



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 370 443**

② Número de solicitud: 200931148

⑤ Int. Cl.:

**A61K 49/14** (2006.01)

**A61K 51/08** (2006.01)

**B82Y 5/00** (2001.01)

**A61K 103/10** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **11.12.2009**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **15.12.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**15.12.2011**

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Granada  
Cuesta del Hospicio, s/n  
18071 Granada, ES**

⑦ Inventor/es: **Domínguez Vera, José Manuel;  
Gálvez Rodríguez, Natividad;  
Valero Romero, Elsa y  
Sánchez Sánchez, Purificación**

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Nanoestructuras vectorizadas multifuncionales capaces de ser utilizadas como agentes de diagnóstico trimodal (MRI, OI Y SPECT).**

⑤ Resumen:

Nanoestructuras vectorizadas multifuncionales capaces de ser utilizadas como agentes de diagnóstico trimodal (MRI, OI y SPECT).

La presente invención se refiere a una nanoestructura multifuncional, concretamente a una ferritina, vectorizada con ácido fólico, y a su aplicación como agente de contraste en Imagen por Resonancia Magnética (MRI), Imagen óptica de fluorescencia (OI) y/o gammagrafía (SPECT).

## DESCRIPCIÓN

Nanoestructuras vectorizadas multifuncionales capaces de ser utilizadas como agentes de diagnóstico trimodal (MRI, OI y SPECT).

La presente invención se refiere a una nanoestructura multifuncional, concretamente a una ferritina, vectorizada con ácido fólico, y a su aplicación como agente de contraste en OI, MRI y/o SPECT. Por tanto, la invención se podría encuadrar dentro del campo de la biomedicina.

## Estado de la técnica

La integración de la nanotecnología en la biotecnología ha hecho florecer una nueva disciplina: la nanomedicina. En este campo, se diseñan y preparan nanopartículas metálicas para obtener bioimágenes mediante el uso simultáneo de varias técnicas, distribución efectiva de fármacos o técnicas de terapias tan prometedoras como la hipertermia originada localmente por nanopartículas magnéticas. Es un área de tremendo potencial sujeta al desarrollo de nuevas nanoestructuras para su avance.

Las nanopartículas magnéticas han atraído atención principalmente por su uso potencial como agentes de contraste en Imagen por Resonancia Magnética (MRI). Esta técnica se basa en la resonancia magnética de los protones de tejidos del cuerpo (agua, membranas, lípidos, proteínas, etc.) y es actualmente el método más potente de diagnóstico.

El contraste en MRI puede mejorarse con sustancias paramagnéticas. La capacidad de un compuesto para incrementar la velocidad de relajación de los espines de protón de las moléculas de agua del entorno se llama relajación y se define como  $R1 \sim 1/T1$  o  $R2 \sim 1/T2$ . Las nanopartículas superparamagnéticas son candidatos para actuar como agentes de contraste en MRI. Al igual que las sustancias paramagnéticas, pierden su magnetización cuando se elimina el campo magnético externo, pero a diferencia de éstas, su magnetización es sensiblemente mayor. Por lo tanto, la relajación que producen es mucho más alta que las de los clásicos complejos paramagnéticos de Gd(III). El efecto de las nanopartículas superparamagnéticas se puede describir en base a la heterogeneidad del intenso campo magnético que afecta a los protones de alrededor, induciendo un desfase del momento magnético y dando lugar a un acortamiento del tiempo de relajación T2. De este modo, las nanopartículas superparamagnéticas son unos buenos candidatos para el desarrollo de nuevos y elegantes agentes de contraste, permitiendo una detección temprana de patologías severas y de gran impacto social.

Por otro lado, los denominados quantum dots (QD), han sido usados con éxito como nuevos marcadores fluorescentes en el campo biomédico y son considerados como una herramienta prometedora en Imagen óptica de fluorescencia (OI) para diagnóstico clínico. Los QD son nanopartículas inorgánicas, generalmente compuestas de elementos de los grupos II-VI y III-V, los cuales, debido a su confinamiento cuántico de cargas en un diminuto espacio muestran unas propiedades fluorescentes únicas: espectros de emisión estrechos, rendimiento cuántico alto, espectros de absorción anchos, buena estabilidad química y alta fotoestabilidad y longitud de onda de emisión dependiente del tamaño, ampliando su rango de emisión hasta la región NIR (infrarrojo cercano) o IR (infrarrojo) y ofreciendo una mayor penetración en tejido para una mejor imagen. Sin embargo, a pesar de las excepcionales propiedades fluorescentes que presentan, estas nanopartículas necesitan ser funcionalizadas con algún tipo de polímero o proteína que las haga biocompatibles y por tanto aptas para su utilización *in vivo*.

Un enfoque dentro de la nanomedicina es el uso de nanopartículas que puedan combinar diferentes técnicas de bioimagen. Cada modalidad de bioimagen tiene sus propios méritos pero también ciertas desventajas y por lo tanto los métodos de imagen multimodales presentan mayor capacidad para obtener una imagen integral y más detallada. La combinación MRI-OI es un buen ejemplo de un método bimodal y una ruta para su consecución es el uso de nanoestructuras que contengan dos componentes metálicos, uno magnético y otro fluorescente: nanopartículas bifuncionales magneto-fluorescente. El nanocomponente magnético puede incorporar un radiomarcador, como  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , añadiendo a la nanoestructura multifuncional una nueva modalidad de imagen médica mediante la detección de la radiación gamma que dicho radionúclido genera mediante gammagrafía (SPECT).

Un punto clave para la aplicación biomédica de las nanopartículas metálicas es que no pueden ser tóxicas y deben permanecer en circulación el tiempo suficiente para alcanzar el blanco biológico. El sistema fagocítico mononuclear (MPS) reconoce y elimina, a través de los macrófagos, las partículas de la circulación, con su simultánea concentración en órganos con alta actividad fagocítica (principalmente el hígado). Por lo tanto, una estrategia sensata es el uso de nanopartículas que sean capaces de evadir el ataque por parte del MPS y no sean fagocitadas por los macrófagos, aumentando consecuentemente el tiempo de vida media en plasma y permitiendo alcanzar un órgano o tejido específico.

Este tipo de agentes de diagnóstico ideales para su aplicación clínica deberían poseer una alta y específica acumulación en las células adecuadas, lo que tendría como consecuencia la posibilidad de diagnosticar de forma cada vez más precoz una enfermedad aún tratable. Diferentes moléculas pueden anclarse a la nanoestructura funcional para dirigirla de forma específica a un órgano o tejido en cuestión. Estas moléculas pueden ser antígenos (de anticuerpos adecuados), carbohidratos, hormonas, etc.

Numerosos métodos físicos y químicos han sido utilizados para preparar nanopartículas magnéticas. Puesto que las propiedades magnéticas son muy dependientes del tamaño, es crucial que el método a desarrollar permita la obtención de nanopartículas con tamaños uniformes. Una posible ruta para obtener nanopartículas metálicas sin agregación y con tamaño controlado es el uso de una plataforma molecular preorganizada, con una cavidad que pueda actuar como nanoreactor para el control químico y espacial en la formación de las nanopartículas. Un ejemplo típico de este tipo de moléculas es la proteína ferritina. La apoferritina consiste en una proteína esférica formada por 24 subunidades rodeando una cavidad acuosa con un diámetro de aproximadamente 8 nm.

La organización de las multisubunidades para formar la apoferritina genera la presencia de canales. Ocho canales hidrofílicos de aproximadamente 4 Å permiten la entrada de iones metálicos y moléculas suficientemente pequeñas al interior de la cavidad de la proteína. Esto ha permitido la introducción de magnetita en el interior de la apoferritina produciendo magnetoferritina, la cual ha sido usada como método de diagnóstico monomodal (MRI) (Journal of Magnetic Resonance Imaging. 4(3), 497-505, 1994 May-Jun.).

### Descripción detallada de la invención

En vista del estado de la técnica un objetivo de la presente invención es proporcionar una nanopartícula biocompatible que esta vectorizada, la cual se puede usar como agente de contraste monomodal, como por ejemplo en OI, MRI y/o SPECT. También puede ser usada como agente de contraste bimodal, OI-MRI, e incluso trimodal, OI-MRI-SPECT. La nanopartícula está basada en una ferritina, caracterizada porque comprende ácido fólico. El ácido fólico está unido a la ferritina, preferiblemente a través de un puente que permita que los grupos carboxílicos del ácido fólico estén disponibles para su reconocimiento a nivel de la membrana celular. La nanoestructura puede ser vectorizada hacia un tejido u órgano concreto. Concretamente, la incorporación del ácido fólico hace que dicha nanoestructura se internalice preferentemente en las células tumorales.

En el contexto de la presente invención se entiende por ferritina cualquier apo-ferritina, independiente del material que se encuentre encapsulado en su cavidad interna, incluidas las apo-ferritinas en las cuales la cavidad interna está vacía.

Un puente preferido para la unión del ácido fólico son los quantum dots (QD). La nanoestructura formada por la conjugación de la ferritina y del quantum dot puede ser usada como agente de contraste en OI, sin perder la vectorización. Preferiblemente el ácido fólico se enlaza en la superficie del quantum dot.

Los denominados quantum dots (QD), han sido usados con éxito como nuevos marcadores fluorescentes en el campo biomédico y son considerados como una herramienta prometedora en Optical Imaging para diagnóstico clínico *in vivo* [Choi, H. S. Liu, W. Misra, W., Tanaka, E., Zimmer, J. P., Ipe, B. I., Bawendi, M. G., Frangioni, J. V., Nat. Biotechnol. 2007, 25, 1165-1170 y Qi, L., Gao, X. Expert. Opin. Drug Delivery 2008, 5, 263-267.].

Los quantum dots se pueden seleccionar por ejemplo entre los que se listan en el catálogo Invitrogen Molecular Probes 2009 y preferiblemente se seleccionan entre Qdot® 625 ITK™ carboxyl quantum dots (A10200), Qdot® 605 ITK™ carboxyl quantum dots (Q21301MP), Qdot® 585 ITK™ carboxyl quantum dots (Q21311MP), Qdot® 655 ITK™ carboxyl quantum dots (Q21321MP), Qdot® 565 ITK™ carboxyl quantum dots 8 μM solution (Q21331MP), Qdot® 525 ITK™ carboxyl quantum dots (Q21341MP), Qdot® 705 ITK™ carboxyl quantum dots (Q21361MP), Qdot® 800 ITK™ carboxyl quantum dots (Q21371MP), Qdot® 545 ITK™ carboxyl quantum dots (Q21391MP), Qdot® 605 ITK™ amino (PEG) quantum dots (Q21501MP), Qdot® 585 ITK™ amino (PEG) quantum dots (Q21511MP), Qdot® 655 ITK™ amino (PEG) quantum dots (Q21521MP), Qdot® 565 ITK™ amino (PEG) quantum dots (Q21531MP), Qdot® 525 ITK™ amino (PEG) quantum dots (Q21541MP), Qdot® 705 ITK™ amino (PEG) quantum dots (Q21561MP), Qdot® 800 ITK™ amino (PEG) quantum dots (Q21571MP), Qdot® 545 ITK™ amino (PEG) quantum dots (Q21591MP) y cualquiera de sus combinaciones. Los quantum dots preferidos son los que emiten entre 750 y 850 nm.

Aunque hay diferentes maneras de anclar el quantum dot a la superficie de la ferritina, preferiblemente estos están anclados a la capa externa de la ferritina mediante formación de un enlace covalente amida por reacción entre los grupos -NH<sub>2</sub> libres de los restos de lisinas de la capa externa de la ferritina y los grupos carboxílicos del QD.

Normalmente entre 1 y 2 unidades de quantum dots anclados a la superficie son suficientes para el uso de la ferritina como agente de contraste.

El número de quantum dots anclados a la magnetoferritina se puede calcular según la fórmula:  $N = 2\pi (R_{Fe} + R_{QD})^2 / (3)^{1/2} (R_{QD})^2$ , donde  $R_{Fe}$  es el radio de la nanopartícula y  $R_{QD}$  es el radio del quantum dot (QD). Esta expresión, estimativa, proviene de dividir el área de la ferritina cubierta por los quantum dots y dividirla por el área de ferritina cubierta por un solo quantum dot. El cálculo asume un empaquetamiento compacto de QD sobre la superficie de la ferritina y tiene en consideración los huecos entre los QD. Por ejemplo para una partícula magnética de 10 nm el número máximo de QD aumenta desde 45 hasta 133 cuando el diámetro del QD disminuye de 4 a 2 nm (D. Wang, J. He, N. Rosenzweig, Z. Rosenzweig, *Nano Lett.* 2004, 4, 409-413).

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención la nanopartícula contiene cadenas de un polímero biocompatible covalentemente unidas a la superficie de la ferritina. La presencia de este polímero mejora las propiedades de la nanopartícula de la invención para ser usada como agente de contraste puesto que aumenta su estabilidad general y muestra tiempos de vida medios suficientemente extensos para distribuirse por el sistema circulatorio sin ser fagocitados en un tiempo menor de 3 h, pero a la vez suficientemente cortos para evitar su acumulación en el cuerpo. Otra función del polímero biocompatible es que puede ser usado como puente para la introducción del ácido fólico. El polímero biocompatible preferido es polietilenglicol (PEG), entre otras razones por su disponibilidad industrial, su facilidad de incorporación a la superficie de la ferritina y su alta biocompatibilidad. Este PEG deber estar funcionalizado para que se pueda enlazar a la superficie de las ferritina, y puede estar bifuncionalizado si se quiere usar además como puente. El proceso de unir covalentemente el polímero de PEG a otras moléculas, normalmente fármacos o proteínas terapéuticas es conocido como PEGilación (Kohler, N.; Fryxell, G. E.; Zhang, M. J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 7206. Paul, K. G.; Frigo, T. B.; Groman, J. Y.; Groman, E. V. Bioconjugate Chem. 2004, 15, 394.). En nuestro caso, el PEG va unido covalentemente a la ferritina. Este proceso se puede llevar a cabo de forma sencilla, incubando un derivado del PEG reactivo con las nanopartículas. La unión covalente de PEG las enmascara del sistema inmune, aumenta la talla hidrodinámica (talla en solución) lo que aumenta el tiempo de vida media en sangre y reduce su eliminación por el sistema inmune. Este proceso además aumenta la solubilidad en agua de dichas nanopartículas y le confiere de forma general una estabilidad adicional. Se puede además controlar el número de moléculas de PEG que se unen a la superficie de la nanopartícula. Los derivados del PEG de tipo succinimidil éster permiten la formación de un enlace covalente de tipo amida por reacción con los grupos amino en la superficie externa de las nanopartículas. En resumen, para conseguir la unión de las cadenas de PEG y la ferritina, el PEG debe de estar derivatizado con grupos funcionales capaces de unirse por sí solos o con la ayuda de un reactivo a la superficie de la ferritina. El PEG se une preferiblemente mediante enlaces amida, siendo por lo tanto los derivados de PEG preferidos, como ya se ha comentado antes, los que contienen el grupo funcional succinimidil éster, que permite una funcionalización directa de la ferritina, ya que este grupo éster activado reacciona con los grupos aminos que rodean las nanopartículas, formando el enlace covalente tipo amida. Uno de los PEG preferidos es PEG1163 MeO-PEG-COO-Su  $\alpha$ -Metoxi- $\omega$ -ácido carboxílico succinimidil éster poli(etilenglicol) PEG-WM 2,000 Dalton. Los PEG funcionalizados como éster succinimidil son comerciales y su acoplamiento covalente a la partícula superparamagnético se puede llevar a cabo después de la introducción del  $^{99m}\text{Tc}$ .

El número de cadenas de PEG introducidas se pueden controlar dependiendo de la estequiometría y del PEG empleados. Por ejemplo, cuando se utilizan derivados de éster activados, dada la alta reactividad de dichos ésteres y de las aminas de la nanopartícula, la reacción puede hacerse completa en pocas horas, de tal forma que el número de PEG enlazados covalentemente a la superficie de la nanopartícula coincide con el número de moléculas del derivado de PEG/nanopartículas que se utiliza en la reacción. Además el número de cadenas introducidas se comprobó a través del uso de un patrón electroforético, analizando las diferentes ferritinas derivatizadas con PEG y viendo su correspondencia con un aumento escalonado y gradual del peso molecular y por ende de una mayor retención. El PEG puede ser mono- o bifuncionalizado con ésteres activados y se pueden unir PEG con diferente densidad y cristalinidad. La estabilidad de la ferritina de la invención se ve aumentada por la introducción del polímero biocompatible, y en especial cuando este es PEG, pero este mayor aumento de la estabilidad no es proporcional al número de cadenas introducidas. Por lo tanto, aunque se puede introducir entre 1 y 72 cadenas, se pueden dejar grupos amino libre por sí se desea realizar subsiguientes derivatizaciones o simplemente para reducir los coste de fabricación. Preferiblemente se incorporan de media entre 3 y 10 cadenas de PEG por ferritina y más preferiblemente entre 4 y 6.

A continuación se detallan algunos de los derivados de PEG útiles para la presente invención:

i) MeO-PEG-COOH: PEG1156 MeO-PEG(11)-COOH  $\alpha$ -Metoxi- $\omega$ -ácido propanoico undeca(etilenglicol) PEG-WM 588,7 g/mol, PEG1161 MeO-PEG-COOH  $\alpha$ -Metoxi- $\omega$ -ácido carboxílico poli(etilenglicol) PEG-WM 750 D, PEG1158 MeO-PEG-COOH  $\alpha$ -Metoxi- $\omega$ -ácido carboxílico poli(etilenglicol) PEG-WM 2.000 D, PEG1160 MeO-PEG-COOH  $\alpha$ -Metoxi- $\omega$ -ácido carboxílico poli(etilenglicol) PEG-WM 5.000 D, PEG1157 MeO-PEG-COOH  $\alpha$ -Metoxi- $\omega$ -ácido carboxílico poli(etilenglicol) PEG-WM 10.000 D, PEG1159 MeO-PEG-COOH  $\alpha$ -Metoxi- $\omega$ -carboxílico ácido poli(etilenglicol) PEG-WM 20.000 D, PEG1166 MeO-PEG-COO-Su  $\alpha$ -Metoxi- $\omega$ -ácido carboxílico succinimidil éster poli(etilenglicol) PEG-WM 750 D, PEG1163 MeO-PEG-COO-Su  $\alpha$ -Metoxi- $\omega$ -carboxílico ácido succinimidil éster poli(etilenglicol) PEG-WM 2.000 D, PEG1165 MeO-PEG-COO-Su  $\alpha$ -Metoxi- $\omega$ -ácido carboxílico succinimidil éster poli(etilenglicol) PEG-WM 5.000 D, PEG1162 MeO-PEG-COO-Su  $\alpha$ -Metoxi- $\omega$ -ácido carboxílico succinimidil éster poli(etilenglicol) PEG-WM 10.000 D, PEG1164 MeO-PEG-COO-Su  $\alpha$ -Metoxi- $\omega$ -ácido carboxílico succinimidil éster poli(etilenglicol) PEG-WM 20.000 D,

ii) HOOC-PEG-COOH: PEG1091 HOOC-PEG(12)-COOH  $\alpha,\omega$ -Bis(propionico ácido) duodeca(etilenglicol) PEG-WM 2.000 690,8 g/mol, PEG1083 HOOC-PEG-COOH  $\alpha,\omega$ -Bis-carboxi poli(etilenglicol) PEG-WM 2.000 D, PEG1085 HOOC-PEG-COOH  $\alpha,\omega$ -Bis-carboxi poli(etilenglicol) PEG-WM 3.000 D, PEG1086 HOOC-PEG-COOH  $\alpha,\omega$ -Bis-carboxi poli(etilenglicol) PEG-WM 6.000 D, PEG1082 HOOC-PEG-COOH  $\alpha,\omega$ -Bis-carboxi poli(etilenglicol) PEG-WM 10.000 D, PEG1084 HOOC-PEG-COOH  $\alpha,\omega$ -Bis-carboxi poli(etilenglicol) PEG-WM 20.000 D,

iii) NHS-PEG-NHS: PEG1184 Su-OOC-PEG-COO-Su  $\alpha,\omega$ -Di-succinimidil éster poli(etilenglicol) PEG-WM 2.000 D, PEG1186 Su-OOC-PEG-COO-Su  $\alpha,\omega$ -Di-succinimidil éster poli(etilenglicol) PEG-WM 3.000 D, PEG1187 Su-OOC-PEG-COO-Su  $\alpha,\omega$ -Di-succinimidil éster poli(etilenglicol) PEG-WM 6.000 D, PEG1183 Su-OOC-PEG-COO-Su  $\alpha,\omega$ -Di-succinimidil éster poli(etilenglicol) PEG-WM 10.000 D, PEG1185 Su-OOC-PEG-COO-Su  $\alpha,\omega$ -Di-succinimidil éster poli(etilenglicol) PEG-WM 20.000 D,

## ES 2 370 443 A1

iv).H<sub>2</sub>N-PEG-COOH:PEG1096 H<sub>2</sub>N-PEG-COOH·HCl  $\alpha$ -Amino- $\omega$ -carboxi poli(etilenglicol) clorohidrato PEG-WM 3.000 D, PEG1097 H<sub>2</sub>N-PEG-COOH\*HCl  $\alpha$ -Amino- $\omega$ -carboxi poli(etilenglicol) clorohidrato PEG-WM 5.000 Dalton PEG1095 H<sub>2</sub>N-PEG-COOH\*HCl  $\alpha$ -Amino- $\omega$ -carboxi poli(etilenglicol) clorohidrato PEG-WM 10.000 Dalton.

5

Se eligió preferiblemente el PEG1163 MeO-PEG-COO-Su  $\alpha$ -Metoxi- $\omega$ -carboxílico ácido succinimidil éster poli(etilenglicol) PEG-WM 2.000 Dalton. El derivado de PEG que contiene el grupo funcional succinimidil éster, permite una funcionalización directa de las ferritinas ya que este grupo éster activado reacciona con los grupos aminos que rodean las nanopartículas, formando un enlace covalente tipo amida.

10

Los datos experimentales han demostrado que después de 3 h de inyección, las partículas se acumulan de forma significativa en pulmón. Por otra parte, puesto que se puede controlar la cantidad de Tc/partícula (en un rango 0-20, con un 100% prácticamente de incorporación de Tc) permite que se pueda alcanzar de sobra el rango óptimo de concentraciones de Tc ( $10^{-9}$  M) y el de MRI (del orden de  $10^{-5}$  M).

15

En caso de que se desee utilizar la ferritina vectorizada como agente de contraste en MRI, se puede utilizar la cavidad interior de la ferritina para introducir magnetita, obteniendo una nanopartícula superparamagnética llamada magnetoferritina, a partir de ahora la magnetoferritina de la invención. Esta nanopartícula superparamagnética está constituida por una nanopartícula de magnetita encapsulada en la ferritina que presenta propiedades para comportarse como agente de contraste en MRI.

20

Otras ventajas de la magnetoferritina de la presente invención es que la preparación de estas nanopartículas se puede ocluir  $^{99m}\text{Tc}$ . Preferiblemente este se introduce en forma de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ . La introducción de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  se puede llevar a cabo a temperatura ambiente en un tiempo óptimo para su inyección en el cuerpo. Además no requiere reducción del Tc(VII) y su incorporación a la nanopartícula es prácticamente total, lo que permite una acumulación óptima del radionúclido. El hecho de que el pertecnato vaya ocluido en la red del mineral de Fe, hace que pueda controlarse la cantidad de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  por partícula y por lo tanto, puedan prepararse fármacos de diferentes dosis de radionúclido, en función de las necesidades. Al introducirse el  $^{99m}\text{Tc}$  hace que las magnetoferritina de la invención se pueden usar al menos como agente de contraste bimodal, MRI-SPECT.

30

Las especies de Tc preferidas para su inclusión en la magnetoferritina de la invención es  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ . La concentración de  $^{99m}\text{Tc}$  se puede ajustar en función de la necesidad, por ejemplo diagnosis o terapia pero preferiblemente está comprendida entre  $10^{-9}$ - $10^{-5}$ M.

35

Los presentes inventores han logrado obtener partículas de magnetita de alto contenido en Fe en la cavidad de ferritina. El contenido en Fe puede ser modulado hasta 3800 átomos de Fe por unidad de ferritina. Preferiblemente se modula la cantidad de Fe de 3000 a 3800 átomos de Fe por unidad de ferritina, lo cual permite mejora sus propiedades como agente de contraste en MRI.

40

Durante la preparación de la nanopartícula de magnetita, el Tc queda ocluido dentro de la magnetita, lo que es una ventaja frente a los complejos de coordinación de Tc puesto que la concentración de Tc por partícula es mucho mayor (hasta 20 veces mayor) y permite acumular una mayor densidad de átomos de Tc. Esta mayor acumulación redundará en un incremento de la radiación gamma y en una mayor resolución. Asimismo, la acumulación optimiza la concentración del radiomarcador, lo que permite el uso de menores dosis.

45

Se pueden utilizar diferentes rutas para la introducción del ácido fólico en la superficie de la ferritina. Por ejemplo se puede utilizar los grupos -COOH libres de la capa externa del QD, utilizando EDC (etil-3-dimetilamoniopropil carbodiimida) como catalizador para llevar a cabo esta reacción (Figura 1).

50

En otra realización la introducción del PEG se lleva a cabo antes de la introducción del ácido fólico, por lo que el método comprendería al menos las siguientes etapas si también se desea que la ferritina contenga al menos un QD:

a) anclar un puente a la superficie de la ferritina, preferiblemente al menos un QD.

55

b) anclar las cadenas de polietilenglicol a la superficie de la ferritina.

c) y después anclar moléculas de ácido fólico a la superficie del quantum dot.

60

En una realización preferida la etapa (a) comprende: adicionar una disolución que comprende un quantum dot derivatizado con grupos carboxílicos en la superficie y un agente de acoplamiento, como una carboimida; a otra disolución de la ferritina y posteriormente hacer reaccionar la disolución que comprende el PEG.

65

La introducción del polímero biocompatible se realiza preferentemente mediante el uso de derivados del polímero biocompatible que comprenden ácidos carboxílicos, y así se forman enlaces tipo amida, por lo que se puede usar un agente de acoplamiento para la catálisis de la reacción. La funcionalidad del polímero biocompatible puede estar activada, es decir los ácidos carboxílicos pueden estar derivatizados, incluyendo ya el agente de acoplamiento.

## ES 2 370 443 A1

Los agentes de acoplamiento preferidos de la presente invención se selecciona entre N,N-diciclohexilcarbodiimida, 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida, diisopropilcarbodiimida y cualquiera de sus combinaciones.

Respecto la síntesis de la magnetoferritina, esta se realiza antes de la introducción del QD y del polímero biocompatible, en caso de que la ferritina los incluyese. Aunque la introducción de la magnetita se puede hacer mediante el proceso descrito por Douglas (Masaki Uchida, Masahiro Terashima, Charles H. Cunningham, Yoriyasu Suzuki, Deborah A. Willits, Ann F. Willis, Philip C. Yang, Philip S. Tsao, Michael V. McConnell, Mark J. Young y Trevor Douglas, *Magnetic Resonance in Medicine* 60:1073-1081 (2008)), los presentes inventores han desarrollado una variación, que proporcionan algunas ventajas. El método de la invención comprende al menos las etapas de:

i) preparar una disolución de apoferritina, preferiblemente de concentración entre 0,1 y 100 mg/mL, y más preferiblemente entre 5 y 20 mg/mL,

ii) Preparar una disolución que comprenda Fe(II) y Fe(III) en estequiometría aproximada de 1:2, es decir entre 1:1,8 a 1,8:1

iii) preparar una disolución de pertecnectato ( $^{99m}\text{Tc}$ )

iv) adicionar de forma intercalada la disolución preparada en el paso (ii) y la disolución preparada en la etapa (iii) sobre la preparada en el paso (i).

v) Preferiblemente, se aísla la magnetoferritina superparamagnética dopada con  $^{99m}\text{Tc}$ .

La estequiometría inicial de Fe (II) y Fe (III) es determinante para la preparación apropiada de magnetoferritina y por ende de sus propiedades magnéticas. A diferencia del método reportado por Douglas y colaboradores, donde todo el Fe de partida está en su estado de oxidación Fe (II), se ha comprobado que con un riguroso control de la extensión de la oxidación en el balance estequiométrico de partida, como se realiza en el método de la presente invención, confiere las condiciones óptimas y no requiere un control exhaustivo de la entrada de aire en el sistema.

Las sales de hierro (II) y (III) útiles para la preparación de la magnetoferritina son conocidas por los expertos en la materia. En una realización preferida la etapa (ii) se prepara mezclando una disolución que comprende sulfato de hierro (II) amoníaco hexahidratado con otra que comprende  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  en HCl.

La inclusión de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  se lleva a cabo mediante pequeñas adiciones de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  al mismo tiempo que se hace la red de magnetita. Se puede dializar la disolución resultante en bolsas de diálisis con tamaño de poro adecuado y separar las partículas de todo el material restante. En algunos casos se ha estudiado el comportamiento del  $\text{MoO}_4^{2-}$ , porque tiene una química muy similar a del  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , pero no es radioactivo. Se ha observado que para pequeños contenidos de Mo (0-20 átomos de Mo/magnetoferritina), la incorporación es prácticamente del 100%.

Con objeto de llevar una caracterización más pormenorizada que permita conocer la distribución de Tc en la nanopartícula superparamagnética, se llevó a cabo un estudio mediante Microscopía Electrónica de Transmisión de muestras similares en las que en vez de usar el radiomarcador pertecnectato, se usaron otros aniones del tipo molibdato, vanadato, arseniato y fosfato. La química de estos aniones es similar a la del pertecnectato, especialmente si no hay cambios del estado de oxidación del metal.

El estudio de Microscopía Electrónica de Transmisión es de especial utilidad en el caso de las nanopartículas dopadas con vanadato; esta técnica nos proporciona tanto información sobre la distribución del tamaño de las nanopartículas como sobre la composición química y distribución espacial de los estados de oxidación en nanopartículas individuales. Las imágenes de campo oscuro a alto ángulo son sensibles al número atómico del material, es decir, aquellas zonas en la que estén presentes los elementos más pesados se mostrarán en la imagen como puntos de mayor intensidad. En nuestro caso de estudio, las nanopartículas, al contener elementos de alto número atómico, aparecerán en la imagen con alto contraste, siendo visualizadas directamente y de forma individual. En estas condiciones de registro de la imagen se puede realizar medidas directas del tamaño de las nanopartículas presentes en la muestra, a partir de las cuales se puede establecer una distribución de tamaños de partícula. Adicionalmente se puede determinar la distribución espacial, con resolución subnanométrica, de los elementos químicos presentes en las partículas individuales, utilizando la técnica de pérdida de energía de los electrones (EELS). Esta técnica nos permite estudiar directamente las transiciones electrónicas que ocurren en el átomo cuando este es sometido a un haz de electrones de alta energía, 200 kV. En particular esta técnica mide la energía que el electrón incidente pierde cuando interacciona con un átomo. Por ejemplo en el caso de los átomos de Vanadio, se estudian directamente las transiciones L2,3 donde los electrones 2p del átomo son transferidos a estados no ocupados sobre el nivel de Fermi. La energía requerida para esta transición es un valor característico para cada átomo y es igual a la energía perdida por el electrón incidente. Así, midiendo la pérdida de energía de los electrones incidentes uno puede identificar los distintos elementos presentes en las nanopartículas, (V 513 eV, O 532 eV, Fe 708 eV). Adicionalmente la estructura fina del espectro EELS de los metales de transición se caracteriza por la presencia de dos picos intensos (líneas blancas) cuya intensidad y posición en energía varía en función del estado de oxidación del material (Leapman *et al.* *Phys. Rev. Lett.* 45, 397 (1980), Turquat *et al.* *International Journal of Inorganic Materials* 3 (2001) 1025-1032). El estudio detallado de la estructura fina del pico de absorción refleja información sobre el estado electrónico del material pudiendo estudiar las posibles variaciones del estado de oxidación del hierro o vanadio a través de las nanopartículas.

El estudio de la composición química y los estados de oxidación en nanopartículas individuales fue llevado a cabo combinando las propiedades de las imágenes en campo oscuro a alto ángulo con la espectroscopia de pérdida de energía de los electrones, utilizando el método de adquisición conocido como espectro-imagen (Tence, M. Quartuccio y C. Colliex, *Ultramicroscopy* 58 (1995) 42, Maigne *et al* *Journal of Electron Microscopy* 58(3): 99-109 (2009)). Este modo consiste en adquirir simultáneamente la señal de campo oscuro a alto ángulo y los espectros EELS mientras la sonda barre una zona predeterminada, imagen (1D) o espectro línea. En particular utilizando un tiempo de adquisición de 2 segundos se adquirió un espectro EELS, con energía de dispersión de 0,5 eV, cada 0,6 nm a lo largo de una línea de 36,7 nm que pasa a través de las nanopartículas. El análisis de cada uno de los espectros adquiridos (cuantificación y estudio del estado de oxidación) a lo largo de la nanopartícula nos proporciona la composición y estado de oxidación del metal caracterizado a la escala subnanométrica.

Preferiblemente en el método en la disolución de la etapa (a) esta tamponada con AMPSO a un pH entre pH 7,5 y 9,5, preferiblemente entre 8,0 y 9,0.

En una realización particular, las cadenas del polímero biocompatible, preferiblemente PEG, se hacen reaccionar con la magnetoferritina después de la inclusión de la magnetita/Tc.

Otro aspecto se refiere a una composición farmacéutica que comprende las nanopartículas de la presente invención y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, así como el uso de dicha composición farmacéutica para la preparación de un medicamento.

Las nanopartículas de la presente invención, y especialmente la que comprende magnetoferritina, así como la composición farmacéutica que las incluye son útiles para la preparación de medicamento para la diagnosis de diferentes enfermedades, según la utilización de moléculas que lo confieran especificidad por un tejido u órgano en cuestión, pero en especial cáncer, incluyendo cáncer cervical, de cabeza y cuello, renal y de uréter, de colon, recto y ano, de endometrio, de esófago, de estómago, de hígado, de laringe, de ovario, de páncreas, de piel, de próstata, de pulmón, de cerebro, de testículo, leucemia, melanoma, y linfoma.

El ácido fólico actúa como ligando diana para células cancerosas humanas. La microscopía confocal demostró que efectivamente, las nanopartículas conjugadas con ácido fólico se localizaron en el interior de la célula cancerígena como consecuencia de la interacción específica, mientras que las que no contenía esta molécula vector no se internalizaron en dichas células.

Además de para detectar enfermedades también son útiles tanto la nanopartícula de la presente invención, y especialmente la que comprende magnetoferritina, así como la composición farmacéutica que las comprende como agentes de contraste en general y como agente de contraste en MRI, OI o SPECT.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### Descripción de las figuras

La figura 1 muestra una realización particular de la presente invención en la que el ácido fólico está unido covalentemente a las funciones de ácido carboxílico del QD.

La Figura 2 muestra una realización particular de la presente invención en la que el ácido fólico está unido covalentemente a las cadenas de PEG bifuncionalizadas.

### Ejemplos

#### *Acoplamiento ferritina con Quantum Dots + ácido fólico*

El estudio por Optical Imaging de la biodistribución de la magnetoferritina acoplada al QD800 mostró lo siguiente: en un tiempo de entre 15 minutos y 3 horas después de la administración intravenosa la nanoestructura se concentra en hígado, pulmón y cerebro, en orden decreciente. Después de 24 horas solo se detectaron valores superiores a los de la preadministración, aunque bajos, para hígado y pulmón. Después de 1 semana no se detectaron nanopartículas.

La microscopía confocal demostró que el bioconjugado ferritina-quantum dot+ácido fólico se localizaba en el interior de las células cancerígenas (tipo KB que contienen receptores de ácido fólico) como consecuencia de la interacción específica receptor-ligando, mientras que los bioconjugados que no contenía esta molécula vector no se internalizaron en dichas células. Asimismo, se llevó a cabo un segundo control, que consistió en incubar las nanopartículas que contenían ácido fólico con células MCF7 que no contienen receptor de ácido fólico. La imagen de microscopía confocal no detecta fluorescencia en el interior de la célula, poniendo de manifiesto que las nanoestructuras funcionalizadas con ácido fólico son específicas de líneas tumorales.

## ES 2 370 443 A1

### *Síntesis de magnetoferritina-<sup>99m</sup>Tc*

Disolución 1. Se preparan 10 mL una disolución de apoferritina (Sigma-Aldrich Ref. A341-1G, lot. 048K7004) de concentración 10 mg/mL en tampón AMPPO pH 8,6 (Sigma A6659). La disolución se desgasifica con una corriente fuerte de argón y en agitación durante 10 min.

Disolución 2. Se preparan dos disoluciones: 5 mL de Sal de Mohr (Amonium Iron (II) sulfate hexahydrate, Aldrich Chem. 20,350-5) 0,05 M en HCl 0,01 M y 5 mL de Fe (NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 0,1 M en HCl 0,01 M, se mezclan y se desgasifica con una corriente fuerte de argón y en agitación durante 10 min.

Disolución 3. Una disolución de NaOH 0,1 M se desgasifica con una corriente fuerte de argón y en agitación durante 10 min.

Disolución 4. Una disolución de perteneccato (<sup>99m</sup>Tc) obtenida a partir de kit comercial se desgasifica con una corriente fuerte de argón y en agitación durante 2 min.

Suspensión 5. Se lleva a cabo la adición lenta de la disolución 2 sobre la disolución 1. Se llevan a cabo adiciones de 0,25 mL cada 2 min hasta completar 1 mL. Antes de la 5 adición de la disolución 2, se adicionan 56 µL de la disolución de <sup>99m</sup>Tc (disolución 4).

Disolución 6. A la suspensión 5 se le adiciona lentamente 1 mL de una disolución de citrato sódico 0,1 M para eliminar todo los compuestos metálicos que no hayan quedado encapsulados en la apoferritina. La disolución resultante se cromatografía (10 min) en columna de exclusión por tamaño (Sephadex G-25, lot.360710, GE Healthcare, PD-10 Desalting Columns, 17-0851-01), obteniendo la disolución final 6 que contiene magnetita dopada con <sup>99m</sup>Tc encapsulada en la cavidad de la apoferritina.

### *Adición del radioisótopo de Tc a la magnetoferritina*

Disolución 4. Se usa un generador de <sup>99</sup>Mo/<sup>99m</sup>Tc de 12 GBq de actividad calibrada. La elución realizada es analizada en términos de actividad de <sup>99m</sup>Tc. Conocida la relación específica mCi/µg de <sup>99m</sup>Tc, es posible controlar la cantidad de Tc utilizada y por ende su actividad radioquímica.

Suspensión 5. Se lleva a cabo la adición lenta de la disolución 2 sobre la disolución 1. Se llevan a cabo adiciones de 0,25 mL cada 2 min hasta completar 1 mL. Antes de la 5 adición de la disolución 2, se adicionan 0,5 mL de la disolución de <sup>99m</sup>Tc (disolución 4).

Para la realización del control de calidad usamos tiras de papel Whatman 3 MM de 10 cm de longitud y 0,5 cm de ancho, en las que depositamos una alícuota (150 µL) del radiofármaco marcado, y para su desarrollo las introducimos en tanques cromatográficos con acetona hasta unos 0,5 mm de la base. Cuando la cromatografía se ha desarrollado la medimos en el Radio Cromatógrafo Minigita Raytest. En el origen de la tira cromatográfica se quedarán los coloides (Rf=0), en este caso la magnetoferritina dopada con Tc, y en el frente el perteneccato libre (Rf=1).

### *Acoplamiento de la magnetoferritina-<sup>99m</sup>Tc (disolución 6) con Quantum Dots*

Los quantum dots QD525, QD655 y QD800 se adquirieron en Invitrogen (Q21341MP, Q21321MP, Q21371MP, respectivamente). Los quantum dots están recubiertos por un polímero funcionalizado con grupos carboxílicos para reaccionar con los grupos amino de la ferritina. Los residuos carboxílicos de los QDs deben activarse con EDC (1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida, Fluka 03450-25G).

Disolución 7. 20 µL de la solución stock del QD comercial (8 mM) se incuban con 10 µL de una disolución stock de EDC (10 mg/mL en agua bidestilada) durante 30 min para su activación. Esta preparación se lleva a cabo mientras se desgasifican las disoluciones requeridas en el paso anterior de la síntesis de magnetoferritina.

Disolución 8. 0,2 mL de la disolución 6 (magnetoferritina-<sup>99m</sup>Tc) se diluyen hasta 2 mL en tampón PBS (Fosfato potásico monobásico, Acros Organics 424205000 y fosfático sódico dibásico, Acros Organics 424375000) y se le añade la disolución 7 (quantum dot activado). La mezcla se incuba durante 1 h en agitación suave y a 4°C. Posteriormente la muestra se purifica en una columna de cromatografía (15 min) por exclusión de tamaño (Sephacryl 5,5 cm x 1,5 cm de lecho, Sigma) con el fin de eliminar el exceso de producto que no hubiese reaccionado.

### *Acoplamiento de PEG*

El derivado de polietilenglicol MeO-PEG-NHS α-Metoxi-ω-carboxílico ácido succinimidil éster poli(etilenglicol) (PEG-MW 2.000 Dalton)/ M.W. 2000 g/mol se adquirió en Iris Biotech GmbH (PEG1164, lot. 125447).

Disolución 9. 1000 moles de PEG (0,0058 g en 0,5 mL de agua bidestilada) fueron añadidos a la disolución 8 y se dejó 30 min en agitación suave y a temperatura ambiente. Se cromatografió (10 min) en una columna de exclusión por tamaño (Sephadex G-25, lot.360710, GE Healthcare, PD-10 Desalting Columns, 17-0851-01) hasta obtener una disolución pura de nanopartículas de magnetita dopadas con <sup>99m</sup>Tc, acopladas covalentemente con un QD y PEG.

*Cuantificación de los quantum dot anclados*

Solamente cuando la preparación se lleva a cabo en un fuerte exceso de QD, se logran observar nanopartículas del tipo QD-magnetoferritina-QD. El recuento del número de QD enlazados covalentemente a la magnetoferritina de la presente invención se llevó a cabo mediante TEM (Microscopía Electrónica de Transmisión) y mediante Microscopía Electrónica de Barrido-Transmisión en modo Campo Oscuro Anular de Alto Ángulo (HAADF-STEM). En esta última técnica, la intensidad de la señal con la que se construye la imagen depende del número atómico (Z), de tal forma que en las zonas de la imagen en las que están presentes elementos químicos con mayor valor de Z, el brillo es mayor. La relación entre la intensidad en la imagen y el valor del número atómico es aproximadamente del tipo  $Z^2$  (S.J. Pennycook, D.E. Jesson, Ultramicroscopy, 1991, 37, 14). La imagen STEM-HAADF muestra claramente la presencia de dos partículas de dimensiones nanométricas próximas entre sí. Puede apreciarse, igualmente, que hay una clara diferencia de brillo entre las dos partículas que forman la nanoestructura, tal como cabría esperar, puesto que una contiene un óxido de Fe ( $Z_{Fe}=26$ ,  $Z_O=8$ ) y la otra, una capa de CdSe ( $Z_{Cd}=48$ ,  $Z_{Se}=34$ ). De acuerdo con lo comentado anteriormente, la partículas que muestra menor intensidad sería la que contiene elementos más ligeros (Fe, O) y la más brillante aquella que contiene a los elementos más pesados (Cd, Se). Para confirmar la interpretación anterior y obtener una evidencia directa sobre la naturaleza química de cada una de las dos partículas que se integraban en las nanoestructuras detectadas mediante Microscopía Electrónica, se llevó a cabo un estudio complementario mediante la técnica denominada EELS (Espectroscopia de pérdida de energía de los electrones). Esta técnica, que se lleva a cabo en los microscopios electrónicos de transmisión, se registra la energía cinética que pierde el haz de electrones incidente al atravesar la muestra. Esta pérdida de energía corresponde a las interacciones inelásticas electrón-muestra. Parte de estas interacciones corresponden a excitaciones de electrones de los niveles internos de los átomos presentes en la muestra a niveles por encima del nivel de Fermi. Como las energías de estas transiciones son específicas de cada átomo, el registro del espectro de pérdida de energías constituye una huella dactilar de los elementos presentes en la muestra, permitiendo en definitiva realizar un análisis químico cualitativo y cuantitativo de la zona iluminada por el haz de electrones. Como el diámetro de las sondas de electrones que se pueden obtener en microscopios de transmisión como el empleado para obtener el estudio, dotado con cañón de emisión de campo o FEG, puede ser del orden de tan solo unos pocos Angstroms, esta técnica permite realizar lo que viene a llamarse como nanoanálisis, es decir un análisis químico cualitativo y cuantitativo con una resolución espacial mejor que un manómetro. Es más, si formamos una de estas sondas de dimensiones nanométricas, controlamos su movimiento sobre la muestra y en paralelo realizamos un registro simultáneo de la señal STEM-HAADF y de los espectros EELS podemos trabajar en un modo denominado de espectro-imagen (en el caso en el que la muestra se barra a lo largo de dos direcciones, sobre un área) o de espectro-línea (cuando la sonda de electrones se barre siguiendo una trayectoria lineal desde un punto a otro de la muestra). Trabajando en estos modos obtenemos información no sólo de qué elementos están presentes y en qué cantidad sino, además, sobre la distribución espacial de los elementos presentes en la muestra, con resolución subnanométrica. Esta aproximación experimental de espectro-línea es la que se ha aplicado al estudio de la composición química de las nanoestructuras reivindicadas. En nuestro caso se ha realizado análisis EELS a lo largo de trayectorias lineales que, partiendo del extremo de una de las partículas y cruzándola, llegaban y cruzaban la segunda de las partículas, adquiriendo un espectro, con una sonda menor que 5Å, tras cada 5Å. Los espectros muestran una partícula más brillante debido a la presencia del Cd, y una partícula menos brillante que contiene señales de Fe y O, confirmando que la nanoestructura consiste en dímeros de magnetoferritina y QD.

*Acoplamiento de Ácido Fólico*

El ácido fólico se puede conjugar con las nanopartículas PEG-magnéticas-QD, bien a través del grupo carboxílico libre del QD (Figura 1) o por los grupos ésteres de los polímeros PEG bifuncionalizados previamente unidos a la ferritina (Figura 2). En el primer caso, podríamos usar EDC (hidrocloruro de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida) para la activación del -COOH libre del QD. En el segundo caso, la reacción más favorable ocurre entre el éster activado de PEG y el grupo -NH<sub>2</sub> del ácido fólico. Para el primer caso, los residuos carboxílicos de los QDs deben activarse con EDC (1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida, Fluka 03450-25G). Así, se adicionan a la disolución conteniendo magnetoferritina y QD 10 µL de una disolución stock de EDC (10 mg/mL en agua bidestilada) y se deja en agitación durante 30 min para su activación. Posteriormente se añaden 0,7 mg de ácido fólico (Sigma Aldrich F7876-25G). La mezcla resultante se agita durante 30 minutos y se cromatografía (10 min) en una columna de exclusión por tamaño (Sephadex G-25, lot.360710, GE Healthcare, PD-10 Desalting Columns, 17-0851-01).

El agente de acoplamiento se selecciona entre DCC: N,N-diciclohexylcarbodiimide, EDC ó EDAC:1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide, DIC: diisopropilcarbodiimida y cualquiera de sus combinaciones.

Para el segundo caso se debe realizar un acoplamiento previo del polímero PEG bifuncionalizado a la ferritina, para ello se usa el derivado del polietilenglicol Su-OOC-PEG-COO-Su  $\alpha,\omega$ -Di-succinimidil éster poli(etilen glicol) PEG-WM 2.000 D (Iris Biotech). Una disolución conteniendo 1000 moles de PEG (0,0058 g en 0.5 mL de agua bidestilada) fueron añadidos a la disolución de nanopartículas de magnetita dopadas con <sup>99m</sup>Tc acopladas con QDs y se dejó 30 min en agitación suave y a temperatura ambiente. Se cromatografió (10 min) en una columna de exclusión por tamaño (Sephadex G-25, lot.360710, GE Healthcare, PD-10 Desalting Columns, 17-0851-01). Posteriormente, 0,7 mg de ácido fólico (Sigma Aldrich F7876-25G) se adicionan a la disolución anterior. La mezcla resultante se agita durante 30 minutos y se cromatografía (10 min) en una columna de exclusión por tamaño (Sephadex G-25, lot.360710, GE Healthcare, PD-10 Desalting Columns, 17-0851-01) hasta obtener una disolución pura.

REIVINDICACIONES

1. Una nanopartícula que comprende una ferritina y ácido fólico.
- 5 2. La nanopartícula según la reivindicación anterior, **caracterizada** porque comprende al menos un quantum dot unido covalentemente a la superficie de la ferritina.
3. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada** porque comprende ácido fólico en la superficie del quantum dot.
- 10 4. La nanopartícula según la reivindicación anterior, **caracterizada** porque el quantum dot emite entre 750 y 850 nm.
- 15 5. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, donde el quantum dot está funcionalizado con grupos carboxílicos.
6. La nanopartícula según cualquiera las reivindicaciones 2 a 5, **caracterizada** porque el quantum dot está unido covalentemente a la superficie de la ferritina mediante enlaces amida.
- 20 7. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, **caracterizada** porque comprende entre 1 y 2 unidades de quantum dots anclados a la superficie de la ferritina.
8. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, **caracterizada** porque comprende al menos un polímero biocompatible unido covalentemente a la superficie de la ferritina.
- 25 9. La nanopartícula según la reivindicación anterior, **caracterizada** porque el polímero biocompatible es polietilenglicol.
- 30 10. La nanopartícula según la reivindicación anterior, **caracterizada** porque la ferritina es obtenible por la unión de PEG1163 MeO-PEG-COO-Su  $\alpha$ -Metoxi- $\omega$ -ácido carboxílico succinimidil éster poli(etilenglicol) PEG-WM 2,000 Dalton a la superficie de la ferritina.
- 35 11. La nanopartícula según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores, **caracterizada** porque el polietilenglicol está unido a la ferritina mediante enlaces covalentes de tipo amida.
12. La nanopartícula según cualquiera de las tres reivindicaciones anteriores, **caracterizada** porque tiene entre 3 y 10 cadenas de polietilenglicol unidas covalentemente a la superficie de la ferritina.
- 40 13. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracteriza** porque el núcleo de la ferritina tiene magnetita ocluyendo  $^{99m}\text{Tc}$ .
14. La nanopartícula según la reivindicación anterior, **caracterizada** porque la especie de  $^{99m}\text{Tc}$  es  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ .
- 45 15. La nanopartícula según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores, **caracterizada** porque la concentración de la especie  $^{99m}\text{Tc}$  está comprendida entre  $10^{-9}$ - $10^{-5}$ M.
16. Un método para la síntesis de cualquiera de las nanopartículas como se definen en las reivindicaciones 3 a 15 que comprende:
  - 50 a) anclar al menos un quantum dot a la superficie de la ferritina
  - c) y después anclar moléculas de ácido fólico a la superficie del quantum dot.
- 55 17. El método según la reivindicación anterior, **caracterizado** porque comprende una etapa (b) entre la etapa (a) y la (c) donde la etapa (b) comprende anclar las cadenas de polietilenglicol a la superficie de la ferritina.
18. El método según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores, donde la etapa (a) comprende: adicionar una disolución que comprende un quantum dot derivatizado con grupos carboxílicos en la superficie y una carboimida; a otra disolución de la ferritina y posteriormente hacer reaccionar la disolución que comprende el polietilenglicol.
- 60 19. El método según cualquiera de las tres reivindicaciones anteriores, donde la etapa (b) comprende un agente de acoplamiento.
- 65 20. El método según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el agente de acoplamiento se selecciona entre N,N-diciclohexilcarbodiimida, 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida, diisopropilcarbodiimida y cualquiera de sus combinaciones.

## ES 2 370 443 A1

21. El método según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20 para la síntesis de cualquiera de las ferritinas como se definen en las reivindicaciones 13 a 15 que comprende antes de la incorporación del quantum dot al menos las siguientes etapas:

- 5 i) preparar una disolución de apoferritina, preferiblemente de concentración entre 0,1 y 100 mg/mL, y más preferiblemente entre 5 y 20 mg/mL,
- ii) preparar una disolución que comprenda Fe (II) y Fe (III) en estequiometría aproximada de 1:2.
- 10 iii) preparar una disolución de pertenectato ( $^{99m}\text{Tc}$ )
- iv) adicionar de forma intercalada la disolución preparada en el paso (ii) y la disolución preparada en la etapa (iii) sobre la preparada en el paso (i).
- 15 v) aislar la magnetoferritina superparamagnética dopada con  $^{99m}\text{Tc}$ .

22. El método según la reivindicación anterior en la que la disolución de la etapa (ii) se prepara mezclando una disolución que comprende sulfato de hierro (II) amoniaco hexahidratado con otra que comprende  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  en HCl.

20

23. El método según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores, donde la disolución de la etapa (i) esta tamponada con AMPSO a un pH entre pH 7,5 y 9,5, preferiblemente entre 8,0 y 9,0.

25

24. Una composición farmacéutica que comprende la nanopartícula como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

25. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación anterior para la preparación de un medicamento.

30

26. El uso de la composición según la reivindicación anterior para la preparación de un medicamento para la diagnosis de cáncer.

27. El uso de la nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 o de la composición farmacéutica según la reivindicación 24 para la preparación de un medicamento como agente de contraste.

35

28. El uso nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 o de la composición farmacéutica según la reivindicación 24 para la preparación de un medicamento para su uso como agente de contraste en MRI, OI o SPECT.

40

45

50

55

60

65

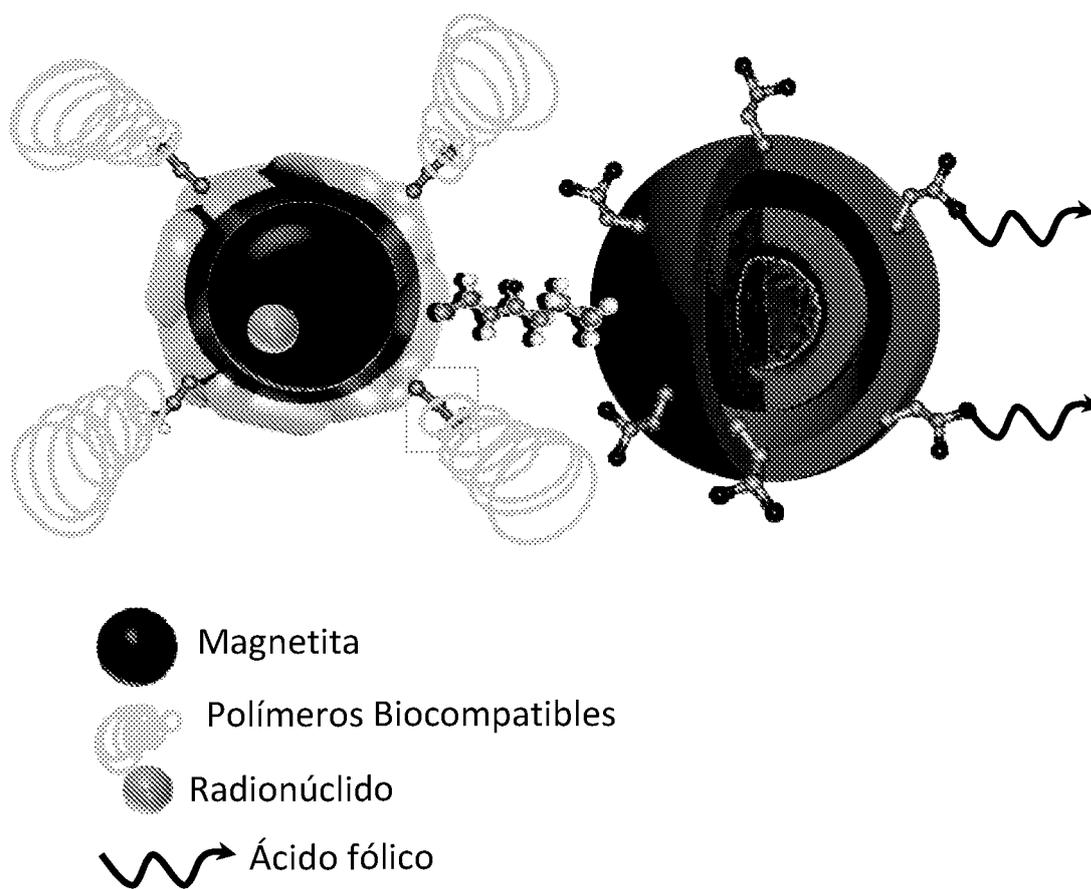


FIG. 1

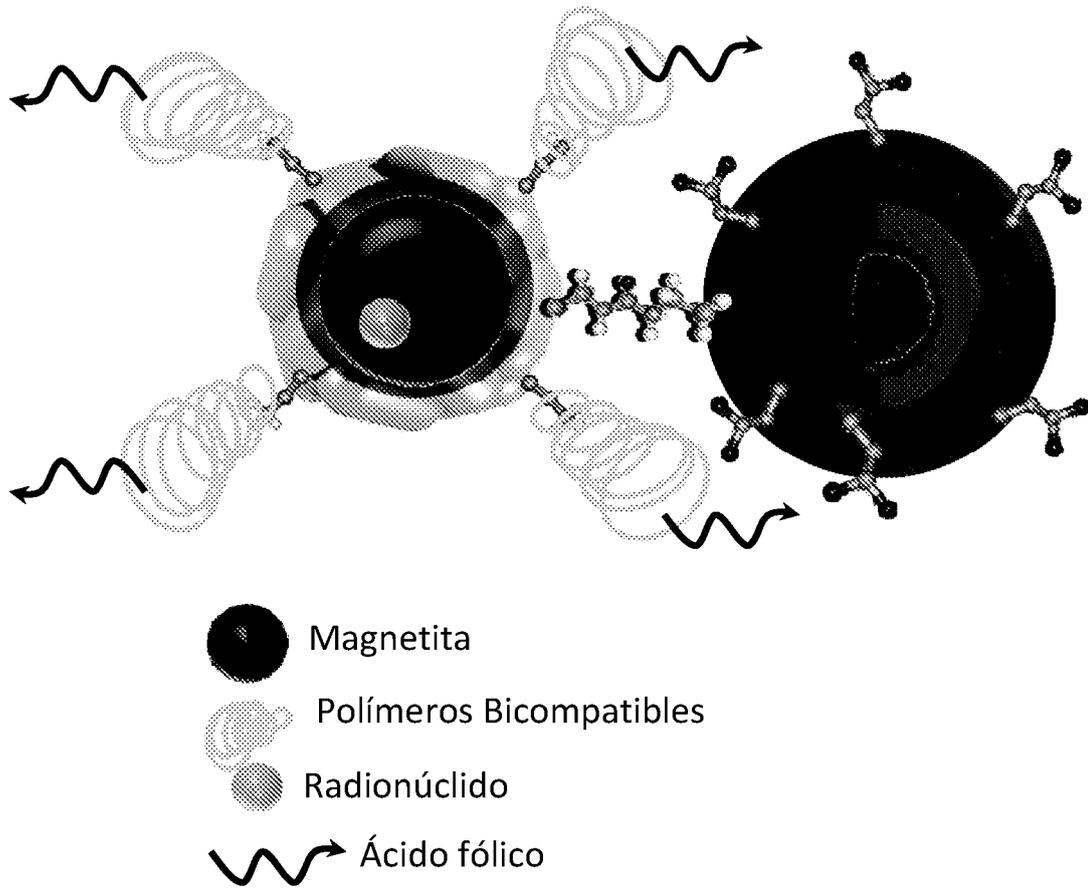


FIG. 2



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200931148

②② Fecha de presentación de la solicitud: 11.12.2009

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	FERNÁNDEZ B. et al. Quantum dots decorated with magnetic bionanoparticles. Advanced Functional Materials. 2008, Vol. 18, páginas 3931-3935, todo el documento.	1-7,16,24-28
Y	ZENG R. et al. Aqueous synthesis of type-II CdTe/CdSe core-shell quantum dots for fluorescent probe labeling tumor cells. Nanotechnology. 06.02.2009, Vol. 20, Nº 9, todo el documento.	1-7,16,24-28
A	SUN C. et al. Folic acid-PEG conjugated superparamagnetic nanoparticles for targeted cellular uptake and detection by MRI. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 30.05.2006, Vol. 78A, páginas 550-557, todo el documento.	1-28
A	WO 2005102396 A2 (EMORY UNIVERSITY) 03.11.2005, todo el documento.	1-28
A	ZHANG Q. et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with a folate-conjugated polymer. Journal of Materials Chemistry. 30.09.2009, Vol. 19, páginas 8393-8402, todo el documento.	1-28

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
24.11.2011

Examinador  
M. Cumbreño Galindo

Página  
1/5

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K49/14** (2006.01)

**A61K51/08** (2006.01)

**B82Y5/00** (2011.01)

**A61K103/10** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, B82Y

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, NPL, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.11.2011

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-28	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 8-15, 17-23	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-7, 16, 24-28	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	FERNÁNDEZ B. et al. Vol. 18, páginas 3931-3935	2008
D02	ZENG R. et al. Nanotechnology. Vol. 20, Nº 9	06.02.2009
D03	SUN C. et al. Journal of Biomedical Materials Research Part A. Vol. 78A, páginas 550-557	30.05.2006
D04	WO 2005102396 A2	03.11.2005
D05	ZHANG Q. et al. Journal of Materials Chemistry. Vol. 19, páginas 8393-8402	30.09.2009

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente invención tiene por objeto una nanopartícula que comprende al menos un quantum dot unido covalentemente a la superficie de una ferritina y ácido fólico en la superficie del quantum dot (reivindicaciones de la 1 a la 7). También comprende un polímero biocompatible unido a la superficie de la ferritina, en concreto polietilenglicol (reivindicaciones de la 8 a la 12) y la ferritina puede presentar en el núcleo magnetita ocluyendo  $^{99m}\text{Tc}$  (reivindicaciones de la 13 a la 15). Así mismo, la presente invención tiene por objeto un método para la síntesis de la nanopartícula mencionada (reivindicaciones de la 16 a la 23), una composición farmacéutica que la contiene (reivindicación 24) y el uso de la misma para preparar un medicamento para la diagnosis del cáncer como agente de contraste en MRI, OI o SPECT (reivindicaciones de la 25 a la 28).

D01 menciona que las ferritinas nativas están principalmente compuestas de ferrihidrita y magnetita, proporcionando una plataforma para la funcionalización química y genética, y describe una magnetoferritina bioconjugada, una nueva clase de quantum dots (QDs) magnéticos, solubles en agua y fluorescentes.

D02 expone la síntesis y caracterización de quantum dots (QDs) compuestos por CdTe/CdSe, así como su conjugación con folato para su uso como sondas fluorescentes en el marcaje de células tumorales encontrándose que, de este modo, pueden entrar en dichas células tumorales eficientemente.

D03 describe el desarrollo y estudio *in vitro* de nanoconjugados para ser utilizados en MRI. Tales nanoconjugados son sintetizados recubriendo nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (magnetita) con polietilenglicol (PEG) mediante uniones covalentes, seguido de la conjugación del PEG con ácido fólico a través de uniones tipo amida. El ácido fólico ha sido ampliamente estudiado como molécula diana para diferentes agentes utilizados en el tratamiento del cáncer o en su diagnóstico empleando distintas técnicas de imagen. Por su parte, el PEG previene la absorción por proteínas plasmáticas e incrementa el tiempo de permanencia en sangre permitiendo, de este modo, que la nanopartícula alcance el tejido diana.

D04 anticipa nanoestructuras multimodales que incluyen diferentes componentes, como quantum dots y partículas metálicas o magnéticas, que pueden estar recubiertas por un polímero, las cuales pueden ser detectadas utilizando diferentes técnicas de imagen como MRI o SPECT. En concreto, la nanoestructura comprende una nanoespecie con una primera funcionalidad detectable –óptica, magnética, radioactiva- y una segunda molécula con una segunda funcionalidad detectable, estando la nanoespecie unida a un compuesto biocompatible como polietilenglicol y pudiendo formar parte también de la nanoestructura una tercera molécula con una tercera funcionalidad detectable siendo, en cualquier caso, las tres diferentes. La nanoespecie puede ser un quantum dot o una nanopartícula magnética y la segunda molécula tecnecio, o bien la nanoespecie puede ser una nanopartícula magnética de óxido de hierro, la segunda molécula un quantum dot y la tercera molécula  $^{99m}\text{Tc}$ .

D05 presenta una nueva estrategia para sintetizar nanopartículas magnéticas funcionalizadas que formen dispersiones estables y posean aplicaciones biomédicas. Para ello, conjugan folato-tetra(etilenglicol)-poli(glicerol monoacrilato) a nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

**1. NOVEDAD**

Ninguno de los documentos considerados anticipa una nanopartícula que comprenda al menos un quantum dot unido covalentemente a la superficie de una ferritina y ácido fólico en la superficie del quantum dot, así como un polímero biocompatible unido a la superficie de la ferritina, en concreto polietilenglicol, y un núcleo de magnetita ocluyendo  $^{99m}\text{Tc}$ . Por lo tanto, las reivindicaciones de la 1 a la 28 se consideran nuevas.

## 2. ACTIVIDAD INVENTIVA

D01 menciona que las ferritinas nativas están principalmente compuestas de ferrihidrita y magnetita, proporcionando una plataforma para la funcionalización química y genética, y describe una magnetoferritina bioconjugada, una nueva clase de quantum dots (QDs) magnéticos, solubles en agua y fluorescentes. Se trata de nanopartículas doblemente funcionales, magnéticas y fluorescentes, diseñadas para diagnóstico por imagen empleando técnicas como MRI. Considerando el potencial de la magnetoferritina y de los QDs, se utilizan los residuos de lisina situados en la capa externa de la proteína para conjugar covalentemente tres tipos de carboxil quantum dots (QD525, QD655 y QD800) a la magnetoferritina, de modo que se obtienen tres nanoestructuras magnéticas con emisión de fluorescencia variable. La conjugación se lleva a cabo utilizando 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida hidrocioruro que origina la formación de uniones amida. Así, estas nanopartículas presentan una parte correspondiente a la magnetoferritina superparamagnética que puede servir como agente de contraste en MRI y otra parte correspondiente a los QDs que emiten fluorescencia y, por todo ello, tienen aplicación en el campo nanobiomédico.

La diferencia entre D01 y la presente invención es que en dicho documento la ferritina no comprende ácido fólico unido a la superficie del quantum dot.

D02 expone la síntesis y caracterización de quantum dots (QDs) compuestos por CdTe/CdSe, así como su conjugación con folato para su uso como sondas fluorescentes en el marcaje de células tumorales encontrándose que, de este modo, pueden entrar en dichas células tumorales eficientemente.

Para un experto en la materia sería evidente utilizar ácido fólico unido al quantum dot (D02) en una nanopartícula en la que la ferritina está unida a dicho quantum dot (D01). Además, es conocido en el estado de la técnica el uso del ácido fólico como molécula diana en la elaboración de nanoestructuras para obtener diferentes agentes utilizados en el tratamiento del cáncer o en su diagnóstico mediante el empleo de técnicas de imagen como MRI y favorecer de esta manera que tales agentes se fijen específicamente a las células cancerosas. Por consiguiente, las reivindicaciones 1-7, 16 y 24-28 no presentan actividad inventiva.

Las reivindicaciones 8-15 y 17-23 presentan actividad inventiva.