

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 988**

51 Int. Cl.:

H01F 1/44 (2006.01)

H01F 1/00 (2006.01)

A61K 49/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04742722 .4**

96 Fecha de presentación: **13.05.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1627395**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.02.2006**

54 Título: **Dispersiones acuosas estables en medio neutro, que comprenden partículas con superficie modificada**

30 Prioridad:
23.05.2003 FR 0306279

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.06.2012

73 Titular/es:
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS)
3, RUE MICHEL ANGE
75016 PARIS, FR**

72 Inventor/es:
**DUGUET, Etienne;
MORNET, Stéphane y
PORTIER, Joseph**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 383 988 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Dispersiones acuosas estables en medio neutro, que comprenden partículas con superficie modificada

La presente invención se refiere a dispersiones acuosas de partículas de dimensiones nanométricas a base de óxido de hierro magnético, de superficie modificada, que presentan una tasa muy baja de aglomeración interparticular, en particular en medio neutro. Estas dispersiones de partículas magnéticas de superficie modificada y esencialmente individualizadas se revelan útiles particularmente para la preparación de composiciones de interés diagnóstico o terapéutico, y muy particularmente para la preparación de composiciones adaptadas a una administración por inyección.

Se conocen actualmente diferentes tipos de composiciones que comprenden partículas magnéticas nanométricas (de dimensiones inferiores a 100 nm), dispersadas en el seno de medios dispersantes líquidos de naturaleza acuosa (agua o soluciones acuosas), o bien de naturaleza orgánica (hidrocarburos, queroseno, xileno, tolueno, poliglicoles o feniléteres, en particular).

En estas composiciones, las partículas más utilizadas son partículas a base de hierro (Fe- α), de cobalto (Co- α), y partículas a base de óxido(s) de hierro magnético(s) tales como ferritas (a saber, la mayoría de las veces, óxidos de fórmula global $M^II Fe^III Fe^II O_4$, en los cuales M^II designa un metal elegido entre Fe, Co, Ni, Cd, Mn, Zn o Mg, en su estado de oxidación +II).

Aunque presentan en general propiedades magnéticas menos pronunciadas que las partículas de Fe- α o de Co- α , las partículas a base de óxidos de hierro magnéticos (y en particular las partículas a base de ferrita) se revelan más estables respecto de la oxidación, y por consiguiente se utilizan más ampliamente, en particular en las dispersiones acuosas. En este marco, se utilizan en particular partículas ferromagnéticas a base de magnetita (Fe₃O₄) o de maghemita (Fe₂O₃- γ).

Las dispersiones, en particular acuosas, de partículas a base de óxidos de hierro magnético están a menudo designadas por el término genérico de "ferrofluido". Esta denominación viene del hecho de que, cuando este tipo de dispersión presenta una concentración suficientemente importante en partículas de óxido de hierro, la aplicación de un gradiente de campo magnético provoca la puesta en desplazamiento de las partículas que arrastran el líquido. A escala macroscópica, el comportamiento observado es esquemáticamente el de un "líquido magnético".

Uno de los problemas a resolver cuando se sintetiza un ferrofluido es el de la estabilización de las partículas magnéticas respecto de la aglomeración.

En efecto, de manera general, en un ferrofluido (como en toda dispersión de partículas de óxidos de dimensiones nanométricas), las partículas a base de óxido tienden a atraerse mutuamente, en particular debido a interacciones atractivas de tipo Van der Waals. Por lo tanto se revela necesario garantizar una estabilización de la dispersión, para inhibir el fenómeno natural de floculación. Para inhibir el fenómeno de aglomeración interparticular, se aplica en general, en el seno de las dispersiones de tipo "ferrofluidos", partículas que presentan cargas de superficie que inducen interacciones repulsivas entre las partículas ("estabilización electrostática") o partículas que presentan en superficies macromoléculas, adsorbidas o injertadas ("estabilización estérica"). Cuando los dos modos de estabilización se utilizan conjuntamente, se habla de "estabilización electroestérica".

La estabilización de un ferrofluido es más difícil de realizar cuanto mayor menor es la dimensión de las partículas presentes, y cuanto mayor es la concentración en partículas.

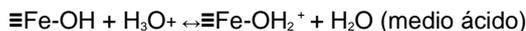
Ahora bien, en particular para obtener propiedades magnéticas suficientemente pronunciadas, es en general deseable que la concentración en partículas sea elevada en el seno de un ferrofluido.

Además, en una dispersión de partículas magnéticas de tipo "ferrofluido", es particularmente ventajoso que las partículas de óxido sean partículas de pequeñas dimensiones, preferiblemente inferior a 20 nm, y típicamente entre 3 y 15 nm. En este caso, en efecto, las partículas son en general monocristalinas, y cada una de las partículas es entonces una partícula magnética, "monodominio", que posee un momento magnético propio y que se comporta como un macroespín magnético. El ferrofluido presenta entonces un comportamiento global de naturaleza paramagnética (fenómeno denominado "superparamagnetismo"), es decir que las partículas no conservan imantación remanente en ausencia de campo magnético. Esta ausencia de imantación remanente presenta la ventaja de no inducir interacciones magnéticas entre las partículas para provocar su aglomeración, contrariamente a lo que se observaría con partículas magnéticas no monocristalinas, que tienden a atraerse unas a otras para compensar sus momentos magnéticos remanentes.

Cabe señalar que, cuando se desea utilizar dispersiones de partículas magnéticas para una administración en animal o ser humano, por ejemplo, a título de agente de contraste para IRM, es a menudo necesario disponer partículas que presenten diámetro hidrodinámico lo menor posible, en particular de manera a travesar el máximo número de membranas biológicas. Cuando las dispersiones se inyectan por vía intravenosa, la reducción de la dimensión de las partículas se revela también necesaria para evitar los fenómenos de obstrucción de la red sanguínea, en particular al nivel de los capilares, en particular para limitar los riesgos de embolias.

Uno de los medios más usuales para obtener dispersiones acuosas de partículas de un óxido de hierro magnético que presenta una tasa de aglomeración interparticular lo más reducida posible consiste en controlar el pH del medio acuoso dispersante bien a un valor inferior a 5 (ferrofluido ácido), bien a un valor superior a 10 (ferrofluido básico).

- 5 A este respecto, se ha observado que en medio acuoso, se observa, en la superficie de partículas de óxidos de hierro tales como ferritas, una quimiosorción de moléculas de agua que conduce a la formación de especies hidróxilas que se puede esquematizar por $\equiv\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OH}$. Estas especies hidroxilas son anfóteras, y en función del pH del medio acuoso, conducen a la formación de cargas positivas o negativas según los siguientes esquemas de reacción.



- 10 Sin embargo, a pH comprendido entre 5 y 10, la densidad de cargas presente en la superficie de partículas de óxido de hierro es demasiado baja para garantizar una estabilización de tipo electrostático. A este respecto, cabe señalar que el punto isoeléctrico de un óxido de hierro, a saber el pH al cual las cargas presentes en superficie del óxido de hierro se compensan, es en general del orden de 7 (está generalmente comprendido entre 6 y 9 y vale típicamente 7 en particular en el caso de la maghemita). De este modo, se verifica que la estabilidad de un ferrofluido acuoso (en particular de tipo USPIO) a un pH del orden de 7 no se puede obtener por simple estabilización electrostática, lo
- 15 cual constituye una limitación para la utilización de las partículas de óxido de hierro de tipo ferrita en particular para aplicaciones médicas (agente de contraste para IRM en particular) donde es justamente necesario disponer de dispersiones estables a un pH fisiológico, a saber a un pH del orden de 7,4.

- 20 Para garantizar la estabilidad de ferrofluidos acuosos de pH neutro, se han desarrollado en consecuencia modos de estabilización que aplican un injerto de moléculas en la superficie de las partículas, con el objetivo de desplazar el punto isoeléctrico de la dispersión, y por consiguiente el dominio de estabilidad de esta dispersión respecto de la aglomeración interparticular.

- 25 El "punto isoeléctrico" de las partículas de un ferrofluido al cual se hace referencia en la presente descripción designa el valor del pH de la dispersión para la cual la o las cargas superficiales llevada por dichas partículas se compensan. Este punto isoeléctrico (o PIE) se puede determinar en particular por zetametria, a saber midiendo el potencia zeta de una dispersión de las partículas a diferentes valores de pH, por ejemplo según el procedimiento descrito por R.J. Hunter en Zeta Potential in Colloid Science, Principles and Applications, Academic Press, Londres (1986).

- 30 De manera general, un ferrofluido es estable respecto de la aglomeración interparticular en los dominios de pH alejados del PIE, mientras que a pH del orden del PIE, el ferrofluido se vuelve inestable. La zona de inestabilidad puede ser más o menos estrecha alrededor del valor de PIE, variando la extensión de esta zona en particular en función de la dimensión de las partículas del ferrofluido y del número de sitios cargados de superficie. De este modo, en general, la extensión de la zona de inestabilidad decrece con la dimensión de las partículas. En la mayoría de los casos, un ferrofluido es estable a valores de pH inferiores a (PIE-2) (y superiores a (PIE+2)) pero la zona de estabilidad del ferrofluido puede sin embargo variar de manera más o menos importante. En todo caso, un ferrofluido
- 35 pierde su estabilidad a un pH próximo al PIE. Para obtener ferrofluidos estables en medio neutro, se ha buscado por lo tanto la obtención de ferrofluidos con un PIE lo más alejado posible del valor de 7. En este marco, se han descrito en particular composiciones de ferrofluidos estabilizadas en medio neutro, que presentan una superficie modificada por especies aminadas, obtenidas por injerto de moléculas tales como aminosilanos.

- 40 La patente US 5.776.360 describe dispersiones acuosas que comprenden partículas magnéticas a base de óxido de hierro con un diámetro de 1 a 10 nm cuya superficie se funcionaliza mediante grupos silano, que están ligados de manera covalente. Esta patente no menciona el punto isoeléctrico de las partículas divulgadas.

- 45 Sin embargo, los procedimientos desarrollados con este objetivo conducen, la mayoría de las veces, a procesos de aglomeración de las partículas en el transcurso del injerto, y permiten de este modo únicamente la obtención de agregados particulares injertados en superficie. A título de procedimiento de este tipo, que lleva a la obtención de partículas de dimensión importante, se puede por ejemplo mencionar el procedimiento descrito en particular por Whitehead et al. En la patente US 4.695.393.

- 50 Para evitar el fenómeno de agregación interparticular en el transcurso del injerto por especies de tipo aminosilano, se ha propuesto conducir la reacción de injerto sometiendo el medio de reacción a un tratamiento por ultrasonidos (sonicación), con el objetivo de obtener una dispersión de las partículas de óxido en el seno del medio donde se realiza el injerto. A este respecto, se podrá en particular referirse al artículo de Lesniak et al. En Mat. Res. Soc. Symp. Proc., 432, 169-174, (1997). En estos procedimientos, se preconiza la conducción de la sonicación en las condiciones más pronunciadas posibles, para de este modo poder obtener un injerto óptimo. En estas condiciones, este tipo de procedimiento puede conducir a la obtención de partícula de dimensión reducida y donde las partículas
- 55 pueden tener un PIE que puede alcanzar valores del orden de 9,5 lo cual permite considerar su aplicación hasta un pH del orden de 7,5.

Ahora bien, contra todo pronóstico, los inventores han descubierto ahora que es posible realizar un injerto de partículas a base de un óxido de hierro que lleva a la obtención de partículas de dimensión reducida, sin tener para ello que realizar la sonicación pronunciada enseñada por el estado de la técnica, bajo reserva de realizar este injerto sobre partículas a base de un óxido de hierro en forma de una dispersión coloidal estable de partículas, y realizando el tratamiento de superficie en las condiciones de estabilidad de la dispersión coloidal (a saber, evitando la floculación o la agregación de las partículas). En este marco, los inventores han puesto de manifiesto que el diámetro hidrodinámico de las partículas injertadas obtenidas es sensiblemente igual (incluso idéntico, la mayoría de las veces) al diámetro hidrodinámico de las partículas de la dispersión coloidal de partida.

De manera aun más sorprendente, los trabajos de los inventores han permitido además establecer que el injerto realizado en partículas a base de óxido de hierro mantenidas en forma de una dispersión coloidal en el transcurso del injerto permite obtener partículas que tienen un punto isoeléctrico superior al de las partículas obtenidas por los procedimientos actualmente conocidos que aplican un injerto bajo sonicación. A este respecto, sin vinculación con una teoría particular, parece que, de manera totalmente inesperada, la aplicación de una dispersión coloidal estable como tal, más que una dispersión de partículas mantenidas en dispersión bajo sonicación, conduce a un injerto más homogéneo de las partículas, lo cual hace que las partículas obtenidas sean más estables en medio neutro.

De manera aun más inesperada, los inventores han descubierto igualmente en el transcurso de sus trabajos que el injerto de compuestos tales como aminosilanos sobre las partículas de óxido de un ferrofluido mejora de manera sensible la estabilidad térmica de las partículas, et esto particularmente en el caso en el que las partículas son partículas de maghemita, lo cual puede en particular revelarse interesante para su utilización en la realización de materiales compuestos o de las cerámicas que poseen propiedades magnéticas a alta temperatura.

Se verifica además que la modificación de superficie tal como se ha aplicado por los inventores permite obtener partículas injertadas en superficie por grupos aminados, mediante los cuales especies químicas, en particular macromoléculas, se pueden inmovilizar en la superficie de las partículas injertadas. En particular, la modificación de superficie realizada por los inventores permite la inmovilización de las moléculas de polisacárido, y en particular de moléculas de dextrano, mediante el establecimiento de enlaces covalentes entre los polisacáridos y los grupos aminados.

En este marco específico, los trabajos de los inventores han permitido poner de manifiesto que, de manera sorprendente, el injerto de macromoléculas tales como polisacáridos sobre los grupos aminados se puede efectuar conversando una población de partículas esencialmente individualizadas, y conservando, además, un diámetro hidrodinámico bajo, típicamente inferior a 50 nm, y la mayoría de las veces inferior a 40 nm.

Esta posibilidad de obtener partículas magnéticas que (i) poseen un diámetro hidrodinámico reducido y (ii) se injertan en superficie por macromoléculas de tipo polisacáridos (dextrano en particular) que están enlazadas de manera covalente, presenta un gran interés, en particular para la realización de composiciones para una administración en el animal o el ser humano, y en particular para la realización de composiciones de agente de contraste para la formación de imágenes por resonancias magnética (IRM)

En efecto las dispersiones de partículas así obtenidas constituyen una alternativa particularmente interesante a las dispersiones de partículas magnéticas actualmente utilizadas en particular a título de agentes de contraste para la IRM *in vivo*

Actualmente, las dispersiones de partículas magnéticas destinadas a una administración *in vivo* son en efecto partículas que presentan un diámetro hidrodinámico lo menor posible, típicamente inferior a 100 nm, (en particular para garantizar una buena difusión tisular), y por lo tanto la superficie está recubierta por macromoléculas hidrófilas tales como el dextrano generalmente adsorbido en la superficie. Este revestimiento de la superficie de las partículas se efectúa en particular para hacer que la superficie de las partículas sea hidrófila y eléctricamente neutra, para retardar la detección de las partículas por el sistema inmunitario (es decir aumentar la semivida de las partículas *in vivo* y retardar su eliminación por ejemplo al nivel del hígado)

Estas partículas revestidas por moléculas de tipo dextrano del estado de la técnica, tienen en general, una dimensión relativamente importante, en particular debido al hecho de que el revestimiento de extraño se efectúa en condiciones que conducen la mayoría de las veces a una aglomeración de varias partículas magnéticas, rodeadas por una capa de dextrano. Se consigue sin embargo realizar, en algunas condiciones de síntesis, tales como las descritas por ejemplo en el documento US 4.452.773, partículas de dimensión relativamente reducida, típicamente del orden de 50 nm, que se designan generalmente por el término "USPO" del inglés "Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxides") o también "MION" del inglés "Microcrystalline Iron Oxide Nanoparticles"). Sin embargo, sea cual sea su dimensión, las partículas magnéticas revestidas de macromoléculas de tipo dextrano actualmente conocidas conducen la mayoría de las veces a fenómenos de depleción de dextrano cuando se administran *in vivo*, lo cual reduce su tiempo de permanencia en los organismos donde se introducen.

Por el contrario, las dispersiones de partículas magnéticas injertadas en superficie por macromoléculas de tipo dextrano que han sido puestas a punto por los inventores no presentan tales inconvenientes, en la medida en que las macromoléculas de tipo dextrano están enlazadas de manera covalente a la superficie de estas partículas, lo

cual permite evitar los fenómenos de depleción observados con los ferrofluidos de tipo "USPIO" o "MION" mencionados anteriormente.

5 Además, los trabajos efectuados por los inventores han permitido poner de manifiesto que, contrariamente a las partículas de los ferrofluidos de tipo "USPIO" o "MION", las partículas de superficie modificadas por macromoléculas de tipo polisacáridos enlazado de manera covalente que han sido descubiertas por los inventores se pueden funcionalizar, por ejemplo por moléculas de interés biológico (por ejemplo moléculas de efectores para la focalización en células u órganos específicos, o también en principios activos u oligonucleótidos), y esto, sin aumentar de manera considerable el diámetro hidrodinámico de las partículas, y conservando asimismo, la mayoría de las veces, una población de partículas esencialmente individualizadas.

10 Sobre la base de estos descubrimientos, la presente invención tiene en particular por objetivo proporcionar ferrofluidos acuosos, que presenten una dimensión muy reducida de partículas, y que sean estables en medio neutro, y en particular en medio fisiológico. De manera más específica, la invención tiene muy particularmente por objetivo proporcionar ferrofluidos estables hasta un pH 8, y en particular estable en el intervalo de pH de 6 a 8.

15 De manera general, la presente invención apunta asimismo a proporcionar un procedimiento que permite desplazar el dominio de estabilidad de un ferrofluido coloidal en un intervalo de pH que llega a 8, comprendiendo el pH de los medios fisiológicos, sin modificar las propiedades magnetoreológicas de este ferrofluido, y en particular conservando esencialmente sus propiedades magnéticas y el diámetro hidrodinámico de las partículas.

20 Otro objetivo de la invención es proporcionar ferrofluidos acuosos, que presentan una tasa reducida de aglomeración interparticular en medio neutro, y en los cuales las partículas se pueden injertar por especies químicas, tales como macromoléculas, sin conducir a fenómenos de agregación interparticular. En este marco, la invención se fija más específicamente como objetivo proporcionar ferrofluido que comprenden partículas modificadas en superficie por moléculas hidrófilas de tipo polisacárido, en particular por moléculas de dextrano, administrables *in vivo*, y cuyas partículas tienen un tiempo de permanencia elevado en el seno de los organismos en los que están introducidas.

25 La invención se fija igualmente por objetivo proporcionar dispersiones de partículas magnéticas de diámetro hidrodinámico reducido, administrables *in vivo*, en particular por vía de inyección, adaptadas para permitir una focalización en células u órganos específicos, confines diagnósticos (composición de agentes de contraste bioespecíficos para IRM, en particular) o confines terapéuticas (vectorización dirigida de principios activos, en particular de medicamentos por ejemplo).

30 De este modo, según un primer aspecto, la presente invención tiene por objeto una dispersión acuosa, designada en lo sucesivo como "ferrofluido aminado", que comprende partículas (p) a base de un óxido de hierro magnético, de dimensiones inferiores o iguales a 20 nm, cuya superficie está modificada por el injerto de grupo aminados R, enlazados de manera covalente a la superficie de dichas partículas, en la cual el punto isoeléctrico de las partículas de superficie así modificado es superior o igual a 10.

35 Por "dispersión acuosa de partículas" se entiende, en el sentido de la presente descripción, una dispersión de partículas en el seno de un medio de naturaleza acuosa, tal como agua, una solución acuosa, o bien también una mezcla agua/alcohol.

40 El ferrofluido aminado de la invención presenta, la mayoría de las veces, características magnéticas y reológicas similares a las de los ferrofluidos acuosos del estado de la técnica que están constituidos exclusivamente por partículas a base de óxido de hierro dispersas en el seno de un medio acuoso (ferrofluidos "no injertados"). De este modo, la dimensión y la morfología de las partículas presentes son en general, similares, así como las propiedades del fluido bajo sollicitación magnética. Sin embargo, a diferencia de los ferrofluidos de tipo "no injertados", los ferrofluidos aminados de la invención presentan, además, la ventaja de poseer un punto isoeléctrico superior a 10, siendo este punto isoeléctrico, la mayoría de las veces, superior o igual a 10,1, y ventajosamente superior o igual a 10,2, incluso superior a 10,3, siendo este punto isoeléctrico en general inferior o igual a 11, y la mayoría de las veces inferior o igual a 10,5. De este modo, las partículas (p) de superficie modificada presentes en un ferrofluido según la invención son en general estables respecto de la aglomeración interparticular en medios que tienen un pH inferior a 8, y por lo tanto en particular en medio neutro, y en particular a pH comprendidos entre 6 y 8, por ejemplo en medio fisiológico, dominio donde los ferrofluidos "no injertados" presentan una clara tendencia a la floculación.

45 Preferiblemente, un ferrofluido aminado según la invención se presenta en forma de una dispersión acuosa que tiene un pH inferior o igual a 8. En su caso, el ferrofluido aminado de la invención se presenta la mayoría de las veces en forma de una dispersión de partículas, con un diámetro hidrodinámico medio inferior o igual a 20 nm. En particular, cuando las partículas (p) son de dimensiones suficientemente reducidas, típicamente entre 5 y 7,5 nm, un ferrofluido aminado según la invención de pH inferior o igual a 8 se presenta en general en forma de una dispersión coloidal estable de partículas esencialmente individualizadas.

55 De este modo, la mayoría de las veces, en un ferrofluido aminado según la invención, al menos el 95% de las partículas presentes, y preferiblemente al menos el 98% de las partículas presentes son partículas individualizadas, es decir no aglomeradas con una u otras varias partículas. Dicho de otro modo, un ferrofluido aminado según la invención presenta en general una tasa extremadamente reducida de agregados interparticulares. De este modo, en

general, en un ferrofluido aminado según la invención, como máximo 5 (y preferiblemente como máximo 2) elementos sólidos en suspensión de 100 están en forma de agregados de partículas. En general, en un ferrofluido aminado según la invención, no se observan agregados interparticulares de dimensión superior a 30 nm.

5 El "diámetro hidrodinámico medio" al cual se hace referencia en el presente documento es el diámetro hidrodinámico medio en número tal como se mide mediante espectroscopia de correlación de fotones, por ejemplo por un aparato de Zetasizer tal como, en particular el Zetasizer 3000 HS comercializado por Malvern Instruments. Este procedimiento de medición aplica en general una electroforesis capilar asociada a un análisis por interferometría láser de efecto Doppler. Fotografías realizadas en microscopia electrónica de transmisión confirman en general este diámetro hidrodinámico medio, al igual que mediciones realizadas con difracción de rayos X. En general, el diámetro hidrodinámico medio de las partículas injertadas en las dispersiones según la invención está comprendida entre 3 y 15 nm. Puede ser ventajoso en particular cuando se considera una utilización de los ferrofluidos aminados de la invención para la preparación de composición para una administración *in vivo*, en particular por inyección, que este diámetro hidrodinámico sea inferior a 12 nm, ventajosamente inferior a 10 nm, y más preferiblemente a 8 nm.

15 Las partículas (p) a base de un óxido de hierro magnético que están presentes en el seno de una composición según la invención, son de manera general, partículas constituidas, total o parcialmente, por un óxido de hierro que presenta propiedades magnéticas, y preferiblemente propiedades ferromagnéticas. En estas partículas la cantidad de óxido de hierro magnético, y preferiblemente al menos el 50% en masa, ventajosamente al menos el 60% en masa y aun más preferiblemente al menos el 90% en masa de la masa total de los compuestos inorgánicos presentes en las partículas, estando estas partículas preferiblemente esencialmente constituidas por uno o varios óxidos de hierro, y estando el óxido de hierro, en todos los casos presente al menos al nivel de la superficie de las partículas (p). Preferiblemente, el óxido de hierro magnético constitutivo de las partículas (p) de la dispersión acuosa de la invención se elige entre las ferritas de fórmula MFe_2O_4 (con $M = CO, Ni, Cd, Mn, Zn$ o Mg), la magnetita Fe_3O_4 , la maghemita ($Fe_2O_3-\gamma$) o las mezclas de estos óxidos.

25 Según una realización preferida de la invención, las partículas (p) están esencialmente constituidas por la magnetita (Fe_3O_4) y/o maghemita ($Fe_2O_3-\gamma$), y ventajosamente están constituidas esencialmente por maghemita.

De este modo, se prefiere que las partículas (p) de la invención estén constituidas al menos a razón del 95% en masa y ventajosamente al menos a razón del 98% en masa de una ferrita, una maghemita y/o de una magnetita.

30 Sea cual sea su naturaleza exacta, se prefiere que las partículas (p) sean partículas de naturaleza cristalina. Ventajosamente las partículas (p) están al menos parcialmente (y preferiblemente para lo esencial) monocristales de óxido de hierro, ventajosamente monocristales de magnetita o de maghemita.

Por otra parte, de manera características, en una dispersión acuosa de partículas magnéticas según la invención, las partículas (p) se injertan en superficie por grupos aminados R, incluyendo cada uno de estos grupos R en general un grupo amina primaria $-NH_2$. La mayoría de las veces, estos grupos se presentan la mayoría de las veces bajo una forma protonada. Estos grupos aminados R, enlazados de manera covalente a la partícula, son ventajosamente grupos de fórmula $-(A)-NH_2$, en la cual el grupo $-(A)-$ designa una cadena hidrocarbonada, que incluye entre 1 y 12 y preferiblemente como mucho 8 átomos de carbono, estando esta cadena eventualmente interrumpida por uno o más grupos $-NH-$, en su caso generalmente por 1 a 3 grupos $-NH-$. La mayoría de las veces, en el grupo R, se prefiere que el grupo $-(A)-$ designe una cadena lineal. Por otra parte, el grupo $-(A)-$ es ventajosamente una cadena hidrocarbonada saturada. Según una variante considerable, el grupo $-(A)-$ puede sin embargo comprender un núcleo aromático.

De manera particularmente ventajosa, los grupos aminados R enlazados de manera covalente a la superficie de las partículas (p) de una dispersión según la invención se eligen entre:

- 45 (i) los grupos de fórmula $-(CH_2)_{n_1}-NH_2$, en la que $n_1 = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ o 8 , siendo n_1 preferiblemente igual a 3, 4, 5 o 6, y ventajosamente igual a 3.
- (ii) Los grupos de fórmula $-(CH_2)_{n_2}-NH-(CH_2)_{n_2'}-NH_2$, en la que n_2 y n_2' son idénticos o diferentes y designan cada uno 1,2,3,4,5 o 6, preferiblemente 1, 2 o 3 y ventajosamente 2, entendiéndose que $(n_2 + n_2')$ sigue incluido entre 2 y 9.;
- 50 (iii) Los grupos de fórmula $-(CH_2)_{n_3}-NH-(CH_2)_{n_3'}-NH-(CH_2)_{n_3''}-NH_2$, donde n_3, n_3' y n_3'' son idénticos o diferentes y designan cada uno 1,2,3 o 4, preferiblemente 1,2 o 3, y ventajosamente 2, entendiéndose que $(n_3 + n_3' + n_3'')$ sigue incluido entre 3 y 12.

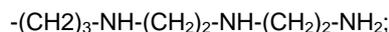
A título de ejemplo, el grupo R puede representar un grupo elegido entre los siguientes grupos:

$-(CH_2)_3-NH_2$;

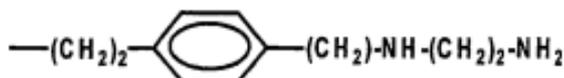
$-(CH_2)_4-NH_2$;

$-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_2-NH_2$;

55 $-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_6-NH_2$;

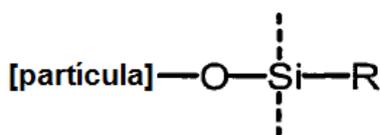


o



5

Sea cual sea su naturaleza exacta, los grupos aminados R son, de manera características, grupos enlazados a las partículas (p) mediante un enlace covalente. La mayoría de las veces, este enlace covalente está garantizado mediante un átomo de silicio, según la siguiente estructura esquemática:



10 Dicho de otro modo, los grupos R presentes en la superficie de las partículas (p) se obtienen generalmente por reacción de un silano portador del grupo R en las partículas (p) a base de óxido de hierro magnético.

En general, la cantidad media de grupos R enlazados de manera covalente a la superficie de las partículas (p) es al menos igual a 2 micromoles por m^2 ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$) y está la mayoría de las veces comprendida entre 3 y 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, entendiéndose que es preferible que permanezca superior a 4 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$. En general esta cantidad permanece inferior a 8 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$.

15

Cabe resaltar que una dispersión según la invención puede comprender partículas injertadas en un número relativamente importante. De este modo, se puede considerar para una dispersión según la invención, concentraciones en partículas (p) superiores a 30 gramos de óxido de hierro por litro, incluso superior a 100 g/l e incluso en algunos casos superiores a 500 g/l. De este modo, típicamente, el ferrofluido aminado según la invención puede comprender partículas (p) a razón de 50 a 600 gramos de óxido de hierro. Teniendo en cuenta la posibilidad de aplicación de tales concentraciones, las dispersiones según la invención pueden en particular revelarse particularmente útiles a título de ferrofluido de comportamiento superparamagnético. En su caso, las partículas (p) son preferiblemente partículas monocristalinas, preferiblemente partículas "monodominio" de maghemita.

20

Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de los ferrofluidos aminados tales como se han descrito anteriormente.

25

Este procedimiento se caracteriza porque comprende las etapas consistentes en:

(A) proporcionar una dispersión acuosa ácida de partículas (P_0) a base de un óxido de hierro magnético de dimensiones inferiores a 20 nm, presentando dicha dispersión, en medio ácido, una estabilidad coloidal al menos en un intervalo de pH, siendo esta estabilidad tal que, en dicho intervalo de pH, se observa, sin tener que mantener una agitación, una dispersión de partículas esencialmente individualizadas con un diámetro hidrodinámico medio inferior a 20 nm;

30

(B) poner en contacto la dispersión coloidal ácida de la etapa (A) con silanos de fórmula $\text{R-SiX}_1\text{X}_2\text{X}_3$, en la cual:

35

- R designa un grupo aminado tal como se ha definido anteriormente;
- X_1 , X_2 y X_3 son grupos idénticos o diferentes, que designan cada uno un grupo hidrolizable en medio ácido,

Efectuándose esta puesta en contacto manteniendo el medio en el intervalo de pH en el que la estabilidad coloidal de la dispersión está garantizada, por lo que se obtiene, por hidrólisis de los grupos X_1 , X_2 y X_3 , la formación de silanoles en el medio de dispersión de las partículas;

40

(C) añadirá al medio de reacción un agente humectante hidrosoluble de temperatura de ebullición superior a la del agua, y a continuación calentar el medio de reacción a una temperatura suficiente para eliminar el agua sin eliminar el agente humectante, por lo que se obtiene una condensación de los silanoles en la superficie de las partículas, evitando la aglomeración de las partículas (que permanecen dispersa en el agente humectante); y

45

(D) recuperar las partículas obtenidas tras la etapa (C) y dispersarlas en medio acuoso, por lo que se obtiene un ferrofluido aminado según la invención.

5 Se constata en la práctica que el diámetro hidrodinámico de las partículas presentes y las propiedades magnéticas de los ferrofluidos aminados obtenidas tras la etapa (D) son extremadamente similares, incluso idénticas, a las de la dispersión acuosa coloidal ácida proporcionada en la etapa (A). De este modo, las propiedades magnetoreológicas de la dispersión obtenida tras el procedimiento de preparación de la invención están en general totalmente determinadas por las de las dispersiones acuosas coloidales ácidas aplicadas en la etapa (A).

10 Las dispersiones acuosas coloidales ácidas aplicadas en la etapa (A) son dispersiones acuosas coloidales de partículas a base de óxido de hierro de pH generalmente inferior a 5, la mayoría de las veces de pH comprendido entre 2 y 4, y ventajosamente inferior a 3. Preferiblemente, la dispersión acuosa ácida coloidal de la etapa (A), es tal que, en el intervalo de pH en el que la estabilidad coloidal está garantizada, el diámetro hidrodinámico medio de las partículas observadas en suspensión está comprendido entre 3 y 15 nm, pudiendo este diámetro en algunos casos ser inferior o igual a 12 nm, incluso inferior o igual a 10 nm, o bien, en algunos casos particulares, inferior o igual a 8 nm.

15 Asimismo, se prefiere que, en el intervalo de pH en el que la estabilidad coloidal está garantizada, menos del 5% en número, ventajosamente menos del 2%, y preferiblemente menos del 1% en número de las especies sólidas observadas en suspensión sean aglomerados de varias partículas.

20 De manera general, la dispersión acuosa ácida de la etapa (A) se puede de este modo elegir entre la mayoría de los "ferrofluidos ácidos" acuosos estabilizados conocidos del estado de la técnica que presentan un diámetro hidrodinámico y una estabilidad coloidal adaptada. De este modo, la dispersión coloidal ácida de la etapa (A) puede ser ventajosamente un ferrofluido acuoso ácido de partículas de ferritas, magnetitas y/o maghemitas tal como se obtiene aplicando el procedimiento descrito por Massar et al. Por ejemplo en la patente US 4.329.241 o en IEEE Trans. Magn. MAG-17(2), pp. 1247-1248 (1981).

25 De manera particularmente ventajosa, la dispersión acuosa coloidal ácida de la etapa (A) es una dispersión de partículas de maghemita, preparada según un procedimiento que comprende las etapas consistentes en:

(a1) realizar una coprecipitación de sales ferrosas y férricas, añadiendo una base, preferiblemente en exceso, a una solución acuosa que contiene una mezcla de sales de hierro (II) y de sales de hierro (III), para obtener un floculado de partículas de magnetita;

30 (a2) después de una eventual separación del floculado, por ejemplo por decantación magnética, lo que se revela en general ventajoso), tratar dicho floculado de partículas obtenido con un ácido elegido entre HNO_3 , HCl o CH_3COOH , y ventajosamente por HNO_3 , lo cual permite acidificar la superficie de las partículas y realizar una oxidación superficial de las partículas por solubilización de iones ferrosos.

35 (a3) añadir al medio una solución de una sal férrica, y dejar reaccionar, preferiblemente calentando el medio (ventajosamente, la reacción se realiza llevando el medio a ebullición, obteniéndose una oxidación de las partículas en forma de partículas de maghemita); y

(a4) dispersar el floculado de partículas de maghemita obtenido tras la etapa anterior en medio acuoso, por adición de un ácido elegido entre HNO_3 o HCl_4 .

En su caso, las condiciones aplicadas en la etapa (a1) del procedimiento anterior son preferiblemente las siguientes:

- 40
- sales de hierro II utilizado: cloruro ferroso o sulfato ferroso, y ventajosamente cloruro ferroso;
 - sales de hierro III utilizado: cloruro férrico o nitrato férrico, y ventajosamente cloruro férrico;
 - relación molar Fe(III)/Fe(II) inicial: preferiblemente del orden de 2;
 - base utilizada para la coprecipitación: amoníaco o sosa.

Cuando se utiliza sosa, es preferible que el medio de coprecipitación contenga del nitrato de sodio.

45 De manera más general, cabe señalar que la mayoría de las veces, el tratamiento efectuado en las etapas (B) a (D) del procedimiento de la invención es un tratamiento de superficie que no afecta a la naturaleza fisicoquímica interna de las partículas de la dispersión acuosa coloidal ácida de la etapa (A). Por consiguiente, la naturaleza química de las partículas de la dispersión de la etapa (A) es en general la misma que las de las partículas (p) de la dispersión que se desea obtener tras la etapa (D).

50 Según una realización que se puede revelar ventajosa, las partículas presentes en las dispersiones coloidales ácidas de la etapa (A) presentan una superficie específica BET comprendida entre $50 \text{ m}^2/\text{g}$ y $1000 \text{ m}^2/\text{g}$, estando esta superficie específica preferiblemente comprendida entre 100 y $200 \text{ m}^2/\text{g}$ y ventajosamente del orden de $130 \text{ m}^2/\text{g}$.

La etapa (B) del procedimiento de la invención consiste en poner en contacto la dispersión coloidal de la etapa (A) con silanos que presentan un grupo R aminado, manteniendo las partículas en estado disperso. Esta etapa de puesta en contacto de los silanos y de las partículas en estado disperso se realiza en general por adición de silanos en la suspensión de partícula proporcionada durante la etapa (A), y se deja en general reaccionar el medio obtenido durante una duración de 2 a 15 horas, la mayoría de las veces con agitación. En general, la reacción se realiza a temperatura ambiente.

Los silanos aplicados en la etapa (B) son preferiblemente trialcoxisilanos aminados de fórmula R-Si(-OR')(-OR'')(-OR'''), en la cual:

- R es un grupo aminado tal como se ha definido anteriormente; y
- R', R'' y R''', idénticos o diferente, designan cada uno un grupo alquilo que incluye de 1 a 5 átomos de carbono, designando cada uno de R', R'' y R''' preferiblemente un grupo metilo o un grupo etilo, y ventajosamente un grupo metilo.

De este modo, a título de silanos particularmente ventajosos en la etapa (B), se puede mencionar en particular

- γ -aminopropiltrimetoxisilano $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{-Si-(CH}_2)_3\text{-NH}_2$;
- N- β -aminoetil- γ -aminopropiltrimetoxisilano $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{-Si-(CH}_2)_3\text{-NH-(CH}_2)_2\text{-NH}_2$;
- N'- β -aminoetil-N- β -aminoetil- γ -aminopropiltrimetoxisilano $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{-Si-(CH}_2)_3\text{-NH-(CH}_2)_2\text{-NH-(CH}_2)_2\text{-NH}_2$

Otros silanos considerables en la etapa (B) son:

- 4-aminobutiltrietoxisilano,
- N-(2-aminoetil)-3-aminoisobutilmetildimetoxisilano,
- aminoetilaminometil)feniltrimetoxisilano,
- N-(2-aminoetil)-3-aminopropilinetildimetoxisilano,
- N-(2-aminoetil)-3-aminopropiltrimetoxisilano,
- N-(6-aminohexil)aminopropiltrimetoxisilano,
- m-aminofeniltrimetoxisilano,
- p-aminofeniltrimetoxisilano,
- 3-aminopropilmetilbis(trimetilsiloxi)silano,
- 3-aminopropilmetildietoxisilano,
- 3-aminopropiltriethoxisilano,
- 3-aminopropiltrimetoxisilano.

En general, sea cual sea su naturaleza, los silanos de la etapa (B) se introducen en el medio de la etapa (A) en forma pura, o en forma de una solución en un disolvente orgánico, preferiblemente, en su caso, en un alcohol tal como metanol o etanol y más ventajosamente en el metanol. Cuando los silanos se introducen en solución, la concentración en silano en el disolvente orgánico está ventajosamente comprendida entre el 3 y el 4% en peso.

La cantidad de silano introducida en la etapa (B) se ajusta en general para obtener una cobertura la más completa posible de la superficie de las partículas por los grupos silano A con este fin, se prefiere en general que la cantidad de silanos portadores de los grupos R introducida, trasladados a la superficie total disponible desarrollada por las partículas (p) de la dispersión coloidal ácida de la etapa (A) sea al menos igual a $2,5\mu\text{mol/m}^2$, y preferiblemente al menos igual a $10\mu\text{mol/m}^2$. La superficie total disponible desarrollada por las partículas (p) se calcula multiplicando la masa de las partículas (en gramos) por la superficie específica BET de estas partículas (en m^2/g).

De manera característica, en el procedimiento de la invención, la etapa (B) va seguida de una etapa (C) de deshidratación, efectuada en presencia de un agente humectante. Este tratamiento tiene por objetivo efectuar la deshidratación dejando las partículas en suspensión en el agente humectante, por lo que se obtiene un injerto eficaz de las especies silanoles en la superficie de las partículas de óxido evitando fenómenos de agregación interparticular que serían observados en ausencia de agente humectante. Esta etapa de tratamiento térmico puede ser en particular del tipo de la aplicación en los procedimientos descritos en las patentes US 4.524.088 o US 4.695.393.

Cuando los silanos de la etapa (B) se introducen en solución en undisolvente orgánico, el agente humectante de la etapa (C) es preferiblemente un agente que es soluble en el disolvente orgánico que solubiliza los silanos introducidos en la etapa (B) y que posee una temperatura de ebullición superior a la de dicho disolvente orgánico, y la etapa (C) comprende en general una etapa de calentamiento a una temperatura suficiente para eliminar dicho disolvente orgánico sin eliminar el agente humectante. Esta eliminación del disolvente se puede realizar conjuntamente con la eliminación del agua, o viene por separado, y preferiblemente en su caso previamente a la eliminación del agua.

En todos los casos de figura, un agente humectante particularmente interesante para la aplicación de la etapa (C) es glicerol.

Preferiblemente, sea cual sea la naturaleza del agente humectante, el calentamiento de la etapa (C) se lleva a cabo a vacío, lo cual permite en particular trabajar a temperatura moderada y proteger la capa de injerto en fase de síntesis. De este modo, cuando el calentamiento de la etapa (C) se realiza a vacío, se revela particularmente ventajoso llevar a cabo la deshidratación de la etapa (C) a una temperatura inferior o igual a 130°C, y preferiblemente inferior a 120°C (típicamente del orden de 80 a 100°C). Por otra parte, si la etapa (C) comprende una etapa de eliminación de un disolvente orgánico, esta etapa se realiza preferiblemente a una temperatura la más baja posible, y ventajosamente a una temperatura inferior o igual a 50°C.

Después de la etapa (C), se obtienen partículas de superficie modificada por los grupos R en el seno de un medio esencialmente constituido por el agente humectante (glicerol la mayoría de las veces) y que contiene en general asimismo silanos introducidos durante la etapa (B), que no han reaccionado, y otros eventuales subproductos. La etapa (D) del procedimiento consiste en recuperar las partículas de este medio y a continuación dispersarlas en medio acuoso.

La mayoría de las veces, la etapa (D) comprende un lavado de las partículas obtenidas tras la etapa (C), por ejemplo con acetona o con una mezcla de agua /acetona. En su caso, se tiene cuidado en que no se sequen las partículas durante el lavado., lo cual permite en particular evitar cualquier fenómeno de aglomeración interparticular. El floculado de partículas no secado obtenido tras el lavado se dispersa a continuación en medio acuoso. La ausencia de secado durante el lavado permite una dispersión óptima de las partículas en medio acuoso. Las trazas de disolvente de lavado introducidas en el medio acuoso (en particular trazas de acetona) se pueden eliminar a continuación, por ejemplo por arrastre a vacío.

Ventajosamente, la dispersión de las partículas efectuadas durante la etapa (D) se realiza disponiendo las partículas recuperadas tras la etapa (C) en aguay disminuyendo progresivamente el pH del medio por adición lenta de un ácido tal como ácido nítrico, ácido clorhídrico o ácido perclórico. Preferiblemente se utiliza ácido nítrico. Asimismo, la disminución progresiva del pH se efectúa típicamente en varias etapas, por reducción del pH del medio en una unidad de pH a cada etapa, preferiblemente con agitación moderada. Esta etapa de disminución progresiva del pH, denominada de "*peptización por un ácido*" permite particularmente de preservar correctamente la capa de injerto realizada en la superficie de las partículas. Cuando se utiliza la técnica de peptización mencionada anteriormente, se observa en general una dispersión óptima del floculado introducido en forma de partículas individuales cuando se alcanza un pH del orden de 3. Una vez realizada esta dispersión, el pH se puede modificar en el intervalo de valores de pH inferiores a 8 sin afectar a la estabilidad de la suspensión obtenida. En particular, se puede modificar el pH por adición de una base, por ejemplo sosa o amoníaco, en particular para obtener un ferrofluido aminado estable de pH comprendido entre 6 y 8.

Según otro aspecto, la presente invención tiene por objeto las utilizaciones considerables para los ferrofluidos aminados definidos anteriormente.

Como se ha indicado, los ferrofluidos aminados de la invención presentan características similares a las de los ferrofluidos usuales (dimensión reducida de partículas en particular), pero presentan, además, la ventaja de ser estables en medio neutro, y en particular en el intervalo de pH comprendido entre 6 y 8. De manera general, los ferrofluidos aminados de la invención se pueden utilizar entonces en todos los dominios de aplicación conocidos de los ferrofluidos clásicos, pero su estabilidad en medio neutro los hace adaptados a otros tipos de aplicaciones.

De este modo, teniendo en cuenta su estabilidad, en particular a pH del orden de 7 y en particular en medio fisiológico, los ferrofluidos aminados de la invención se revelan en particular útiles para la preparación de composición de agentes de contraste para la formación de imágenes por resonancia magnética, muy particularmente *in vivo*. En este tipo de aplicación, la dimensión reducida de las partículas modificadas por los grupos aminados R se revela particularmente adaptada a una buena difusión tisular. Además, los inventores han puesto de manifiesto asimismo que la modificación de superficie por los grupos aminados R, efectuada en las condiciones de las etapas (A) y (B), permite asimismo aumentar la estabilidad de los ferrofluidos ácidos iniciales respecto de la presencia de aniones, tales como los aniones de cloruro por ejemplo, que son conocidos como capaces de inducir una pérdida de la estabilidad de los ferrofluidos ácidos, por compensación de las cargas positivas de superficie de las partículas. Esta estabilización en presencia de aniones se revela particularmente ventajosa para aplicaciones *in vivo* donde el ferrofluido es a menudo puesto en contacto con medios salinos.

De este modo, de manera general, los ferrofluidos aminados de la invención se revelan particularmente interesantes para la preparación de composiciones, en particular de uso terapéutico y/o diagnóstico, administrables por vía oral o parenteral en el hombre o el animal, y en particular para la preparación de composiciones inyectables. Las composiciones para una administración en el ser humano los animales obtenidas en este marco, y en particular las composiciones inyectables de agentes de contraste para la creación de imágenes por resonancia magnética, constituyen otro objeto de la invención.

La estabilidad de los ferrofluidos aminados de la invención en toda el intervalo de pH inferior a 8 permite, además, considerar su utilización en otras aplicaciones, y en particular a título de carga magnética en diferentes composiciones o materiales magnéticas, por ejemplo en composiciones o materiales poliméricos (donde las partículas del ferrofluido pueden por ejemplo garantizar una reticulación entre varias moléculas de polímeros), o

también en materiales de tipo cerámico. En este tipo de aplicación, los ferrofluidos aminados de la invención se revelan en particular útiles cuando la preparación de las composiciones o materiales aplica una formulación acuosa. En lo que respecta este tipo de utilización, se recuerda que los ferrofluidos aminados de la invención contienen partículas que se estabilizan térmicamente. En particular, son estables a una temperatura superior a 740K, y en general hasta 1050K. Estas partículas se pueden utilizar a título de cargas magnéticas para la fabricación de materiales magnéticos, en particular cerámicas, que se pueden utilizar a temperaturas superiores a 740K, sin pérdida de sus propiedades magnéticas.

Por otra parte, como se ha indicado, los ferrofluidos aminados de la presente invención contienen partículas (p) en las cuales se enlazan grupos aminados R, que pueden reaccionar con especies químicas, para modificar la química de superficie de las partículas del ferrofluido aminado. De manera sorprendente, los inventores han descubierto que la estabilidad de las partículas de los ferrofluidos aminados de la invención es tal que la modificación de la superficie de las partículas (p) por reacción de especies químicas en los grupos R se puede realizar sin que se observen ningún fenómeno de agregación interparticular. De este modo, los ferrofluidos aminados de la invención se pueden utilizar para la preparación de suspensiones de partículas magnéticas esencialmente individualizadas, en cuya superficie se inmovilizan especies químicas, donde la inmovilización de las especies químicas se realiza estabilizando un enlace, preferiblemente covalente, entre dichas especies y los grupos aminados R presentes en la superficie de las partículas (p) contenidos en los ferrofluidos aminados.

En este marco, la presente invención tiene más específicamente por objeto un procedimiento de modificación de la superficie de las partículas (p) de un ferrofluido aminado según la invención, comprendiendo este procedimiento una etapa (G1) consistente en hacer reaccionar dicho ferrofluido aminado con especies químicas E susceptibles de formar un enlace, preferiblemente covalente, con los grupos aminados R presentes en la superficie de las partículas (p), siendo esta reacción realizada en las condiciones de estabilidad del ferrofluido aminado, a saber, en general a un pH inferior a 8, y preferiblemente a un pH inferior, ventajosamente a un pH inferior o igual a 4, y preferiblemente a un pH inferior o igual a 3.

La naturaleza de las especies E aplicadas en la etapa (G1) puede variar en una medida bastante amplia y es competencia del experto determinar las especies adaptadas a la modificación de superficie de la etapa (G1), en las condiciones de estabilidad del ferrofluido aminado utilizado.

La mayoría de las veces, cuando se aplica la etapa (G1) mencionada anteriormente, se prefiere que los grupos aminados R presentes en las partículas (p) del ferrofluido presenten grupos $-NH_2$. En este caso, las especies químicas E utilizadas en la etapa (G1) presentan preferiblemente grupos aldehído $-CHO$, carboxilo $-COO-$, anhídrido de ácido, isotiocianato $-SCN$, cianato $-CN$, o maleimida.

Ventajosamente, cuando los grupos aminados R representan $-NH_2$, las especies químicas E utilizadas en la etapa (G1) presentan grupos aldehído. En este caso, la reacción de la etapa (G1) consiste en general en hacer reaccionar el ferrofluido aminado con las especies químicas E portadoras de grupos $-CHO$ en presencia de un agente reductor, tal como $NaBH_4$ por ejemplo. Esquemáticamente, la reacción que tiene lugar en la superficie de la partícula se puede entonces representar mediante la siguiente secuencia de reacción:



Según una realización preferida, las especies E aplicadas en la etapa (G1) son moléculas de polisacáridos, y ventajosamente moléculas de dextrano, en las cuales una parte de los grupos $-OH$ se ha oxidado en el grupo $-CHO$. En su caso, la modificación parcial de los grupos $-OH$ en el grupo $-CHO$ se realiza por ejemplo por una oxidación realizada por un oxidante tal como el periodato de sodio $NaIO_4$, en particular según el procedimiento descrito por Molteni en *Methods in Enzymology*,; 112, 285-295, (1985).

Sin embargo se puede considerar la utilización de otras especies E en la etapa (G1). De este modo, las especies E puede por ejemplo ser agentes colorantes, con lo cual las dispersiones obtenidas pueden por ejemplo utilizarse para la realización de composiciones de tinta magnética. Según otra variante considerable, las especies E pueden ser compuestos que presentan una afinidad para un compuesto dado, en cuyo caso las dispersiones obtenidas podrán ser utilizadas para realizar una extracción magnética de dicho compuesto (reacción entre las partículas y el compuesto, y a continuación extracción de las partículas que han reaccionado por un campo magnético). Esta aplicación se podrá aprovechar en particular en procedimientos de purificación, descontaminación (en particular de aguas usadas), o extracción de compuestos de interés.

Las dispersiones acuosas de partículas a base de un óxido de hierro magnético de superficie modificada en cuya superficie se inmovilizan especies químicas E que se pueden obtener según el procedimiento mencionado anteriormente de modificación de los ferrofluidos aminados de la invención, aplicando la etapa (G1), constituyen un objeto específico de la presente invención. Estas composiciones se designarán con el término "ferrofluido aminado modificado" en lo que queda de descripción.

En un "ferrofluido aminado modificado" según la invención, las partículas en presencia están generalmente bien individualizadas. De este modo, la mayoría de las veces, al menos el 90% en número, y preferiblemente al menos el 95% en número de los elementos sólidos contenidos en un ferrofluido aminado modificado según la invención son partículas individualizadas que comprenden un núcleo central único a base de un óxido de hierro magnético, teniendo este núcleo dimensiones inferiores a 20 nm.

La mayoría de las veces, un ferrofluido aminado modificado presenta una estructura extremadamente similar al ferrofluido aminado inicial, con únicamente una modificación de la superficie de las partículas. En particular, cabe resaltar que la etapa (G1) no modifica las partículas a base de óxido de hierro en sí mismas, que son generalmente idénticas a las presentes en el ferrofluido inicial. De este modo, en un ferrofluido aminado modificado según la invención, las partículas a base de óxido de hierro son preferiblemente partículas de maghemita, preferiblemente monocristalinas ("monodominio magnético") que tienen ventajosamente una dimensión inferior a 20 nm, y generalmente comprendida entre 3 y 15 nm.

Los ferrofluidos aminados modificados donde las especies E son polisacáridos en los que una parte de los grupos -OH se ha oxidado en el grupo -CHO constituyen ferrofluidos aminados modificados según la invención particularmente ventajoso. Particularmente interesantes en este marco son los ferrofluidos aminados modificados donde las especies E son moléculas de dextrano en las que una parte de los grupos -OH se ha oxidado en el grupo -CHO.

Los inventores han puesto de manifiesto que estos ferrofluidos aminados modificados particulares presentan las ventajas de los ferrofluidos de tipo "USPIO" (o "MION") actualmente conocidos (a saber una dimensión reducida de partículas y una cobertura de las partículas por polisacáridos) con, además, una ventaja adicional, a saber una inmovilización eficaz de las partículas de polisacáridos en la superficie de las partículas. Esta inmovilización efectiva, que no está garantizada en los ferrofluidos actualmente conocidos, permite (i) aumentar la semivida plasmática de las partículas cuando se administran *in vivo* (la semivida de las partículas, que refleja la duración durante la cual las partículas no son reconocidas y eliminadas por el sistema inmunitario, es en particular dependiente de la estabilidad de la inmovilización de los polisacáridos de tipo dextrano en la superficie de las partículas); y (ii) autorizar un injerto de especies químicas en la capa de cobertura de polisacáridos, sin conducir a fenómenos de depleción de los sacáridos o de aglomeración interparticular.

En lo sucesivo de la descripción, los ferrofluidos aminados modificados donde las especies E son polisacáridos en los que una parte de los grupos -OH se ha oxidado en grupos -CHO, que constituyen una alternativa particularmente ventajosa a los ferrofluidos de tipo "USPIO", se designarán mediante el término "(ferrofluido VUSPIO" (del inglés "Versatile ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxides"). Estos ferrofluidos denominados "VUSPIO" constituyen un objeto particular de la presente invención.

Un ferrofluido "VUSPIO" se presenta en general en forma de una suspensión acuosa de partículas a base de un óxido de hierro magnético, de dimensiones (generalmente inferiores a 20 nm, y típicamente comprendidas entre 3 y 15 nm) en cuya superficie se inmovilizan por enlace covalente moléculas de polisacárido enlazadas a la superficie mediante enlaces covalentes -NH-CH₂. Particularmente interesantes son los ferrofluidos "VUSPIO@" donde las moléculas de polisacáridos son moléculas de dextrano.

La mayoría de las veces, en un ferrofluido "VUSPIO", el diámetro hidrodinámico medio de las partículas de superficie modificada por las moléculas de polisacárido es inferior a 50 nm, y es en general inferior o igual a 40 nm, incluso a 30 nm, en particular cuando las moléculas de polisacárido son moléculas de dextrano.

Por otra parte, es posible, en un ferrofluido "VUSPIO" obtener una tasa muy baja de aglomeración particular extremadamente reducida. De este modo, un ferrofluido "VUSPIO" puede por ejemplo ser como que a título de elementos sólidos en suspensión, contiene en lo esencial (a saber para al menos el 90%, preferiblemente para al menos el 95% y ventajosamente para al menos el 98%) partículas individualizadas que comprenden un núcleo central único, a base de un óxido de hierro, que tiene dimensiones inferiores a 20 nm. Estando este núcleo rodeado por una capa que comprende las moléculas de polisacáridos enlazadas de manera covalente. Esta estructura puede en particular ser observada cuando los polisacáridos son moléculas de dextrano.

De manera más general, un ferrofluido "VUSPIO" puede comprender partículas que comprenden un "núcleo constituido por 1 a 250 partículas inorgánicas, "atrapadas" en una matriz de polisacáridos. El número de partículas atrapadas en la matriz de polisacárido puede sin embargo ser modulado en una medida bastante amplia. Según una realización ventajosa, este número de núcleos es inferior a 100, preferiblemente inferior a 50, y ventajosamente inferior a 10. De manera particularmente ventajosa, este número es inferior a 5 y es particularmente ventajoso que este número sea del orden de 1 a 3. Los ferrofluidos "VUSPIO" donde lo esencial de las partículas están constituidas por un único núcleo rodeado por una matriz de polisacáridos constituyen un objeto particular de la invención.

En un ferrofluido "VUSPIO" según la invención, la relación molar óxido de hierro /polisacárido está preferiblemente comprendida entre 10:90 y 90:10 y ventajosamente entre 30:70 y 40:60, siendo esta relación ventajosamente del orden de 35:65.

Preferiblemente, en un ferrofluido "VUSPIO" según la invención, las partículas de óxido de hierro magnético están sensiblemente constituidas por maghemita ($\text{Fe}_2\text{O}_3\cdot\gamma$). Ventajosamente, estas partículas son monocristalinas ("monodominio magnético"). En particular en este caso, los ferrofluidos "VUSPIO" según la invención se revelan particularmente útiles para la preparación de composiciones de agentes de contraste para la formación de imágenes por resonancia magnética, y en particular para la preparación de composiciones para un administración *in vivo*, en particular por inyección. Las composiciones de agentes de contraste para la formación de imágenes por resonancia magnética que comprenden un ferrofluido "VUSPIO" constituyen otro objeto de la presente invención.

Por otra parte, cabe resaltar que, en un ferrofluido "VUSPIO", una parte de los grupos $-\text{OH}$ de las moléculas de polisacáridos que están inmovilizados en la superficie de las partículas se oxidan en forma de grupos $-\text{CHO}$. En efecto, la mayoría de las veces, una parte sólo de los grupos $-\text{CHO}$ de los polisacáridos oxidados utilizados en la etapa (G1) de modificación de un ferrofluido aminado según la invención forma parte de la reacción con los grupos aminados R. Lo grupos $-\text{CHO}$ residuales son particularmente ventajoso, en la medida en que permiten inmovilizar especies químicas en la superficie de las partículas de los ferrofluidos "VUSPIO". De manera más general, si existen tales grupos residuales $-\text{CHO}$ o no, la estabilidad de los ferrofluidos "VUSPIO" es la mayoría de las veces tal que se puede considerar el injerto de especies químicas en la superficie de las partículas de estos ferrofluidos específicos sin observar ningún fenómeno importante de aglomeración interparticular. Dicho de otro modo, un ferrofluido "VUSPIO" se revela útil para la fabricación de dispersiones de partículas magnéticas individualizadas en cuya superficie se inmovilizan especies químicas F, donde el injerto de las especies químicas se realiza estableciendo un enlace, preferiblemente covalente, entre dichas especies químicas F y las moléculas de polisacárido.

Según un último aspecto, la presente invención tiene por objeto esta utilización particular de los ferrofluidos "VUSPIO", así como las composiciones obtenidas por modificación de la superficie de las partículas de estos ferrofluidos específicos.

En particular, la invención tiene por objeto la utilización de los ferrofluidos "VUSPIO" donde los polisacáridos inmovilizados tiene una parte de sus grupos OH oxidados en forma de grupos $-\text{CHO}$ que se revelan útiles para la fabricación de dispersiones de partículas magnéticas individualizadas, en cuya superficie se inmovilizan especies químicas F, donde la inmovilización de dichas especies F se realiza estableciendo un enlace covalente entre las especies F y los grupos $-\text{CHO}$ presentes en las moléculas de polisacáridos. En su caso, las especies F presentan preferiblemente uno o más grupos NH_2 .

Más específicamente, la invención tiene por objeto un procedimiento de modificación de la superficie de las partículas presentes en un ferrofluido "VUSPIO", que comprende una etapa (G2) consistente en hacer reaccionar dicho ferrofluido "VUSPIO" con especies químicas F susceptibles de formar un enlace, preferiblemente covalente, con las moléculas de polisacárido. En este procedimiento, el ferrofluido "VUSPIO" utilizado es preferiblemente un ferrofluido donde los polisacáridos inmovilizados tienen una parte de sus grupos OH oxidados en forma de grupos $-\text{CHO}$, teniendo las especies químicas F entonces, en general, un grupo $-\text{NH}_2$. En su caso, la etapa (G2) consiste en general en hacer reaccionar el ferrofluido "VUSPIO" con las especies F y a continuación tratar el medio obtenido con un agente reductor, por ejemplo borohidruro de sodio.

Aplicando el procedimiento de modificación mencionado anteriormente, se obtienen dispersiones acuosas de partículas a base de un óxido de hierro magnético en cuya superficie se inmovilizan por enlace covalente moléculas de polisacáridos, ventajosamente moléculas de dextrano, mediante enlaces covalentes de fórmula $-\text{NH}-\text{CH}_2-$, estando estas moléculas de polisacárido ellas mismas enlazadas a especies químicas F, preferiblemente también mediante enlaces covalentes. Estas suspensiones acuosas particulares se designarán en el resto de la descripción con el término de "ferrofluido VUSPIO funcionalizado".

Los ferrofluidos "VUSPIO funcionalizado" según la invención se pueden utilizar en numerosos sectores de aplicación.

De este modo, estos ferrofluidos se pueden utilizar en particular para la preparación de composiciones de agentes de contraste para la formación de imágenes médicas con una afinidad por células, tejidos u órganos dados. En este marco, las especies F se eligen entre especies que presentan una afinidad respecto de las células, los tejidos o los órganos. Para los cuales se busca la especificidad. Las composiciones de agente de contraste para la formación de imágenes médicas que comprenden un ferrofluidos VUSPIO funcionalizado por tales especies F constituyen otro objeto específico de la invención.

Los ferrofluidos "VUSPIO funcionalizados" según la invención se pueden aplicar también para la preparación de composiciones de uso terapéutico. Estas composiciones de uso terapéutico constituyen otro objeto de la presente invención. En este marco, las especies F son (o comprenden) principios activos terapéuticos, en particular activos farmacéuticos o también oligonucleótidos. Estas especies pueden entonces vectorizarse, al nivel de células o de órganos específicos, permitiendo la dimensión reducida del ferrofluido vencer las diferentes barreras fisiológicas.

Además, las composiciones de uso terapéutico a base de ferrofluidos "VUSPIO funcionalizados" según la invención se adaptan para la liberación de principios activos, con un seguimiento de la distribución del principio activo, en particular por IRM. Para aplicaciones de administración de principios activos *in vivo* con un seguimiento de la

distribución, es particularmente ventajoso utilizar ferrofluidos de tipo “VUSPIO funcionalizados” donde las especies F aplicadas comprenden (i) activos terapéuticos, y (ii) marcadores tales como especies fluorocromas. El carácter magnético de estas partículas permite su localización global en el organismo, por ejemplo por IRM, y a continuación se puede efectuar una localización más precisa con la ayuda de los marcadores de tipo fluorocromo, que, por ejemplo, tiñen los tejidos en los que el principio activo es vehiculado, permitiendo una identificación de dichos tejidos.

De manera general, las composiciones de uso terapéutico o de uso diagnóstico (agentes de contraste para formación de imágenes médicas) que comprenden dispersiones según la invención que presentan partículas injertadas por especies de interés diagnóstico o terapéutico, se presentan la mayoría de las veces en forma de composiciones administrables por vía oral o parenteral, y en particular en forma de composiciones inyectables. En este marco, las composiciones según la invención pueden comprender, además de las partículas presentes en dispersión, uno o más aditivos adaptados a la administración considerada, y en particular un vehículo adaptado al modo de administración elegido.

Diferentes ventajas y características de la invención se pondrán de manifiesto de manera más clara a la vista de los ejemplos ilustrativos dados a continuación.

EXEMPLO 1:

Síntesis de dispersiones acuosas de partículas nanométricas de maghemita de superficie modificada por acoplamiento de aminosilanos (ferrofluidos aminados)

1.1. Síntesis de dispersiones acuosas de partículas nanométricas de maghemita (ferrofluidos ácidos)

1.1.1. Dispersión (D1)

Se ha realizado una dispersión acuosa (D1) de partículas nanométricas de maghemita, aplicando las siguientes etapas:

- Formación de partículas de magnetita: se disolvieron 31,41 g (es decir 0,158 mol) de cloruro ferroso en 170 ml de ácido clorhídrico 1,5 M. Se introdujo esta solución en un vaso de laboratorio de 5 l que contiene 85,4 g (es decir 0,316 mol) de cloruro férrico disuelto en 3,5 l de agua. Se realizó una coprecipitación de sales de hierro por adición de 200 ml de una solución de amoníaco 2M, a 25°C con agitación, lo cual condujo a la formación de un precipitado coloidal de magnetita. Las partículas de magnetita obtenidas se dejaron decantar sobre una placa magnética, y a continuación se eliminó el sobrenadante.
- Desorción de contraiones NH_4^+ y oxidación de superficie: el floculado realizado en la etapa anterior se trató durante una duración de 15 minutos con 200 ml de ácido nítrico de concentración 2M. Este tratamiento por ácido nítrico se realizó a la vez para acidificar la superficie de las partículas desorbiendo los contraiones NH_4^+ (floculantes) y sustituyéndolos por iones de nitrato, y para solubilizar los iones ferrosos por oxidación superficial. El floculado se decantó a continuación y el sobrenadante se volvió a eliminar.
- Oxidación del núcleo de las partículas: a continuación se introdujeron 600 ml de una solución acuosa de nitrato férrico de concentración 0,33 M previamente llevada a ebullición. Se dejó reaccionar durante 30 minutos, y a continuación se decantó magnéticamente y se eliminó el sobrenadante. En esta etapa, el aporte de los iones Fe^{3+} en solución provoca la oxidación del Fe^{II} de las partículas, lo cual conduce a la formación de una fase maghemita $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ en el seno de las partículas.
- Peptización: se trató el medio obtenido por 200 ml de ácido nítrico de concentración 2M. Durante esta etapa, los protones aportados por el ácido se adsorben en la superficie de las partículas de óxido por lo que se obtiene una carga superficial que permite una repulsión electrostática interparticular. A continuación se sometió el medio a una decantación magnética, por lo que se obtiene un floculado de partículas de maghemita que se lavó tres veces con acetona. Se tuvo cuidado, durante estos lavados, de no dejar secar el floculado, para evitar la aglomeración de las partículas. A continuación se dispuso el floculado de maghemita así lavado (y no secado) en 500 ml de agua desionizada, por lo que se obtiene una dispersión acuosa de partículas en estado de sol. La acetona residual se eliminó por evaporación a vacío a 40°C. El volumen volvió a ser de un litro añadiendo agua ultrapura a 10 M Ω .

1.1.2. Dispersión (D2)

Se ha realizado una dispersión acuosa (D2) de partículas de maghemita, aplicando las siguientes etapas:

- Formación de partículas de magnetita: se disolvieron 31,41 g (es decir 0,158 mol) de cloruro ferroso en 127,66 ml de nitrato férrico en un vaso de laboratorio de 5 litros que contiene 2,5 litros de una solución acuosa de nitrato de sodio 1M. A continuación se realizó una coprecipitación de sales de hierro por adición una solución de hidróxido de sodio de concentración 5M hasta la obtención de un pH 13,2, lo cual llevó a la formación de un precipitado de magnetita coloidal que se mantuvo con agitación durante 15 minutos. Las partículas de magnetita obtenidas se dejaron decantar sobre una placa magnética, y se eliminó el sobrenadante. El floculado obtenido se lavó a continuación dos veces con 2 litros de agua.

- Desorción de contraiones NH₄⁺ y oxidación de superficie: el floculado realizado en la etapa anterior se trató durante una duración de 15 minutos con 400 ml de ácido nítrico de concentración 2M.
- 5 - Oxidación del núcleo de las partículas: se llevó el medio a ebullición y se introdujeron 600 ml de una solución acuosa de nitrato férrico de concentración igual a 0,33 M. Se dejó reaccionar durante 30 minutos, lo cual condujo a la formación de una fase de maghemita $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ en el seno de las partículas, y a continuación se decantaron magnéticamente las partículas obtenidas y se eliminó el sobrenadante.
- 10 - Peptización: se trató el medio obtenido con 200 ml de ácido nítrico 2M, para obtener una carga superficial que induce una repulsión electrostática interparticular
Se sometió el medio a una decantación magnética, por lo que se obtiene un floculado de partículas de maghemita que se lavó tres veces con acetona, teniendo cuidado de no dejar secar el floculado, a continuación se dispuso el floculado de maghemita así lavado (y no secado) en 500 ml de agua desionizada, por lo que se obtiene una dispersión acuosa de partículas en estado de sol. La acetona residual se eliminó por evaporación a vacío a 40°C. El volumen volvió a ser de un litro añadiendo agua ultrapura a 10 mΩ

1.1.3. Dispersión (D3)

- 20 Se ha realizado una dispersión acuosa (D3) de partículas de maghemita, aplicando las siguientes etapas:
- Formación de partículas de magnetita: se disolvieron 31,41 g (es decir 0,158 mol) de cloruro ferroso en 127,66 ml de nitrato férrico en un vaso de laboratorio de 5 litros que contiene 2,5 litros de una solución acuosa de nitrato de sodio 3M. A continuación se realizó una coprecipitación de sales de hierro por adición de 200 ml de una solución de hidróxido de sodio de concentración 5M hasta la obtención de un pH 13,2, lo cual llevó a la formación de un precipitado de magnetita coloidal que se obtuvo con agitación durante 15 minutos. Las partículas de magnetita obtenidas se dejaron decantar sobre una placa magnética, y a continuación se eliminó el sobrenadante. El floculado obtenido se lavó a continuación dos veces con 2 litros de agua.
 - 25 - Desorción de contraiones NH₄⁺ y oxidación de superficie: el floculado realizado en la etapa anterior se trató durante una duración de 15 minutos con 400 ml de ácido nítrico de concentración 2M.
 - Oxidación del núcleo de las partículas: se llevó el medio a ebullición y se introdujeron 600 ml de una solución acuosa de nitrato férrico de concentración igual a 0,33 M. Se dejó reaccionar durante 30 minutos, lo cual condujo a la formación de una fase de maghemita $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ en el seno de las partículas, y a continuación se decantaron magnéticamente las partículas obtenidas y se eliminó el sobrenadante.
 - 35 - Peptización: se trató el sol obtenido con 200 ml de ácido nítrico 2M. Durante esta etapa, los protones aportados por el ácido se adsorben en la superficie de las partículas de óxido por lo que se obtiene una carga superficial que permite una repulsión.
A continuación se sometió el medio a una decantación magnética, por lo que se obtiene un floculado de partículas de maghemita que se lavó tres veces con acetona. Se tuvo cuidado, durante estos lavados, de no dejar secar el floculado, para evitar la aglomeración de las partículas. A continuación se dispuso el floculado de maghemita así lavado (y no secado) en 500 ml de agua desionizada, por lo que se obtiene una dispersión acuosa de partículas en estado de sol. La acetona residual se eliminó por evaporación a vacío a 40°C. El volumen volvió a ser de un litro añadiendo agua ultrapura a 10 MΩ.

Las caracterizaciones fisicoquímicas de las dispersiones (D1) a (D3) se agrupan en la siguiente tabla 1

50

Tabla 1: características fisicoquímicas de las dispersiones (D1) a (D3)

Dispersión	(D1)	(D2)	(D3)
pH	2,5	2,5	2,5
Concentración en maghemita	28 g/l	28 g/l	28 g/l
Punto isoelectrico	7,3	7,3	7,3
Diámetro hidrodinámico medio en número MET ⁽¹⁾	7,8 nm	4,0 nm	1,5 nm
Diámetro hidrodinámico medio en número PCS ⁽²⁾	8,5 nm	2,9 nm	2 nm
(1) : tal como se ha estimado por microscopia electrónica de transmisión			
(2) : diámetro hidrodinámico medio tal como se ha medido por espectroscopia de correlación de fotones.			

1.2. Modificación de la superficie de las partículas de maghemita en el seno de los ferrofluidos ácidos sintetizados en los ejemplos 1.1.1 a 1.1.3

A partir de los ferrofluidos ácidos estabilizados (D1), (D2) y (D3) sintetizados en las etapas anteriores, se realizaron diferentes dispersiones de partículas de maghemita de superficie modificada (ferrofluidos aminados) denominados (D1a), (D1b), (D1c), (D2a) y (D3a). La modificación de superficie se realizó por diferentes compuestos aminosilanos aplicando el siguiente protocolo general:

- **Reacción de acoplamiento**

Se dispuso un volumen de 200 ml del ferrofluido considerado ((D1), (D2) o (D3), según el caso), de concentración en Fe^{3+} igual a 0,35M, con agitación magnética a una velocidad de 300 revoluciones por minuto. Se añadieron con agitación 100 ml de metanol técnico a este ferrofluido. A continuación se añadió a la mezcla, mantenida con agitación, una solución, en 100 ml de metanol, de una cantidad de compuesto aminosilano correspondiente a 148,3 micromoles de silano por m^2 de superficie desarrollada por las partículas del ferrofluido considerado, a saber 0,1 mol para el ferrofluido (D1), 0,2 mol para (D2) y 0,5 mol para (D3). Se dejó la reacción continuar durante 12 horas.

- **Tratamiento térmico (deshidratación)**

Después de la etapa anterior, se añadieron 200 ml de glicerol y se homogeneizó el medio durante algunos minutos con una agitación de 500 revoluciones por minuto. A continuación se extrajo el metano y el agua con ayuda de un evaporador rotativo (extracción a vacío primario durante una hora a 40°C para el metanol y a continuación a 80°C para el agua).

El medio obtenido se sometió a continuación a un tratamiento térmico a 100°C a vacío primario (bomba de aletas) durante dos horas. A continuación se dejó el medio enfriar hasta la temperatura ambiente.

- **Extracción, lavado**

La mezcla obtenida después del tratamiento térmico (partículas modificadas de maghemita en un medio esencialmente constituido por glicerol, que contienen, además, silano que no ha sido reaccionado) se introdujo en un vaso de laboratorio en el cual se vertieron sucesivamente 100 ml de etanol, y a continuación 200 ml de acetona con agitación lenta (100 revoluciones por minuto) para realizar una floculación de las partículas de maghemita modificadas, así como una precipitación del exceso de silano oligomerizado.

Se realizó una decantación de las partículas en una placa magnética, y se eliminó el sobrenadante que comprendía el silano oligomerizado. El floculado de partículas obtenido se lavó tres veces con 400 ml de mezcla (acetona/agua ultrapura) (70:30 v/v), para eliminar los oligómeros de silano y el glicerol residuales. En este caso, también, los lavados se efectuaron de manera a no dejar secar el floculado.

Peptización:

Después del último lavado de la etapa anterior, se añadieron al floculado 400 ml de agua ultrapura. Entonces se midió el pH igual a 10,4, atestando de la presencia de funciones amina en la superficie de la maghemita, y de la saturación de esta superficie mediante las funciones amina.

A continuación se añadieron al medio, gota a gota, y con agitación elevada (del orden de 700 revoluciones por minuto), ácido nítrico 1M, para hacer disminuir progresivamente el pH, paso a paso, en aproximadamente una unidad de pH a cada etapa. Esta acidificación permite en particular preservar la adhesión de la película de polisiloxano aminado que se ha formado en las etapas anteriores en la superficie de las partículas.

Cuando se alcanzó un pH de 6, las partículas de maghemita comenzaron por dispersarse. Se ajustó el pH del medio en 3 y se dejó el medio con agitación un día. El pH se volvió entonces a reajustar en 3.

En estas condiciones, se realizaron las siguientes 5 dispersiones (ferrofluidos aminados):

Ferrofluido ácido de partida	(D1)	(D1)	(D1)	(D2)	(D3)
Compuesto aminosilano utilizado para la modificación	APS ⁽³⁾⁺	EDPS ⁽⁴⁾	DTPS ⁽⁵⁾	APS	APS
Ferrofluido aminado obtenido	(D1a)	(D1b)	(D1c)	(D2a)	(D3a)
(3): APS : γ -aminopropiltrimetioxisilano					
(4): EDPS: N- β -(aminoetil)- γ -aminopropiltrimetioxisilano					
(5): DTPS: N- β -(aminoetil)-N'- β -(aminoetil)- γ -aminopropiltrimetioxisilano.					

1.3. Propiedades de las dispersiones de partículas de maghemita modificadas (ferrofluidos aminados) obtenidos

Las características de los 5 ferrofluidos aminados obtenidos se agrupan en la siguiente tabla 2.

Tabla 2: Propiedades de los ferrofluidos aminados obtenidos

Ferrofluido aminado	(D1a)	(D1b)	(D1c)	(D2a)	(D3a)
pH	3	3	3	3	3
Concentración en Fe	0,35M	0,35M	0,35M	0,35M	0,35M
Punto isoeléctrico	10,4 ⁽⁶⁾	10,2	10,1	10,4	10,4
Diámetro hidrodinámico medio en número PCS	15,2 nm	7 nm	15,5 nm	6,0 nm	5,7 nm
<i>(6): A título de comparación, se realizó una dispersión modificando la dispersión D1 por APS en las condiciones del protocolo general descrito anteriormente, pero sin aplicar la segunda etapa de tratamiento térmico. El punto isoeléctrico de la composición se midió entonces igual a 8,3.</i>					

EJEMPLO 2: estabilidad respecto de la floculación en presencia de iones de cloruro

5 Para ilustrar la mayor estabilidad de los ferrofluidos aminados de la invención respecto de los ferrofluidos ácidos en lo que se refiere a la floculación, se realizó un test comparativo consistente en introducir iones de cloruro a concentraciones crecientes en el seno de los dos tipos de ferrofluidos.

10 La siguiente tabla 3 muestra la concentración límite de floculación observada a pH = 3, para las dispersiones (D1), (D1a), (D1b) y (D1c) del ejemplo 1. La concentración límite de floculación es la concentración mínima en iones de cloruro en la dispersión, al pH considerado, a partir de la cual se observa un inicio de floculación, a saber un aumento de turbidez, debida a la formación y al aumento de la dimensión de los floculados en el medio. La concentración límite corresponde a la concentración a la cual se observa un aumento de la densidad óptica, medida a una longitud de onda de 800 nm.

Tabla 3: Concentración límite de floculación durante la adición de iones de cloruro

Dispersión	(D1)	(D1a)	D1b)	(D1c)
Concentración límite de floculación (Cl-) ^(*)	0,05 mol/l	0,14 mol/l	0,17 mol/l	0,21 mol/l

15 Se ve, a la vista de los anteriores datos, que la modificación de superficie permite multiplicar al menos por dos la concentración límite de floculación en presencia de iones de cloruro.

EJEMPLO 3: Injerto de moléculas de dextrano (Síntesis de ferrofluidos aminados modificados de tipo "VUSPIO")

20 Se realizó el injerto de moléculas de dextrano en las partículas de los ferrofluidos aminados del ejemplo 1.2. Se ensayaron cuatro clases diferentes de dextrano (Dextrano T5 : $\overline{M}_w = 5000$; Dextrano T15 : $\overline{M}_w = 15000$; Dextrano T40 : $\overline{M}_w = 40000$, y Dextrano T70 : $\overline{M}_w = 70000$).

El injerto se realiza según el siguiente protocolo:

- Activación del dextrano:

25 Se realizó una solución de 10 g de dextrano en 200 ml de agua ultrapura. Se añadieron a este medio 10 ml de una solución acuosa de NaIO4 a 2,06 mol.l⁻¹ y se dejó la mezcla 12 horas con agitación. Tras esta etapa de oxidación, se eliminaron las sales periódicas obtenidas en el medio. Para esto, la solución obtenida, amarilla pálida, se vertió en un tubo de diálisis de celulosa (umbral de corte 12.400 g/mol⁻¹, Aldrich). La diálisis se realizó en un vaso de laboratorio de 5 litros que contiene agua ultrapura. El agua se renovó 5 veces cada dos horas. La solución de extraño activado obtenida se almacenó a 4°C. La presencia de aldehídos se confirmó por el ensayo de Feling.

- Injerto del dextrano activado en las partículas de un ferrofluido aminado

35 Un volumen de 200 ml de la solución de dextrano activado a 10g/l obtenida anteriormente, se vertió en 20 ml de un ferrofluido tal como se obtuvo en el ejemplo 1.2. La mezcla realizada se dejó con agitación durante 24 horas, y a continuación se le añadió 10 ml de una solución de borohidruro de sodio a 0,206 mol.l⁻¹. El medio obtenido se dejó con agitación durante 4 horas a pH = 9.

En todos los casos, se obtuvo un sol estable

- Purificación del sol obtenido por ultrafiltración tangencial:

Se utilizó un sistema de ultrafiltración constituido por una bomba peristáltica (Millipore N80EL005), tubería de silicona y un cartucho (Prep/Scale™-TFF) que contiene una membrana de poli(etersulfona) de umbral de corte igual a 100 kD.

5 El sol se dispuso en el depósito de retenido. Después del paso del sol en la membrana, se vertió 1 litro de agua en el depósito para proceder al lavado. El solo se lavó y neutralizó con 3 litros de agua ultrapura. El sol purificado que se obtuvo está más diluido que el sol inicial ya que el volumen muerto del sistema es de 100 ml aproximadamente. Una parte del producto permanece colmatada en el interior de la membrana. Éste sin embargo se evacúa después de varias horas de lavado. Por evaporación, se concentró la dispersión de partículas a una concentración en Fe^{3+} de 0,08M.

10 La siguiente tabla agrupa los resultados obtenidos por injerto de diferentes dextrans en los ferrofluidos aminados (D1a), (D2a) y (D3a) del ejemplo 1.2. Los diferentes ferrofluidos aminados modificados obtenidos se referencias como (G1) a (G9).

Tabla 4: Ferrofluidos aminados modificados por injerto de dextrans,

Ferrofluidos modificado realizado	Ferrofluido aminado de partida	Dextrano utilizado para el injerto	Diámetro hidrodinámico medio en número (PCS) de las partículas del ferrofluido modificado realizado
(G1)	(D1a)	T70	59,6 nm
(G2)	(D1b)	T70	130 nm
(G3)	(D1c)	T70	130 nm
(G4)	(D1a)	T40	53,7 nm
(G5)	(D1a)	T15	132,8 nm
(G6)	(D2a)	T40	70,8 nm
(G7)	(D2a)	T15	46,7 nm
(G8)	(D2a)	T5	44,9 nm
(G9)	(D3a)	T40	56,5 nm
(G10)	(D3a)	T15	34,0 nm
(G11)	(D3a)	T5	32,3 nm

15 **EJEMPLO 4: Síntesis de ferrofluido "VUSPIO" funcionalizados**

4.1. Injerto de un poli(óxido de etileno) aminotelequélco (diaminado) en las partículas de los ferrofluidos modificados del ejemplo 3.

Se ha realizado el injerto de moléculas de poli(óxido de etileno) diaminado de dextrano en las partículas de los ferrofluidos aminados modificados (G1) a (G3) del ejemplo 3.

20 El injerto se realizó según el siguiente protocolo:

A un volumen de 200 ml del ferrofluido considerado (G1), (G2) o (G3) según el caso), se añadió una solución de 20,5 g de POE diaminado ($M_w = 2000$ g/mol) en 100 ml de agua. A continuación se añadieron al medio 100 ml de una solución acuosa de borohidruro de sodio de concentración igual a 0,206 mol/l. Se dejó reaccionar durante 4 horas a pH 9 y con agitación, y a continuación se eliminó el exceso de POE diaminado, con filtración tangencial contra 5 litros de agua pura. La dispersión de borohidruro y de borato obtenida se concentró por evaporación del agua hasta la obtención de una concentración en Fe^{3+} de 0,08M.

25

La siguiente tabla V presenta los resultados obtenidos en los tres casos

Tabla V: Ferrofluidos modificados por injerto de POE diaminado

Ferrofluidos de partida	Diámetro hidrodinámico medio en número (PCS) de las partículas del ferrofluido realizado
(G1)	59,6 nm
(G2)	53,7 nm
(G3)	132,8 nm

30 **4.2 Injerto de un poli(óxido de etileno) monoaminado en las partículas de ferrofluidos modificadas del ejemplo 3:**

Se realizó un injerto similar al del ejemplo 4 utilizando los ferrofluidos aminados (G5), (G6) y (G9) del ejemplo 3, aplicando para esto el protocolo operativo del ejemplo 4, salvo el hecho de que se utilizó un POE monoaminado (M_w

= 2000 g/mol). Por otra parte, la cantidad de POE se dividió por dos respecto del ejemplo 4. De este modo, la solución de POE añadida contiene 10,25 g de POE monoaminado en 100 ml de agua.

La siguiente Tabla VI agrupa los resultados obtenidos por el injerto de los ferrofluidos aminados D1a, D2a y D3a del ejemplo 1.2.

5 **Tabla VI:** Ferrofluidos modificados por injerto de POE monoaminado

Ferrofluidos de partida	Diámetro hidrodinámico medio en número (PCF) de las partículas del ferrofluido modificado realizadas
(G4)	74,5 nm
(G5)	62,1 nm
(G6)	65,6 nm

4.3. Injerto de las partículas de los ferrofluidos modificados del ejemplo 3 por especies fluorescentes:

10 Se dejó reaccionar durante 24 horas, protegido de la luz, 100 ml de los ferrofluidos modificados del ejemplo 3, de concentración en Fe^{3+} igual a 0,08M, tamponados con un tampón fosfato (pH 7,4; 0,01 M) con 10^{-3} mol de Rodamina B (Rh B) o de Lucifer Yellow (LY) en forma de su sal dilitada. A continuación se efectuó una reducción con borohidruro, en las condiciones del ejemplo 3. Estas especies aminadas reaccionan directamente con las funciones aldehído de los dextranos oxidados. Tras esta reacción, se eliminó el exceso de especies fluorescentes (fluorocromos) por extracción líquido-líquido (agua/cloroformo) hasta que la fase orgánica se vuelva incolora. A continuación se eliminan las trazas de cloroformo con el evaporador rotativo.

4.4 Injerto de las partículas de los ferrofluidos modificados del ejemplo 4.1 por especies fluorescentes:

15 Se efectuó la reacción de acoplamiento en 100 ml de ferrofluidos según el ejemplo 4.1, de concentración en Fe^{3+} igual a 0,08M, tamponado con un tampón carbonato/bicarbonato de sodio (pH 9, 0,01 m) por 10^{-3} moles de TRITC (derivado isotiocianato de tetrametilrodamina) o de (5-FAM, SE) (éster succinimídico de 5-carboxifluoresceína). El (5-FAM, SE) se disolvió previamente en 3 ml de DMF. La eliminación del exceso de las especies fluorescentes se efectuó por extracción líquido-líquido (agua/cloroformo) hasta que la fase orgánica se volvió incolora. Las trazas de cloroformo se eliminaron con el evaporador rotativo.

4.5 Injerto de las partículas de los ferrofluidos modificados del ejemplo 6 por especies fluorescentes:

El modo operativo utilizado es idéntico al del ejemplo 4.4 salvo que el POE diaminado se sustituye por una mezcla de POE monoaminado y de POE diaminado en las proporciones 2:1.

4.6 Injerto de la doxorubicina en las partículas de los ferrofluidos de los ejemplos 4.1 y 4.2:

20 Se añadieron $2,22 \cdot 10^{-4}$ mol de doxorubicina (número de mol equivalente a $1/30^{\text{ésima}}$ de moles de residuos glucosídicos) a la dispersión de partículas nanométricas preparadas en el ejemplo 3 antes de la reducción con borohidruro. A continuación se sigue el modo operativo descrito en el ejemplo 3. Las partículas tratadas con doxorubicina se someten entonces al mismo tratamiento que las procedentes del ejemplo 4.1 o 4.2.

4.7 Injerto del ácido fólico en las partículas de los ferrofluidos del ejemplo 3:

4.7.1 Esterificación del ácido fólico con N.hidroxisuccinimida (NHS):

35 Se disolvieron 5 g de ácido fólico en 100 ml de DMSO. Se añadieron a esta mezcla 2,5 ml de trietilamina y 2,6 g de NHS y 4,7 g de carboimida. Se dejó reaccionar una noche a temperatura ambiente. El coproducto de la reacción, la dicitclohexilurea se extrae por filtración. La solución de ácido fólico acoplada al NHS se concentra con el evaporador a presión reducida. El producto se precipita entonces en dietileter.

4.7.2 Conjugación de POE diaminado con ácido fólico acoplado al NHS:

40 Se disolvieron 15 g de POE diaminado ($M_w = 2000$ g/mol) en 100 ml de una solución tampón carbonato/bicarbonato a pH 10,5. Se disolvieron 4,5 g del producto (ácido fólico-NHS) obtenido tras la etapa 4.7.1 en un mínimo de DMSO (10 ml). Esta solución se vertió entonces gota a gota en la solución que contenía POE diaminado, y se dejó reaccionar durante 12 horas. El producto se dializó entonces contra agua ultrapura en un tubo de diálisis de 1kD de umbral de corte, durante 12 horas, cambiando el agua regularmente.

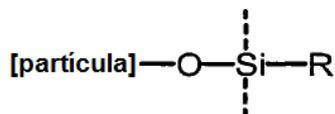
4.7.2 Injerto del conjugado de la etapa 4.7.2 en las partículas del ejemplo 3:

El modo operativo es idéntico al del ejemplo 4.5 sustituyendo el POE monoaminado por el conjugado POE-ácido fólico de la etapa 4.7.2.

45

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Dispersión acuosa que comprende partículas (p) a base de un óxido de hierro magnético, de dimensiones inferiores o iguales a 20 nm, cuya superficie está modificada por el injerto de grupos aminados R enlazados de manera covalente a la superficie de dichas partículas, en la cual el punto isoeléctrico de las partículas de superficie así modificada es superior o igual a 10.
- 2.- Dispersión acuosa según la reivindicación 1, **caracterizada porque** tiene un pH inferior o igual a 8 y **porque** se presenta en forma de una dispersión de partículas con un diámetro hidrodinámico medio inferior o igual a 20 nm.
- 3.- Dispersión acuosa según la reivindicación 2, **caracterizada porque** el diámetro hidrodinámico medio de las partículas (p) está comprendido entre 3 y 15 nm.
- 10 4.- Dispersión acuosa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada porque** las partículas (p) están esencialmente constituidas por maghemita (Fe₂O₃-γ). De preferencia monocristalina.
- 5.- Dispersión acuosa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada porque** los grupos aminados R son grupos de fórmula -(A)-NH₂, en la cual el grupo -(A)- designa una cadena hidrocarbonada, que comprende entre 1 y 12 átomos de carbono, eventualmente interrumpida por uno o más grupos -NH-.
- 15 6.- Dispersión acuosa según la reivindicación 5, **caracterizada porque** los grupos aminados R se eligen entre:
- (i) los grupos de fórmula -(CH₂)_{n₁}-NH₂, en la que n₁ = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8,
 - (ii) Los grupos de fórmula -(CH₂)_{n₂}-NH-(CH₂)_{n₂'}-NH₂, en la que n₂ y n₂' son idénticos o diferentes y designan cada uno 1,2,3,4,5 o 6, entendiéndose que (n₂ + n₂') está comprendido entre 2 y 9;
 - (iii) Los grupos de fórmula -(CH₂)_{n₃}-NH-(CH₂)_{n₃'}-NH-(CH₂)_{n₃''}-NH₂, donde n₃, n₃' y n₃'' son idénticos o diferentes y designan cada uno 1, 2, 3 o 4, entendiéndose que (n₃ + n₃' + n₃'') está comprendido incluido entre 3 y 12.
- 20 7.- Dispersión acuosa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizada porque** los grupos aminados R están enlazados a la superficie de las partículas (p) mediante un enlace



- 25 8.- Procedimiento preparación de una dispersión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende las etapas consistentes en:
- (A) proporcionar una dispersión acuosa ácida de partículas (P₀) a base de un óxido de hierro magnético de dimensiones inferiores a 20 nm, presentando dicha dispersión, en medio ácido, una estabilidad coloidal al menos en un intervalo de pH, siendo esta estabilidad tal que, en dicho intervalo de pH, se observa, sin tener que mantener una agitación, una dispersión de partículas esencialmente individualizadas con un diámetro hidrodinámico medio inferior a 20 nm donde menos del 5% en número de las especies sólidas observadas en suspensión son aglomerados de varias partículas;
- 30 (B) poner en contacto la dispersión coloidal ácida de la etapa (A) con silanos de fórmula R-SiX₁X₂X₃, en la cual:
- 35 - R designa un grupo aminado tal como se ha definido en la reivindicación 1 o en una de las reivindicaciones 5 o 6;
- X₁, X₂ y X₃ son grupos idénticos o diferentes, que designan cada uno un grupo hidrolizable en medio ácido,
- 40 efectuándose esta puesta en contacto manteniendo el medio en el intervalo de pH en el que la estabilidad coloidal de la dispersión está garantizada,
- (C) añadir al medio de reacción un agente humectante hidrosoluble de temperatura de ebullición superior a la del agua, y a continuación calentar el medio de reacción a una temperatura suficiente para eliminar el agua, pero sin eliminar el agente humectante,
- 45 (D) recuperar las partículas obtenidas tras la etapa (C) y dispersarlas en medio acuoso.
- 9.- Procedimiento según la reivindicación 8, **caracterizado porque** la dispersión acuosa coloidal ácida de la etapa (A) es tal que, en el intervalo de pH en el que la estabilidad coloidal está garantizada, el diámetro hidrodinámico medio de las partículas observadas en suspensión está comprendido entre 3 y 15 nm.
- 50

- 10.- Procedimiento según la reivindicación 8 o según la reivindicación 9, **caracterizado porque** la dispersión acuosa ácida coloidal de la etapa (A) es tal que, en el intervalo de pH en el que la estabilidad coloidal está garantizada, menos del 5% en número, de las especies sólidas observadas en suspensión son aglomerados de varias partículas.
- 5 11.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, **caracterizado porque** los silanos aplicados en la etapa (B) son preferiblemente trialcóxisilanos aminados de fórmula $R-Si(OR')(OR'')(OR''')$, en la cual:
- R es un grupo aminado tal como se ha definido en la reivindicación 8; y
 - R', R'' y R''', idénticos o diferente, designan cada uno un grupo alquilo que incluye de 1 a 5 átomos de carbono.
- 10 12.- Procedimiento según la reivindicación 11, **caracterizado porque** los silanos de la etapa (B) se eligen entre:
- γ -aminopropiltrimetoxisilano, de fórmula:
 $(CH_3O)_3-Si-(CH_2)_3-NH_2$;
 - N- β -aminoetil- γ -aminopropiltrimetoxisilano, de fórmula:
 $(CH_3O)_3-Si-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_2-NH_2$;
 - 15 - N'- β -aminoetil-N- β -aminoetil- γ -aminopropiltrimetoxisilano, de fórmula:
 $(CH_3O)_3-Si-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-NH_2$
- 13.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 **caracterizado porque** los silanos de la etapa (B) se introducen en solución en un disolvente orgánico, **porque** el agente humectante de la etapa (C) es soluble en el disolvente orgánico que solubiliza los silanos introducidos en la etapa (B) y posee una temperatura de ebullición superior a la de dicho disolvente orgánico, y **porque** la etapa (C) comprende una etapa de calentamiento a una temperatura suficiente para eliminar dicho disolvente orgánico sin eliminar el agente humectante.
- 20 14.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, **caracterizado porque**, en la etapa (C) el agente humectante es glicerol.
- 15.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, **caracterizado porque**, el calentamiento de la etapa (C) se realiza a vacío.
- 25 16.- Procedimiento según la reivindicación 15, **caracterizado porque** la deshidratación de la etapa (C) se realiza a una temperatura inferior o igual a 130°C.
- 17.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 16, **caracterizado porque**, la etapa (D) comprende un lavado de las partículas obtenidas tras la etapa (C), efectuado sin dejar que se sequen las partículas, seguido de una dispersión del floculado de partículas no secado obtenido en medio acuoso
- 30 18.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 17, **caracterizado porque**, la dispersión de las partículas efectuada durante la etapa (D) se realiza disponiendo las partículas recuperadas tras la etapa (C) en agua y disminuyendo progresivamente el pH del medio por adición lenta de un ácido.
- 19.- Utilización de una dispersión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la preparación de una composición administrable por vía oral o parenteral en el hombre o el animal, y en particular para la preparación de composiciones inyectables de agentes de contraste para la formación de imágenes por resonancia magnética.
- 35 20.- Composición para una administración en el hombre o los animales que comprende una dispersión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 21.- Utilización de una dispersión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, a título de carga magnética en una composición o un material magnético.
- 40 22.- Procedimiento según la reivindicación 8, que comprende, tras las etapas (A), (B), (C) y (D), una etapa (G1) consistente en hacer reaccionar dicha dispersión según una de las reivindicaciones 1 a 7 con especies químicas E susceptibles de formar un enlace con los grupos aminados R presentes en la superficie de las partículas (p), a un pH inferior a 8, por lo que se obtiene una dispersión según la reivindicación 1 modificada en superficie por dichas especies E.
- 45 23.- Procedimiento según la reivindicación 22, **caracterizado porque** las especies E presentan grupos aldehído, porque los grupos aminados R presentan grupos $-NH_2$, y **porque** la etapa (G1) consiste en hacer reaccionar la dispersión según una de las reivindicaciones 1 a 9 con especies químicas E portadoras de grupos $-CHO$ en presencia de un agente reductor.
- 50 24.- Procedimiento según la reivindicación 23, **caracterizado porque** las especies E son moléculas de polisacáridos de los cuales una parte de los grupos $-OH$ se ha oxidado en el grupo $-CHO$.

- 25.- Procedimiento según la reivindicación 24, **caracterizado porque** las especies E son moléculas de dextrano de los cuales una parte de los grupos –OH se ha oxidado en el grupo –CHO.
- 5 26.- Dispersión acuosa según una de las reivindicaciones 1 a 7, en la cual las especies E, que son polisacáridos, por ejemplo moléculas de dextrano, de las cuales una parte de los grupos –OH se ha oxidado en grupos –CHO, se inmovilizan en la superficie modificada de las partículas, siendo dicha dispersión susceptible de obtenerse según el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25.
- 27.- Dispersión según la reivindicación 26, **caracterizada porque** al menos el 90% en número de los elementos sólidos que contiene son partículas individualizadas que comprenden un núcleo central único, a base de un óxido de hierro magnético que tiene dimensiones inferiores a 20 nm.
- 10 28.- Dispersión según la reivindicación 27, que es una dispersión acuosa de partículas a base de un óxido de hierro magnético en cuya superficie están inmovilizadas por enlace covalente, moléculas de polisacárido enlazadas a la superficie, mediante enlaces covalentes de fórmula –NH-CH₂-, siendo dicha suspensión susceptible de obtenerse según el procedimiento de la reivindicación 24.
- 15 29.- Dispersión según la reivindicación 27, que es una dispersión acuosa de partículas a base de un óxido de hierro magnético en cuya superficie están inmovilizadas por enlace covalente moléculas de dextrano, mediante enlaces covalentes –NH-CH₂-, siendo dicha suspensión susceptible de obtenerse según el procedimiento de la reivindicación 25.
- 30.- Dispersión según la reivindicación 28 o según la reivindicación 29, en la cual el diámetro hidrodinámico medio d las partículas de superficie modificada por las moléculas de polisacárido es inferior a 50 nm.
- 20 31.- Dispersión según una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 30, en la cual al menos el 90% de los elementos sólidos en suspensión son partículas individualizadas que comprenden un núcleo central único, a base de un óxido de hierro que tienen dimensiones inferiores a 20 nm, estando este núcleo rodeado por una capa que comprende las moléculas de polisacáridos enlazadas de manera covalente.
- 25 32.- Dispersión según una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 31, en la cual las partículas a base de óxido de hierro magnético están esencialmente constituidas por maghemita (Fe₂O₃-γ).
- 33.- Dispersión según una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 32, en la cual una parte de los grupos –OH de las moléculas de polisacárido inmovilizadas en la superficie de las partículas están oxidadas en forma de grupos –CHO
- 34.- Utilización de una dispersión según una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 33, para la preparación de una composición de agentes de contraste para la formación de imágenes por resonancia magnética.
- 30 35.- Composición de agentes de contraste para la formación de imágenes por resonancia magnética que comprende una dispersión según una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 33.
- 36.- Procedimiento según la reivindicación 24, que comprende una etapa (C2) consistente en hacer reaccionar una dispersión según una de las reivindicaciones 28 a 33 con especies químicas F susceptibles de formar un enlace con las moléculas de polisacárido.
- 35 37.- Procedimiento según la reivindicación 36 en el que la etapa (G2) consiste en hacer reaccionar una dispersión según la reivindicación 33 con especies químicas F que tienen un grupo –NH₂, y en tratar el medio obtenido con un agente reductor.
- 40 38.- Dispersión acuosa de partículas según la reivindicación 26, **caracterizado porque** es a base de un óxido de hierro magnético en cuya superficie se inmovilizan por enlace covalente moléculas de dextrano mediante enlaces covalentes de fórmula –NH-CH₂-, estando estas moléculas de dextrano ellas mismas enlazadas a especies químicas F, siendo esta dispersión susceptible de obtenerse según el procedimiento de las reivindicaciones 36 o 37.
- 39.- Composición de agente de contraste para la formación de imágenes médicas con una afinidad por las células, tejidos u órganos dados, **caracterizada porque** comprende una dispersión según la reivindicación 38 en la cual las especies F son especies que presentan una afinidad respecto de dichas células, dichos tejidos o dichos órganos.
- 45 40.- Composición de uso terapéutico, **caracterizada porque** comprende una dispersión según la reivindicación 38 en la cual las especies F son principios activos terapéuticos.
- 41.- Composición según la reivindicación 39 o según la reivindicación 40, **caracterizada porque** se presenta en forma de una composición inyectable.
- 50 42.- Utilización de una dispersión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la preparación de una suspensión de partículas magnéticas esencialmente individualizadas en cuya superficie son inmovilizadas especies químicas, donde la inmovilización de las especies químicas se realiza estableciendo un enlace entre dichas especies químicas y los grupos aminados R presentes en la superficies de las partículas (p).