórkach, podczas gdy MRI, PET i tym podobne techniki, umożliwiają obrazowanie związków magnetycznych i radioaktywnych. Ponieważ każda technika obrazowania wykazuje mocne i słabe strony, nanostruktury multimodalne mogą być stosowane do łączenia dwóch lub więcej spośród technik obrazowania.

W jednej z opisanych tamże postaci wykonania, cząsteczka sondy wykazuje powinowactwo do jednej lub większej liczby cząsteczek docelowych (np. komórki rakowej), których wykrycie jest niezwykle pożądane (np. określanie obecności i/albo pozycji w naczyniu (ciele). Ponadto sonda może również obejmować, ale nie wyłącznie, lek, środek terapeutyczny, czynnik radiologiczny, lek małowcząsteczkowy i ich kombinacje, które mogą być stosowane do leczenia docelowej cząsteczki i/albo związanej z nią choroby i stanu. Lek, środek leczniczy i czynnik radiologiczny mogą być wybrane na podstawie zamierzonego leczenia, jak również stanu i/albo choroby. W przykładzie wykonania nanostruktura może obejmować dwie lub większą liczbę sond stosowanych do leczenia.

Jak zasygnalizowano powyżej, w ostatnim czasie, z uwagi na ich wyjątkowe właściwości, szczególnie zainteresowaniem są objęte nanocząstki tlenku żelaza. Poprzez dopasowanie ich rozmiaru, kształtu lub współczynnika kształtu można kontrolować właściwości magnetyczne układu. Gdy cząstka materiału magnetycznego ma wystarczająco mały rozmiar (na przykład w zakresie od około 2 do 100 nanometrów), moment magnetyczny materiału nie może być trwale spolaryzowany. Uważa się, że taka nanocząstka jest superparamagnetyczna i dzięki swoim właściwościom umożliwia wzbudzenie chwilowe. Dlatego też za szczególnie interesujące uważa się SPIONy takie jak ujawnione w publikacji US 2013/0256583. Zgodnie z publikacją, jednym z głównych wyzwań stawianych takim SPIONom, użytecznym do zastosowań *in vivo*, jest zapobieganie ich przedwczesnej agregacji i/albo ich wychwytywaniu przez naturalne mechanizmy. Zapewnia się to zazwyczaj przez dostarczenie zewnętrznych powłok z poli(glikolu etylenowego) (PEG) (Mahmoudi i wsp., *Advanced Drug Delivery Reviews*, tom. 63, str. 24046 (2011)). Jednakże, z uwagi na fakt, że takie wielkocząsteczkowe polimerowe materiały stabilizujące SPIONy zwiększają znacząco ich rozmiar, a tym samym obniżają właściwości superparamagnetyczne, twórcy wynalazku ujawnionego w publikacji zgłoszeniowej US 2013/0256583 ujawnili nie tylko sam rdzeń takiego SPIONu, lecz również zaproponowali stabilizującą skorupę zawierającą obojętne grupy funkcyjne (zwitteriony).

Jak wskazano w opisie US 2013/0256583, rdzeń SPIONu obejmuje jeden lub większą liczbę paramagnetycznych tlenków żelaza, takich jak magnetyt,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  i maghemit  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ . Jak podkreślono w opisie, rdzeń SPIONu, oprócz tlenków żelaza, może dodatkowo zawierać również i inne składowe, takie jak grupa fluorescencyjna, dodatkowy materiał magnetyczny, środek wyłapujący neutrony lub ich kombinację, czy też radioaktywny nuklid.

Zgodnie z ujawnionymi korzystnymi postaciami wykonania wynalazku według US 2013/0256583, rdzeń obejmuje dodatkowo jeden lub większą liczbę materiałów magnetycznych, które obejmują radionuklidy. Przykładowe, ujawnione w tej publikacji radionuklidy, które mogą być korzystnie zgodnie z wynalazkiem włączone do nanocząstki według wynalazku w rdzeniu obejmują:  $^{111}\text{Ag}$ ,  $^{199}\text{Au}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{165}\text{Dy}$ ,  $^{166}\text{Dy}$ ,  $^{69}\text{Er}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{140}\text{La}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{103}\text{Pd}$ ,  $^{149}\text{Pm}$ ,  $^{193}\text{Pt}$ ,  $^{195}\text{Pt}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{90}\text{Sr}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{175}\text{Yb}$  i  $^{90}\text{Y}$ . W jednym z korzystnych wykonania wynalazku w jednym przykładzie wykonania rdzeń nanocząstki, oprócz tlenków żelaza, zawiera dodatkowo, jeden lub więcej materiałów magnetycznych, które zawierają pierwiastek wybrany z grupy obejmującej między innymi holm i jego kombinacje. Zgodnie z opisem, pierwiastki te mogą być współstrącane z wyżej wspomnianym tlenkiem żelaza podczas tworzenia rdzenia i zazwyczaj będą obecne w rdzeniu również pod postacią tlenków.

Jak ujawniono w publikacji US 2013/0256583, nanocząstki według wynalazku mogą być wytworzone poprzez współformowanie rdzenia cząsteczki i zabezpieczającej przed agregowaniem SPIONów zwiterjonowej warstwy zewnętrznej, bądź też mogą być uzyskane w procesie etapowym, poprzez wytworzenie rdzenia nanocząstki, SPIONu, a następnie powlekanie takich rdzeni warstwą zabezpieczającą.

Zgodnie z ujawnionym w opisie sposobem, 4 mmol  $\text{FeCl}_3$  w  $\text{H}_2\text{O}$  i 2 mmol  $\text{FeCl}_2$  rozpuszcza się w 2M HCl, miesza się przy użyciu mieszadła magnetycznego, a następnie dodaje się doń 50 ml 0,7 M  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Dodanie amoniaku skutkuje wytworzeniem strąconego, czarnego osadu nanocząstek. Bezpośrednio do kolby reakcyjnej dodaje się 5 mmol roztworu SBS i miesza się energicznie. W kolejnym etapie ponownie zawieszają się nanocząstki w roztworze, po czym całą mieszaninę ogrzewa się w  $80^\circ\text{C}$  przez 6 godzin. Po jej schłodzeniu do temperatury pokojowej, do wodnego środowiska reakcji dodaje się etanol ( $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$  3:1) a cząstki zbiera się do dalszego stosowania. W przypadku współstrącania z radionuklidem proces wytwarzania rdzenia prowadzi się w analogiczny sposób.

Jednakże, dla żadnej z ujawnionych w publikacji US 2013/0256583 nanocząstek nie wykazano, by stanowiący jej rdzeń SPION mógł stanowić nanocząsteczkę zdolną do powtarzalnego, bezpiecznego i skutecznego działania w terapii celowanej, nieulegającą niepożądaną agregacji bez konieczności powlekania zewnętrzną warstwą zabezpieczającą oraz aby wykazywał pożądane do leczenia właściwości

paramagnetyczne i/albo supermagnetyczne. Mimo, że w stanie techniki znane są liczne funkcjonalizowane lub też wolne od cząsteczek zawierających określone funkcjonalności nanocząstki, wskazywane jako użyteczne dla celów wewnątrzkomórkowego dostarczania cząsteczek biologicznie czynnych, to wciąż brak jest takiego układu, który byłby stabilny, w sposób nieograniczony przenikałby przez bariery komórkowe, byłby bezpieczny i pozwalał osiągnąć więcej niż jeden efekt terapeutyczny niezależnie od rodzaju guza. W szczególności pożądanym jest, by układ taki nie przejawiał tendencji do zwiększonej aglomeracji i wykazywał zdolność swobodnej i, jeśli to pożądanym, kontrolowanej migracji w organizmie. W szczególności jest pożądanym, aby układ taki zapewniał skoniugowany efekt terapeutyczny.

Twórcy niniejszego wynalazku nieoczekiwanie stwierdzili, że przy odpowiednim doborze radionuklidu oraz proporcji jonów żelazowych i jonów nuklidu, zasygnalizowane w publikacji US 2013/0256583 nanocząstki mogą być doskonałymi emiterami promieniowania  $\beta^-$ , które umożliwiają lokalną hipertermię oraz zapewniają bezpośrednie naświetlenie guza nowotworowego. Co więcej, wytworzone zgodnie z niniejszym wynalazkiem nanocząstki można łączyć z cząsteczkami biologicznie aktywnymi takimi jak, przykładowo, peptyd – substancja P czy A7R lub przeciwciała monoklonalne – trastuzumab, co pozwala na ich naprowadzenie do tkanki nowotworowej oraz zapewnienie dodatkowego efektu terapeutycznego związanego z obecnością dodatkowych funkcjonalności w modyfikujących powierzchniowo nanocząstki cząsteczkach.

Większość proponowanych do terapii emiterów  $\beta^-$  stanowią izotopy lantanowców ( $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{169}\text{Er}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{167}\text{Tm}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{149}\text{Pm}$ ,  $^{161,166}\text{Ho}$ ). Twórcy niniejszego wynalazku stwierdzili, że trójwartościowe kationy lantanowców można łatwo wbudować do nanocząstek SPION, poprzez częściowe zastąpienie tych trójwartościowych kationów trójwartościowymi jonami żelaza  $\text{Fe}^{3+}$ . Jednakże, zgodnie z obserwacją twórców niniejszego wynalazku, proste domieszkowanie nanocząstek mikro ilościami radionuklidu lantanowca, jak zasygnalizowane w publikacji US 2013/0256583, prowadzi jedynie do jego adsorpcji na powierzchni. W stanie techniki istnieje wiele doniesień dotyczących znakowania superparamagnetycznych tlenków żelaza radionuklidami diagnostycznymi, takimi jak  $^{64}\text{Cu}$  (M. Nahrendorf, H. Zhang, S. Hembardor, P. Panizzi, D. E. Sosnovik, E. Aikawa, P. Libby, F.K. Swirski, R. Weissleder, *Circulation* 2008, 117, 379),  $^{124}\text{I}$  (Jin-sil Choi, Jeong Chan Park, Hyunsoo Nah, Seungtae Woo, Jieun Oh, Kyeong Min Kim, Gi Jeong Cheon, Yongmin Chang, Jeongsoo Yoo, and Jinwoo Cheon, *A hybrid nanoparticle probe for dual-modality positron emission tomography and magnetic resonance imaging*),  $^{89}\text{Zr}$  (E. Boros, A. Bowen, L. Josephson, N. Vasdevbe, J.P. Holland, *Chelate-free metal ion binding and heat-induced radiolabeling of iron oxide nanoparticles*. *Chem. Sci.*, 2015, 6, 225). Jednakże, jak wynika z doniesień ze stanu techniki, znakowanie zazwyczaj następuje poprzez przyłączenie cząsteczki chelatora lub poprzez adsorpcję radionuklidu na powierzchni nanocząstki SPION. Zdaniem twórców niniejszego wynalazku, takie znakowanie nie jest wystarczające, gdyż nie zapewnia pożądanym właściwości magnetycznych nanocząstek.

Twórcy wynalazku stwierdzili, że aby związać trwale radionuklid lantanowca z nanocząstką SPION, konieczne jest zsyntezowanie nanocząstek domieszkowanych kationami lantanowca w ilości od 2,5–10% atomowych, w którym część atomów będzie radioaktywna. Zgodnie z obserwacjami twórców, dzięki takiemu stopniowi domieszkowania powstaje nowa struktura, w której radionuklid jest równomiernie rozłożony w fazie nanocząstki.

Ponieważ zastąpienie trójwartościowych jonów żelaza  $\text{Fe}^{3+}$  w nanocząstce kationami lantanowca może zniszczyć jej właściwości magnetyczne, konieczne jest, aby kation lantanowca posiadał także właściwości magnetyczne. Jednakże, z uwagi na stabilność struktury nanocząstki opartej na tlenkach żelaza należy oczekiwać, że zastępujące częściowo trójwartościowe jony żelaza  $\text{Fe}^{3+}$  kationy lantanowca powinny charakteryzować się parametrami zbliżonymi do jonów żelaza.

Twórcy niniejszego wynalazku nieoczekiwanie wykazali, że stabilne i nadające się do zastosowania jako skuteczny emiter  $\beta^-$  nanocząstki można wytworzyć z odmiennym pod względem wielkości trójwartościowym jonem lantanowca, jakim jest holm.

Holm,  $^{166}\text{Ho}$ , jest miękkim, srebrzystym metalem z grupy lantanowców o czasie połowicznego rozpadu  $t_{1/2}=26,8$  h. Trójwartościowe jony holmu  $\text{Ho}^{3+}$  mają 4 niesparowane spiny. Ten radionuklid można w prosty sposób otrzymać poprzez naświetlanie naturalnego holmu neutronami. Dodatkowo, w przypadku nanocząstek znakowanych  $^{166}\text{Ho}$  możliwe jest otrzymanie, poprzez wtórne naświetlenie neutronami, radionuklidu obecnego w zsyntezowanych nanocząstkach SPION domieszkowanych nieaktywnym Ho. Przekrój czynny reakcji  $^{165}\text{Ho}(n,\gamma)^{166}\text{Ho}$  jest tak duży (59,26 b), iż umożliwia wytworzenie  $^{166}\text{Ho}$  przy minimalnej aktywacji atomów żelaza.

Otrzymane zgodnie z wynalazkiem magnetyczne nanocząstki znakowane emiterami  $\beta$  można skoniugować z przeciwciałami monoklonalnymi, takimi jak trastuzumab (herceptyna) lub peptydami, takimi jak substancja P czy też peptyd antyangiogeny A7R.

Trastuzumab wykazuje duże powinowactwo do receptora HER2 raka sutka. Jego nadekspresja występuje ponadto w innych typach nowotworów takich jak: rak jajnika, pęcherza moczowego, gruczołu ślinowego, rak trzonu macicy, rak trzustki i niedrobnokomórkowy rak płuc.

Substancja P jest peptydem selektywnie akumulującym się na receptorach NK1 komórek glejaków. Przeprowadzone ostatnio badania kliniczne wykazały znaczny efekt terapeutyczny w leczeniu zaawansowanych glejaków za pomocą substancji P znakowanej emiterami  $\beta^-$  ( $^{177}\text{Lu}$  (D. Cordier, F. Forrer, S. Kneifel M. Sailer, L. Mariani, H. Mäcke J. Müller-Brand J, A. Merlo, Neoadjuvant targeting of glioblastoma multiforme with radiolabeled DOTAGA-substance P--results from a phase I study, J. Neurooncol. 100 (2010) 129–36) i  $\alpha$  ( $^{213}\text{Bi}$ , (A. Morgenstern, L. Krolicki, J. Kunikowska, H. Koziara, et al, Targeted alpha therapy of glioblastoma multiforme: First clinical experience with  $^{213}\text{Bi}$ -substance P, J. Nucl. Med. 55 Supplement 1 (2014) 390).

Z kolei peptyd A7R jest antyangiogennym heptapeptydem, określanym także jako peptyd ATWLPPR (A7R), wiążącym się specyficznie do NRP-1 i selektywnie hamującym wiązanie VEGF 165 z tym receptorem (R. Binétruy-Tournaire, C. Demangel, B. Malavaud, R. Vassy, S. Rouyre, M. Kraemer, J. Plouët, C. Derbin, G. Perret, JC Mazie, Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis., EMBO J, 2000, 19, 1525). Badania *in vitro* i *in vivo* prowadzone z wykorzystaniem myszy nagich wykazały, że A7R skutecznie hamuje wzrost nowotworu i angiogenezę w ksenoprzeszczepie komórek raka sutka (A. Starzec, R. Vassy, A. Martin, M. Lecouvey, M. Di Benedetto, M. Crépin, G. Perret, Antiangiogenic and antitumor activities of peptide inhibiting the vascular endothelial growth factor binding to neuropilin-1, Life Sci, 2006, 79, 2370–2381).

Radioterapeutyczne nanocząstki według wynalazku stanowią superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza domieszkowane radionuklidem  $^{166}\text{Ho}$ , emiterem promieniowania  $\beta^-$ . W praktyce mogą być one wykorzystywane wraz z kowalencyjnie przyłączonymi cząsteczkami aktywnymi biologicznie, takimi jak peptydy, przeciwciała monoklonalne lub ich fragmenty umożliwiające ich naprowadzenie do tkanki nowotworowej i zapewniające lokalną hipertermię oraz bezpośrednie naświetlenie objętej zmianą tkanki.

Sposób wytwarzania radioterapeutycznych nanocząstek według wynalazku polega na syntezie współstrąceniowej soli radionuklidu holmu – 166 oraz soli żelaza(II) i żelaza(III) w odpowiednio dobranej proporcji atomowej holmu do całkowitego żelaza, a następnie, opcjonalnie, przyłączenie do niej biologicznie aktywnych cząsteczek, wybranych z grupy obejmującej peptydy, przeciwciała, węglowodany lub polisacharydy, kwasy nukleinowe, lipidy, związki małowcząsteczkowe, cytostatyki a zwłaszcza biologicznie czynne peptydy, przeciwciała monoklonalne lub ich fragmenty bądź cytostatyki. Techniki wiązania biologicznie aktywnych cząsteczek są powszechnie znane w dziedzinie i zostały szczegółowo opisane w licznych publikacjach (takich jak na przykład A. Niescioruk, D. Nieciecka, A.K. Puszek, A. Królikowska, P. Kosson, G.Y. Perret, P. Krysiński, A. Misicka Physicochemical properties and *in vitro* cytotoxicity of iron oxide-based nanoparticles modified with antiangiogenic and antitumor peptide A7R, J Nanopart Res., 2017, 19, 160 oraz A.M. Nowicka, A. Kowalczyk, A. Jarzębińska, M. Donten, P. Krysiński, Z. Stojek, E. Augustin, Z. Mazerska, Progress in Targeting Tumor Cells by Using Drug-Magnetic Nanoparticles Conjugate, Biomacromolecules, 2013, 14, 828–833).

Radioterapeutyczne superparamagnetyczne nanocząstki według wynalazku oddziela się od mieszaniny reakcyjnej poprzez dekantację w polu magnesu trwałego, przemywa wodą destylowaną i dysperguje powtórnie z wykorzystaniem ultradźwięków.

#### ISTOTA WYNALAZKU

Niniejszy wynalazek dostarcza superparamagnetycznej nanocząstki na bazie tlenków żelaza, w której część trójwartościowych jonów  $\text{Fe}^{3+}$  w strukturze krystalograficznej nanocząstki jest zastąpiona radionuklidem z grupy lantanowców, i w której radionuklidem jest holm-166 ( $^{166}\text{Ho}$ ) i trójwartościowe jony holmu-166 zastępują od 1% do 3% atomowych jonów żelaza obecnych w strukturze nanocząstki. Korzystnie, trójwartościowe jony holmu-166 zastępują 1%, 2,5% albo 3% atomowych jonów żelaza obecnych w strukturze nanocząstki, szczególnie korzystnie trójwartościowe jony holmu-166 zastępują 1% albo 2,5% atomowych jonów żelaza obecnych w strukturze nanocząstki.

## POTENCJALNE ZASTOSOWANIA WYNAŁAZKU

Do powierzchni takich nanocząstek mogą być, przykładowo, przyłączane biologicznie aktywne cząsteczki wybrane z grupy obejmującej peptydy, przeciwciała, węglowodany lub polisacharydy, kwasy nukleinowe, lipidy, związki małych cząsteczek, cytostatyki. Korzystnie, peptydem jest substancja P lub A7R. Równie korzystnie cytostatykiem jest doksorubicyna. Korzystnie, przeciwciałem jest trastuzumab.

Co więcej, superparamagnetyczna nanocząstka według wynalazku może być pokrywana, analogicznie jak w przypadku klasycznych SPION-ów powłoką, taką jak powłoka polimerowa i/albo dwuwarstwowa powłoka lipidowa lub inna powłoka zwiterjonowa. Powłoka taka może, przykładowo, zawierać jedną lub większą liczbę grup funkcyjnych, takich jak jedna lub większa liczba grup aminowych i/albo jedna lub większa liczba grup karboksylowych, do przyłączania jednego lub większej liczby środków sieciujących, jednej lub większej liczby cząsteczek penetrujących błonę komórkową i/albo jednej lub większej liczby biologicznie aktywnych cząsteczek zdolnych do modulowania pożądanej funkcji komórkowej.

Superparamagnetyczna nanocząstka według wynalazku może być potencjalnie wykorzystywana do rozdzielania i oczyszczania komórek, mikroorganizmów, takich jak wirusy i biologicznych makrocząsteczek.

Co więcej, superparamagnetyczna nanocząstka według wynalazku może znaleźć zastosowanie jako lek, w szczególności jako lek do terapii celowanej, korzystniejszej terapii celowanej będącej terapią ukierunkowaną na specyficzne geny, białka, w tym białka receptorowe, lub na środowisko tkankowe przyczyniające się do wzrostu i przeżycia nowotworu. Taka terapia celowana może być wybrana spośród terapii radionuklidami, magnetycznej hipertermii lub ich kombinacji. Korzystnie, terapię radionuklidami stanowi endorodioterapia.

## DEFINICJE OKREŚLEŃ STOSOWANYCH W OPISIE

W stosowanym niniejszym znaczeniu, określenie „magnetyczny” odnosi się do materiałów o wysokiej dodatniej podatności magnetycznej.

W stosowanym niniejszym znaczeniu, określenie „nanocząstka paramagnetyczna” odnosi się ogólnie do nanocząstki, która zawiera tlenek żelaza lub tlenki żelaza lub trójwartościowe jonu żelaza.

Stosowane niniejszym określenie „superparamagnetyczny rdzeń nanocząstki” odnosi się do „paramagnetycznego rdzenia nanocząstki”, który staje się namagnesowany przez poddanie go działaniu zewnętrznego pola magnetycznego. W niniejszym opisie ujawniono nanocząstki, które wykazują właściwości paramagnetyczne lub superparamagnetyczne.

Rdzenie nanocząstek według niniejszego wynalazku można z powodzeniem pokrywać zabezpieczającą powłoką (skorupą), taką jak powłoka polimerowa i/albo dwuwarstwowa powłoka lipidowa lub inna powłoka zwiterjonowa, i mogą one zawierać jedną lub większą liczbę grup funkcyjnych, takich jak jedna lub większa liczba grup aminowych i/albo jedna lub większa liczba grup karboksylowych do przyłączania jednego lub większej liczby środków sieciujących, w szczególności jednego (lub kilku) dwufunkcyjnego środka (-ów) sieciującego (-ych), jednej lub większej liczby cząsteczek penetrujących błonę komórkową i/albo jedną lub większą liczbę biologicznie aktywnych cząsteczek do wprowadzania nowej funkcjonalności do komórki docelowej i/albo do wpływania na jedną lub większą liczbę funkcji komórkowych komórki docelowej.

## PRZYKŁADY WYKONANIA WYNAŁAZKU

Poniżej opisano przykłady praktycznej realizacji wynalazku, które zostały uwidocznione na rysunku, na którym:

na Fig. 1 przedstawiono zależność magnetyzacji nasycenia dla próbki nanocząstek według wynalazku domieszkowanej holmem w ilości 1% w zależności od przyłożonego pola magnetycznego H (w Erstedach) dla dwóch temperatur pomiaru 100 K i 300 K;

na Fig. 2 przedstawiono zależność magnetyzacji nasycenia dla próbki nanocząstek według wynalazku domieszkowanej holmem w ilości 2,5% w zależności od przyłożonego pola magnetycznego H (w Erstedach) dla dwóch temperatur pomiaru 100 K i 300 K;

na Fig. 3 przedstawiono zależność magnetyzacji nasycenia dla próbki nanocząstek według wynalazku domieszkowanej holmem w ilości 5% w zależności od przyłożonego pola magnetycznego H (w Erstedach) dla dwóch temperatur pomiaru 100 K i 300 K;

na Fig. 4 przedstawiono zależność magnetyzacji nanocząstki od stopnia jej domieszkowania holmem zarejestrowaną w temperaturze 100 K;

na Fig. 5 przedstawiono zależność magnetyzacji nanocząstki od stopnia jej domieszkowania holmem zarejestrowaną w temperaturze 300 K;

na Fig. 6 przedstawiono widmo dyfrakcji proszkowej promieni rentgenowskich zarejestrowane dla nanocząstek według wynalazku domieszkowanych holmem w ilości 1% atomowego;

na Fig. 7 przedstawiono widmo dyfrakcji proszkowej promieni rentgenowskich zarejestrowane dla nanocząstek według wynalazku domieszkowanych holmem w ilości 2,5% atomowych;

na Fig. 8 przedstawiono widmo dyfrakcji proszkowej promieni rentgenowskich zarejestrowane dla nanocząstek według wynalazku domieszkowanych holmem w ilości 7,5% atomowych;

na Fig. 9 przedstawiono obrazy TEM zarejestrowane dla nanocząstek według wynalazku o różnych poziomach domieszkowania holmem wynoszących odpowiednio dla a) – 0%, b) – 1%, c) – 2,5%, d) – 5%, e) – 7,5% oraz f) – 10% atomowych.

Przykłady poniższe zamieszczono jedynie w celach ilustracyjnych dla zobrazowania poszczególnych etapów wytwarzania nanocząstek SPION domieszkowanych holmem zawierającym radioaktywny holm-166 według wynalazku oraz jego specyficzne właściwości.

#### **Przykład 1:**

*Wytwarzanie nanocząstek magnetycznych opartych na tlenkach żelaza domieszkowanych holmem w ilości 10%.*

Do zlewki o pojemności 150 ml wprowadzono 87,5 ml wody dejonizowanej Milli-Q o oporności 18,2 M $\Omega$ . Następnie dodano 0,745 g FeCl<sub>2</sub>\*4 H<sub>2</sub>O (tetrahydratu chlorku żelaza (II), Sigma-Aldrich, czysty, stopień czystości  $\geq 99\%$  (RT)), 1,115 g FeCl<sub>3</sub>\*6 H<sub>2</sub>O (heksahydratu chlorku żelaza (III), Sigma-Aldrich stopień czystości ACS 97%) oraz 0,332 g HoCl<sub>3</sub>\*6 H<sub>2</sub>O (heksahydratu chlorku holmu (III), Aldrich 99,9% śladowa obecność metali) i mieszaninę naświetlano w reaktorze badawczym Maria w Świerku w strumieniu neutronów 10<sup>14</sup> n/cm<sup>2</sup>/s. Kolejno, w zlewce umieszczono szklane mieszadło mechaniczne i rozpoczęto mieszanie z prędkością 500 obr/min. Po rozpuszczeniu soli w roztworze umieszczono pH-metr i rozpoczęto wkraplanie NH<sub>4</sub>OH (25% amoniak, CHEMPUR) do uzyskania pH 10. Amoniak wkraplano pipetą pasteurą po jednej kropli. Po ustabilizowaniu się pH mieszanie kontynuowano przez 30 minut z prędkością 500 obr/min. Syntezę prowadzono w temperaturze pokojowej bez atmosfery ochronnej. Po 30 minutach mieszadło i pH-metr wyjęto a zlewkę z zawiesiną nanocząstek pozostawiono na 10 minut na magnesie dla ściągnięcia nanocząstek na dno naczynia. Roztwór z nad nanocząstek zebrano pipetą automatyczną po czym nanocząstki przemyto wodą. Następnie, nanocząstki przemyto trójkrotnie acetonem i sześciokrotnie wodą. Przemyte nanocząstki z tlenkiem żelaza z wbudowanym holmem zebrano w pojemniku szklanym o pojemności 5 ml.

#### **Przykład 2:**

*Wytwarzanie nanocząstek magnetycznych opartych na tlenku żelaza domieszkowanych holmem w ilości 2,5%.*

Do zlewki o pojemności 150 ml wprowadzono 87,5 ml wody dejonizowanej Milli-Q o oporności 18,2 M $\Omega$ . Następnie dodano 0,745 g FeCl<sub>2</sub>\*4 H<sub>2</sub>O (tetrahydratu chlorku żelaza (II), Sigma-Aldrich, czysty, stopień czystości  $\geq 99\%$  (RT)), 1,295 g FeCl<sub>3</sub>\*6 H<sub>2</sub>O (heksahydratu chlorku żelaza (III), Sigma-Aldrich stopień czystości ACS 97%) oraz 0,083 g HoCl<sub>3</sub>\*6 H<sub>2</sub>O (heksahydratu chlorku holmu (III), Aldrich 99,9% śladowa obecność metali) i mieszaninę naświetlano w reaktorze badawczym Maria w Świerku w strumieniu neutronów 10<sup>14</sup> n/cm<sup>2</sup>/s. Kolejno, w zlewce umieszczono szklane mieszadło mechaniczne i rozpoczęto mieszanie z prędkością 500 obr/min. Po rozpuszczeniu soli w roztworze umieszczono pH-metr i rozpoczęto wkraplanie NH<sub>4</sub>OH (25% amoniak, CHEMPUR) do uzyskania pH 10. Amoniak wkraplano pipetą pasteurą po jednej kropli. Po ustabilizowaniu się pH kontynuowano mieszanie przez 30 minut z prędkością 500 obr/min. Syntezę prowadzono w temperaturze pokojowej bez atmosfery ochronnej. Po 30 minutach mieszadło i pH-metr wyjęto i pozostawiono zlewkę z zawiesiną nanocząstek na 10 minut na magnesie, co pozwala na ściągnięcie ich na dno naczynia. Roztwór z nad nanocząstek zebrano pipetą automatyczną po czym nanocząstki przemyto wodą. Następnie, nanocząstki przemyto trójkrotnie acetonem i sześciokrotnie wodą. Przemyte nanocząstki z tlenkiem żelaza z wbudowanym holmem zebrano w pojemniku szklanym o pojemności 5 ml.

#### **Przykład 3**

Nanocząstki domieszkowane holmem w ilościach 1%, 5% i 7,5% otrzymano analogicznie jak opisano powyżej zmieniając jedynie ilość dodawanego do zlewki FeCl<sub>3</sub>\*4 H<sub>2</sub>O (heksahydratu chlorku żelaza (III), Sigma-Aldrich stopień czystości ACS 97%) oraz HoCl<sub>3</sub>\*6 H<sub>2</sub>O (heksahydratu chlorku holmu (III), Aldrich 99,9% śladowa obecność metali).

Wszystkie otrzymane, przemyle nanocząstki z tlenkiem żelaza z wbudowanym holmem zebrano do oddzielnych pojemników szklanych o pojemności 5 ml i wykorzystywano w dalszych badaniach bez kolejnych modyfikacji.

#### **Przykład 4**

##### *Określanie właściwości magnetycznych nanocząstek*

Badania właściwości magnetycznych prowadzono przy użyciu magnetometru wibracyjnego QD stosując pole magnetyczne w zakresie od -2,0 T do 2,0 T, w temperaturze do 300 K z dokładnością pomiaru 0.01 K. Badano próbki wszystkich wytworzonych nanocząstek ferrytowych domieszkowanych holmem w ilości: 1%, 2.5%, 5%, 7.5% i 10% ilości molowych.

Z przeprowadzonych badań wynika, że największą wartość magnetyzacji nasycenia  $M_s$  w jednostkach  $10^{-4} \text{ T} \cdot \text{cm}^3$  (emu/g) uzyskano dla nanocząstek ferrytowych domieszkowanych 1% holmu. Nie wiele niższe i wciąż wysoce zadowalające wartości  $M_s$  uzyskano dla próbki domieszkowanej 2,5% holmu. W przypadku domieszkowania na poziomie 5% zaobserwowano drastyczny spadek właściwości magnetycznych. Nie wiążąc się z żadną teorią może to być spowodowane zaburzeniem struktury krystalicznej przez holm wbudowujący się w pozycje  $\text{Fe}^{3+}$ . Wyniki uzyskane w 100 K zebrano i zestawiono po przeliczeniu na masę badanej próbki. Wykres zbiorczy przedstawiono na Fig. 1. Obserwowany spadek magnetyzacji nasycenia dla 5% domieszkowania wynika ze znacznej zmiany struktury krystalograficznej co potwierdzono w badaniach XRD. Zbyt duże wartości domieszkowania powodujące, iż większa liczba trójwartościowych jonów żelaza jest zastępowana znacznie większymi jonami holmu na tym samym stopniu wartościowości prowadzi do destabilizacji krystalograficznej struktury nanocząstek, a tym samym pogarsza ich właściwości magnetyczne.

#### **Przykład 4**

##### *Porównanie właściwości magnetycznych nanocząstek w zależności od temperatury i stopnia domieszkowania*

Jak uwidoczniono na Fig. 1 do Fig. 3 w przypadku próbek domieszkowanych holmem obserwuje się kształt krzywych charakterystyczny dla superparamagnetyków. Jednakże, z porównania zależności wyznaczonych dla próbek o różnych stopniach domieszkowania wynoszących odpowiednio 1%, 2,5% i 5% zwiększenie zawartości holmu powoduje zwiększenie pola koercji. Na powyższych wykresach widoczna jest zmiana właściwości magnetycznych w obszarze 100 K przy  $15915.4944 \text{ kA/m}^2$  (20.000 Erstedów) krzywa nie osiąga plateau i rejestruje się pole koercji, które świadczy o występowaniu pamięci magnetycznej w nanocząstkach a tym samym utracie przez nanocząstki właściwości super magnetycznych.

Na Fig. 4 i 5 przedstawiono zależność magnetyzacji nanocząstki od stopnia jej domieszkowania holmem zarejestrowanych w temperaturach 100 K i 300 K. Zaprezentowane wyniki magnetyzacji potwierdzają, że przy stopniu domieszkowania holmem powyżej 3% atomowych obserwuje się istotną utratę właściwości magnetycznych nanocząstek, która to właściwość determinuje ich praktyczną stosowalność. Podczas, gdy domieszkowane holmem nanocząstki, w których zawartość jonów holmu wynosi 1–3%, wykazują znaczną podatność na ich ukierunkowywanie pod wpływem zewnętrznego pola magnetycznego oraz zdolność magnetycznej hipertermii nanocząstki o wyższym stopniu domieszkowania charakteryzują się pamięcią magnetyczną, a tym samym nie wykazują zdolności superparamagnetycznych.

#### **Przykład 5**

##### *Oznaczanie krystaliczności nanocząstek*

Dla określenia struktury krystalograficznej nanocząstek otrzymanych jak wskazano w Przykładach 1–3 przeprowadzono badania na dyfraktometrze proszkowym PXRD Bruker D8 Discover z geometrią Debye-Scherrer'a, w którym źródłem promieniowania była anoda miedziana  $\text{Cu K}\alpha$  o linii  $\lambda=1,540598 \text{ \AA}$ . Skanowanie prowadzono z prędkością  $1^\circ/\text{min}$  co  $0.012^\circ$  w zakresie kąta  $2\theta$  od  $20$  do  $130^\circ$ . Badania prowadzono w temperaturze pokojowej.

Przebadano próbki nanocząstek domieszkowanych holmem o stopniu domieszkowania 1%, 2,5%, 5%, 7,5% oraz 10% molowych.

Próbki zawierające 1% (Fig. 6) i 2.5% (Fig. 7) holmu charakteryzują się homogeniczną strukturą krystalograficzną charakterystyczną dla  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Zwiększenie stopnia domieszkowania, a więc zawartości holmu (Fig. 8) zaburza homogeniczność struktury i tworzy się układ wielofazowy z wyraźnym wkładem pochodzącym od  $\text{FeOOH}$  (fazy alfa, goethytu) do magnetytu  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Tym samym stabilność krystalograficzną wykazują jedynie nanocząstki domieszkowane nie więcej niż 3% holmu.

Jak wynika z zarejestrowanych dyfraktogramów na których są widoczne refleksy o szerokiej podstawie sugerujące tworzenie się krystalitów w małym rozmiarze (potwierdzone TEM) przy domieszkowaniu do 3% holmu sieć krystalograficzna nie ulega zaburzeniu. Wysoka fluorescencja rentgenowska, charakterystyczna dla badań przy danej linii  $\lambda$  dla atomów żelaza obecnych w strukturze kryształu potwierdza, że wielkość parametrów komórki elementarnej zmienia się nieznacznie przy wbudowaniu małych ilości holmu takich jak 1 czy 2.5%.

### Przykład 6

#### *Określanie wpływu stopnia domieszkowania na wielkość i kształt nanocząstek*

Dla określenia, w jaki sposób zmiana zawartości holmu w nanocząstce wpływa na kształt i wielkość zsyntetyzowanych SPIONów zarejestrowano obrazy uzyskanych zgodnie ze sposobem opisanym w Przykładach 1–3 z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Wszystkie nanocząstki oparte na ferrytach po współstrącaniu poddawano przed zarejestrowaniem obrazu TEM suszeniu a następnie sonikowano w płucze ultradźwiękowej z wytworzeniem zawiesiny nanocząstek w etanolu. Następnie, przed zarejestrowaniem obrazu TEM próbki umieszczano na siatkach i etanol odparowywano. Uzyskane obrazy przedstawiono na Fig. 9 a) – f) dla różnych poziomów domieszkowania SPIONu trójwartościowymi jonami  $\text{Ho}^{3+}$  wynoszących odpowiednio dla a) – 0%, b) – 1%, c) – 2,5%, d) – 5%, e) – 7,5% oraz f) – 10%. Jak widać na Fig. 9, obrazy TEM ujawniają istotne różnice w morfologii nanocząstek powstających przy różnym stopniu domieszkowania. Podczas gdy nanocząstki domieszkowane holmem na poziomie 1% i 2,5% atomowych (Fig. 9b) i Fig. 9c) odpowiednio) mają zasadniczo regularny, sferyczny kształt o średnicy w zakresie od 10 do 15 nm, to w przypadku próbek o wyższym stopniu domieszkowania obserwuje się powstawanie nieregularnych kryształów o większym średniej wielkości cząstek w najdłuższym wymiarze wynoszącej od 30 do 40 nm. Nie wiążąc się z żadną teorią twórcy niniejszego wynalazku stwierdzili, że zasadniczo sferyczne cząstki powstają wówczas, gdy domieszkujące jony holmu nie wpływają lub wpływają w nieznacznym stopniu na strukturę krystaliczną sieci ferrytowej, natomiast przy przekroczeniu stopnia domieszkowania 3% atomowych sprzyja wzrostowi nanocząstek w jednym kierunku. Co więcej, w przypadku niskich stopni domieszkowania, w zakresie 1–3% atomowych, uzyskiwane cząstki są monodispersyjne i mają tę samą morfologię. Obserwowane przy wyższych stopniach domieszkowania zaburzenie zasadniczo sferycznego kształtu nanocząstek może wiązać się z nagromadzeniem się trójwartościowych jonów holmu w oktaedrycznej miejsca sieci, a tym samym jej polikrystalicznością i pojawianiem się  $\alpha\text{-FeOOH}$ . Mimo, że z uwagi na przygotowywanie próbek do ich obrazowania nie można ocenić stopnia aglomeracji próbek, wyraźnie widać, że nanocząstki uzyskiwane przy niskim stopniu domieszkowania holmem na poziomie 1 do 3% nie tworzą jakichkolwiek większych, związanych struktur lub skupisk, w których trudne byłoby do wyodrębnienia kształty pojedynczych nanocząstek.

### Zastrzeżenia patentowe

1. Superparamagnetyczna nanocząstka na bazie tlenków żelaza, w której część trójwartościowych jonów  $\text{Fe}^{3+}$  w strukturze krystalograficznej nanocząstki jest zastąpiona radionuklidem z grupy lantanowców, **znamienna tym**, że radionuklidem jest holm-166 ( $^{166}\text{Ho}$ ) i trójwartościowe jony holmu-166 są trwale związane równomiernie rozłożone w fazie w superparamagnetycznej nanocząstce zastępując od 1% do 3% atomowych jonów żelaza obecnych w strukturze nanocząstki.
2. Superparamagnetyczna nanocząstka według zastrz. 1, **znamienna tym**, że trójwartościowe jony holmu-166 zastępują 1%, 2,5% albo 3% atomowych jonów żelaza obecnych w strukturze nanocząstki.
3. Superparamagnetyczna nanocząstka według dowolnego spośród zastrz. 1 albo 2, **znamienna tym**, że trójwartościowe jony holmu-166 zastępują 1% atomowy jonów żelaza obecnych w strukturze nanocząstki.
4. Superparamagnetyczna nanocząstka według dowolnego spośród zastrz. 1 albo 2, **znamienna tym**, że trójwartościowe jony holmu-166 zastępują 2,5% atomowych jonów żelaza obecnych w strukturze nanocząstki.

Rysunki

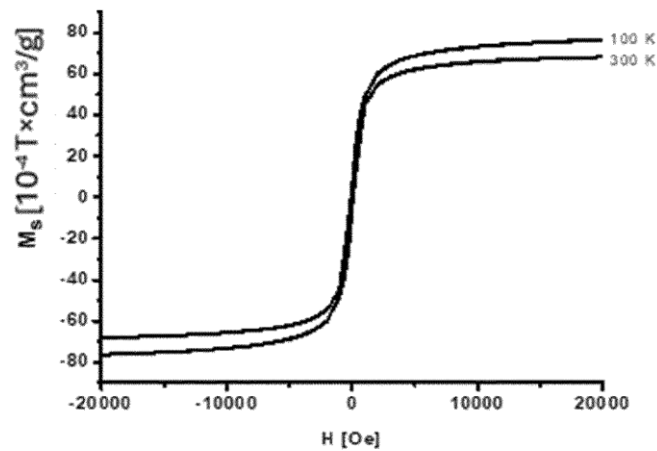


Fig. 1

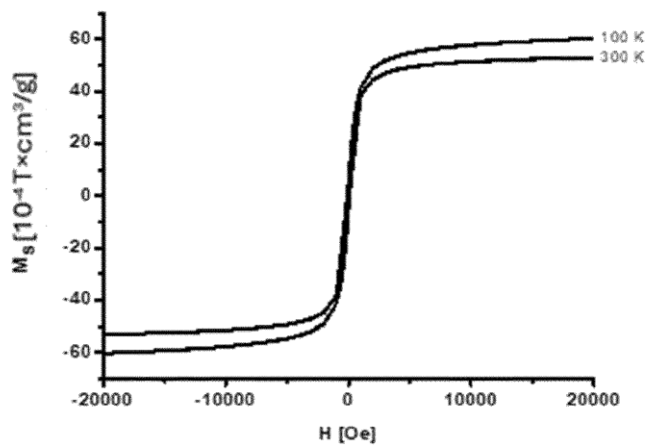


Fig. 2

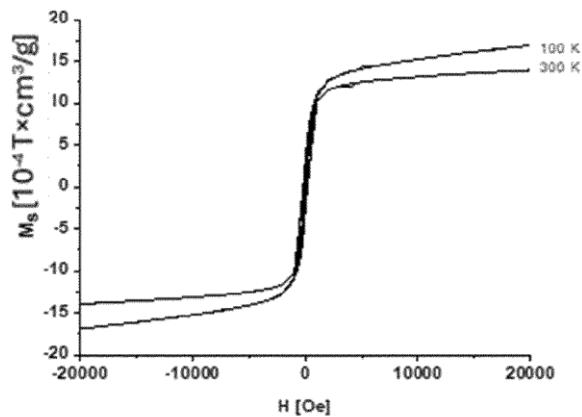


Fig. 3

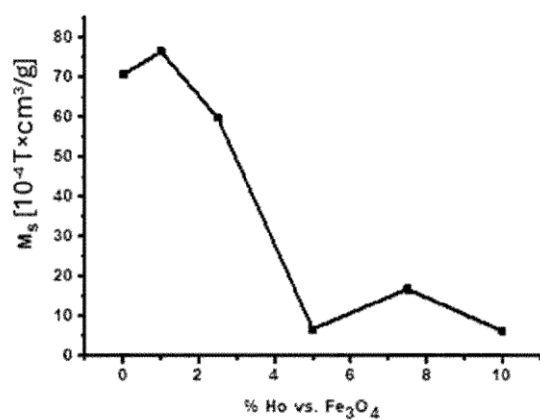


Fig. 4

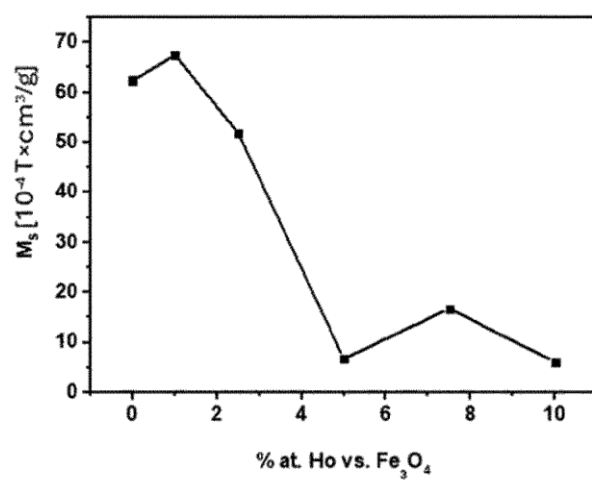


Fig. 5

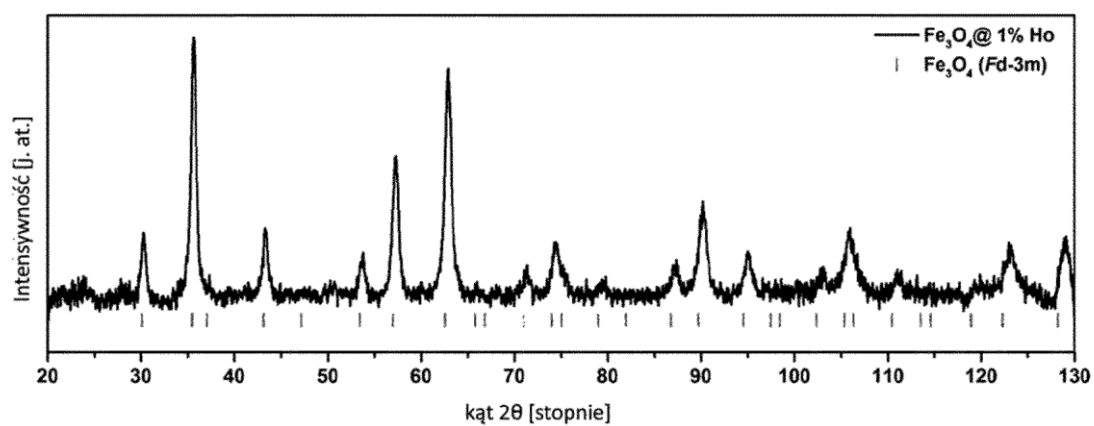


Fig. 6

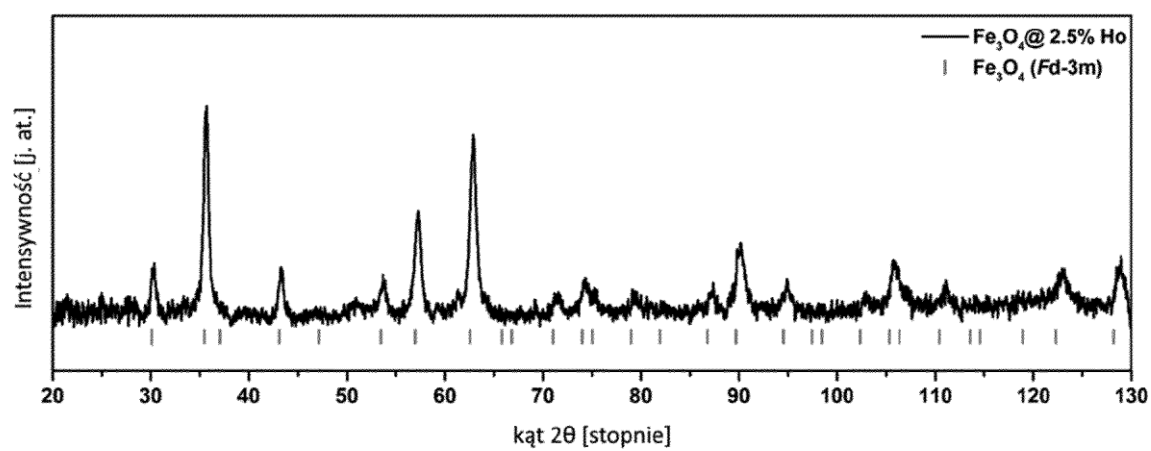


Fig. 7

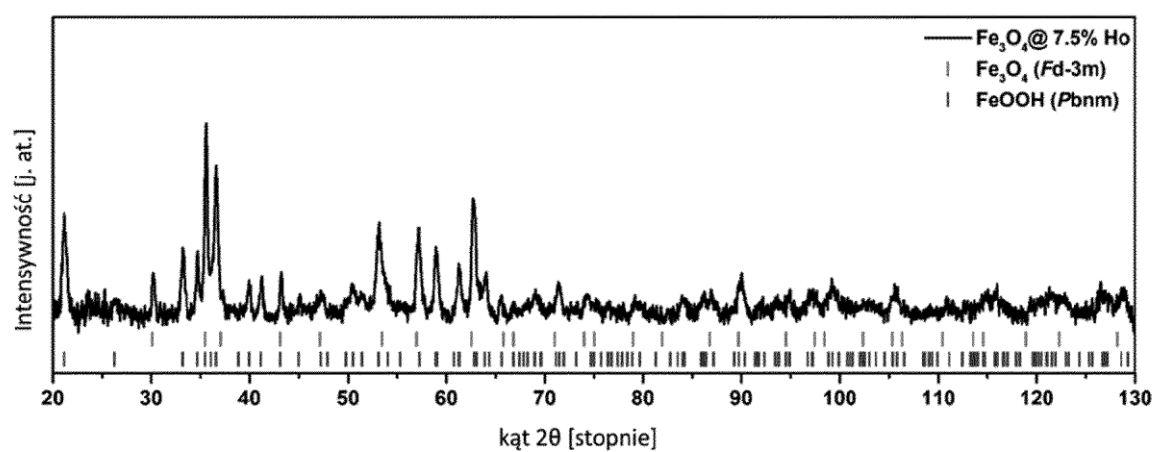


Fig. 8

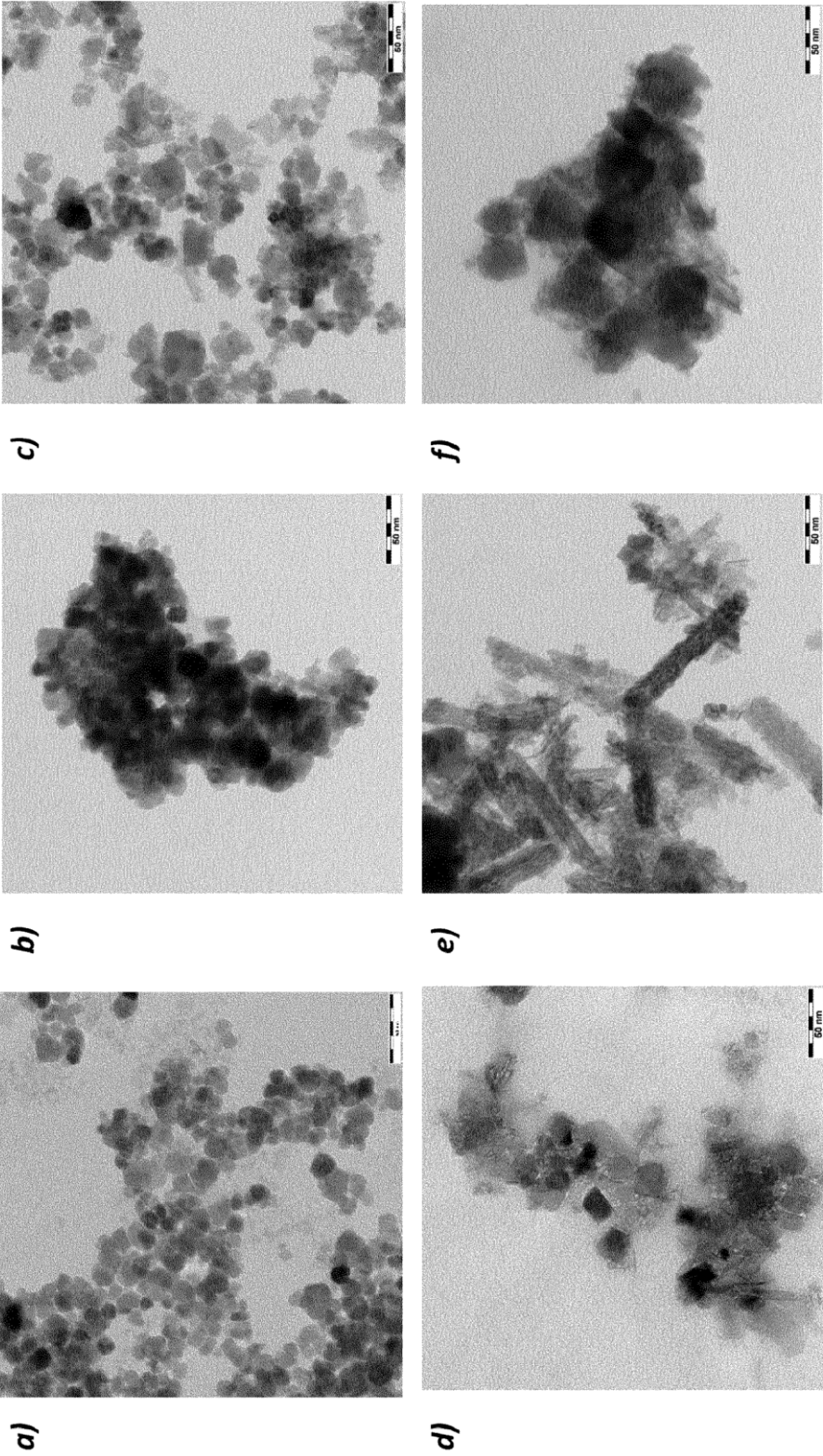


Fig. 9