

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 089**

51 Int. Cl.:

C07K 14/245 (2006.01)

B82Y 15/00 (2011.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

A61K 49/00 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08784517 .8**

96 Fecha de presentación: **17.06.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2250190**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.11.2010**

54 Título: **Fragmentos de adhesina optimizados y nanopartículas correspondientes**

30 Prioridad:

29.02.2008 EP 08003845

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

04.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

04.12.2012

73 Titular/es:

ENDOSIGNALS IMAGING GMBH (100.0%)
Tucholsky Strasse 36
10117 Berlin, DE

72 Inventor/es:

BLOCK, CHRISTOPH;
MITTMANN, KARIN y
ARNTZ, CLAUDIA

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 392 089 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

Fragmentos de adhesina optimizados y nanopartículas correspondientes.

La invención se refiere a adhesinas optimizadas y nanopartículas a las que se unen dichas adhesinas. La invención se refiere además a proporcionar dichas nanopartículas mediante agentes de contraste *in vivo*, en particular para el diagnóstico de cáncer de intestino.

Para muchas enfermedades, un diagnóstico que sea lo más precoz y significativo posible es de crucial importancia a fin de elegir, coordinar y tomar las medidas médicas necesarias. Esto es especialmente cierto para muchas clases de tumores, para la determinación y para la terapia de la cual (incluyendo posibles secciones) es esencial discriminar tejidos sanos y cancerígenos. Por consiguiente, la recuperación o incluso la supervivencia de un paciente dependen de manera crucial de si el médico a cargo del tratamiento y/o la cirugía es capaz de distinguir diferentes tipos de tejidos, y en qué grado es capaz de distinguirlos.

Para mejorar el diagnóstico y las medidas médicas, se han desarrollado en el pasado agentes de contraste que pueden ayudar a visualizar funciones y estructuras corporales mediante procedimientos por imágenes. Estos procedimientos se utilizan, entre otros, para detectar específicamente alteraciones celulares asociadas a cáncer.

El documento WO 2007/057182 A3, por ejemplo, describe nanopartículas fluorescentes que comprenden por lo menos tres estructuras, a saber, un núcleo inorgánico recubierto con una capa de pasivación que a su vez porta ligandos específicos. Estos ligandos permiten que dicha nanopartícula se una específicamente a una diana. Dicha diana puede consistir específicamente en moléculas superficiales específicas de las células diana, por ejemplo antígenos asociados a tumores.

Las nanopartículas con núcleo y capa de pasivación circundante, que se describen en esta publicación impresa, tienen, un diámetro hidrodinámico pequeño que preferiblemente oscila entre 5 y 15 nm. Las nanopartículas de este tamaño pueden iluminarse mediante los riñones y por lo tanto no se acumulan en el cuerpo o lo hacen solamente en cantidades tolerables. Éste es uno de los requisitos importantes para usar nanopartículas para propósitos médicos.

Otro requisito es la gran especificidad de los ligandos unidos a las nanopartículas que reconocen la estructura diana seleccionada en el cuerpo. Solamente un reconocimiento altamente específico permite la detección que es el propósito principal del uso médico de un agente de contraste. Estos ligandos altamente específicos deben al mismo tiempo ser muy pequeños como para no impedir la buena distribución y penetración de las nanopartículas. Los ligandos específicos frecuentemente empleados, tales como los anticuerpos o fragmentos Fab por lo general son demasiado grandes para satisfacer este requisito.

El número de nuevos casos de cáncer de intestino en países industrializados ha aumentado significativamente en los últimos 30 años. Con una incidencia anual de nuevos casos de 30-35 cada 100 000 habitantes, el cáncer de intestino es uno de los tipos de cáncer más frecuentes en Europa Central, y es responsable de aproximadamente 15% de todas las muertes por cáncer. Se estima que la incidencia mundial es de un millón de casos por año. Los hombres se ven ligeramente más afectados que las mujeres, especialmente con carcinomas rectales (relación de sexo 60:40).

En Alemania, el cáncer de intestino es la segunda forma más frecuente de cáncer, tanto con nuevos casos como con letalidad por cáncer en hombres y mujeres, y más de 20 000 personas murieron en 2005. La "Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister [Sociedad de registros epidemiológicos de cáncer]" incluso asume que hay casi 30 000 casos de letalidad por año.

Cáncer de intestino hace referencia a cualquier tumor maligno de los intestinos. Pueden ser carcinoides, especialmente en el apéndice y el intestino delgado, leiomiomas y tumores estromales gastrointestinales (GIST) que derivan del músculo liso y/o el tejido conjuntivo de la mucosa intestinal. No obstante, estas enfermedades son bastante infrecuentes y representan solamente una pequeña proporción de todos los casos de cáncer de intestino. La proporción más grande de casos de cáncer de intestino (más de 95%) está representada por adenocarcinoma del ciego, colon o recto, para los cuales se utiliza también el término genérico cáncer colorrectal.

El cáncer de intestino, especialmente los carcinomas colorrectales, rara vez causan síntomas inicialmente y casi siempre surgen de pólipos intestinales inicialmente benignos. Las probabilidades de cura con cirugía y quimioterapia subsiguiente con un índice de supervivencia de 5 años, en promedio, de 40 a 60%, dependen crucialmente del estadio en el que se diagnostica el cáncer de intestino. Los cuidados preventivos como también el diagnóstico precoz son, por lo tanto, de particular importancia. Este último sería posible mediante la detección temprana de células intestinales cancerosas, en particular CRC (células colorrectales cancerosas).

La detección de las CRC requiere una diana que sea específica para dichas células y, si es posible, se sobreexpresen en el tumor. Se describe que los miembros de la familia CEACAM (molécula de adhesión celular relacionada con CEA; CEA = antígeno carcinoembrionario) tienen aumento de la expresión en células CRC. Los miembros de la familia CEACAM son en consecuencia particularmente adecuados como dianas para la detección de CRC. Incluyen especialmente CEA (CEACAM5) y NCA (CEACAM6).

La familia CEACAM es un miembro de la superfamilia de Ig. Cada miembro de la familia está altamente glucosilado y consiste en un dominio de tipo variable de Ig N-terminal, en dirección 3' del cual hay hasta 6 dominios IgC2. CEACAM1, CEACAM3 y CEACAM4 se insertan mediante un dominio transmembrana carboxi-terminal y dominio citoplásmico en la membrana celular, mientras que CEA (CEACAM5), CEACAM6 (NCA), CEACAM7 y CEACAM8 se anclan mediante glucosilfosfatidilinositol (GPI) en la membrana. El dominio N-terminal dentro de este grupo tiene más de 90% de similitud en el nivel de los aminoácidos.

CEA y NCA están presentes en el epitelio cilíndrico y en las células caliciformes en tejido de colon. Están ubicados en la superficie apical de enterocitos maduros, es decir, en la región glucocálix/de microvellosidades. CEACAM actúa como moléculas de adhesión intercelular. Esta localización estrictamente apical de CEACAM en células epiteliales de colon normal se ha abandonado en células de adenocarcinoma— las proteínas se expresan por lo tanto en toda la superficie celular. La organización celular y la polaridad celular se han anulado en las células CRC y, en consecuencia, por ejemplo, CEA y/o NCA pueden hallarse en toda la superficie celular. Puede liberarse CEA, ingresando así en el torrente circulatorio, y detectarse como marcador de tumor sérico.

Los ligandos que han sido descritos para estos receptores son, entre otros, adhesinas de la familia Dr de la bacteria *E. coli* (adhesinas Afa/Dr, subfamilia DrCEA). Estas adhesinas se localizan en la superficie bacteriana, parcialmente organizadas en la fimbria de cepas de *E. coli* que se adhieren en forma difusa (DAEC) y median su adhesión a las células epiteliales. Los miembros de esta familia son AfaE-I, AfaE-III, AfaE-V, DraE y DaaE, por ejemplo.

Los genes de ensamblaje estructural que codifican las adhesinas Afa/Dr tienen una organización similar. Consisten en operones que comprenden por lo menos 5 genes (A a E). Los genes A a D codifican aquí genes accesorios, donde el gen D codifica una invasina. El gen E codifica la adhesina real.

Las acumulaciones de genes tienen regiones altamente conservadas, por ejemplo los genes afaA, afaB, afaC, afaD y afaF, tienen función reguladora o de chaperones, por ejemplo. El gen estructural que codifica AfaE es muy heterogéneo, produciendo adhesinas antigénicamente distintas.

Las bacterias de *E. coli* que expresan estos miembros de la familia Afa/Dr de adhesinas se adhieren a células CHO que expresan CEA (Berger et al., *Molecular Microbiology*, (2004) 52(4), pág. 963-983, "Differential recognition of members of the carcinoembryonic antigen family by Afa/Dr adhesins of diffusely adhering *Escherichia coli* (Afa/Dr DAEC)"). Asimismo, las adhesinas también se describen en Alain L. Servin (*Clinical Microbiology Reviews* (Abril 2005) 18(2), pág. 264-292, "Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli*").

No obstante, estas adhesinas conocidas son incluso insatisfactorias con respecto a su afinidad hacia CEA. Es por lo tanto un objeto de la presente invención proveer adhesinas o fragmentos de adhesina ("constructos de adhesina") que tengan gran afinidad hacia las células CRC. Para este propósito, deben tener una mejor afinidad hacia CEA que las adhesinas de tipo natural conocidas, si es posible.

Es además un objetivo de la presente invención proveer adhesinas y/o fragmentos de adhesina que sean adecuados para unirse como ligando a una nanopartícula que puede utilizarse para proporcionar un agente de contraste. Dicha nanopartícula debe ser utilizable preferiblemente en el entorno médico, con particular preferencia como un agente de contraste *in vivo*.

Este objeto se logra proporcionando adhesinas o fragmentos de adhesina que han sido modificados por una mutación en comparación con la respectiva secuencia de aminoácidos de adhesina del tipo natural, preferiblemente la secuencia de tipo natural DraE. La modificación ventajosamente produce una mejor afinidad de las adhesinas de la invención hacia miembros de la familia CEACAM, en particular hacia CEA y/o NCA. Las adhesinas y los fragmentos de adhesina de la invención también se denominarán genéricamente en la presente memoria adhesinas "modificadas" u "optimizadas".

Las adhesinas optimizadas comprenden una o más de las siguientes mutaciones (la numeración de las posiciones de los aminoácidos aquí se basa en la secuencia de aminoácidos de tipo natural DraE, véase también la figura 1).

T7 (N, F, C, S, V, R, A, I, L, Y); E17 (S, P, K, G, D, R, N, H, Q); R22 (T, A, S, N, K); D25 (S, G, N, A, T, K, R, H, Q, M); T27 (K, R, L, V, Y, P, N, Q); V28 (W, F); A29 (K, R, S, E, Q, F, G, L, H, P, N, T, W); T31 (G, D, S, N); Q34 (D, G, S, N, L, V, T, A); D37N; A38 (S, T, L); A39 (Q, S, D, M, G, F); I41 (V); Q47 (T, N, C, S, G, A, P); D52 (G, N, S, C, P, Q, Y, H, K, R, T); N84 (D, S, H); R86V; T88 (M, L); T95 (L, M, Y, F, C, W, Q, N, E, S, I, H); F100 (Y, V); V105 (S, A, T, R, M, V, P, N, E, Q, G, K, H); I111 (C, V, H, Y, T, M, F); I114 (V, L, A, C); Y115 (T, W, E, V); V116 (A, S, L); G118 (P, S).

No obstante, si T88M y/o N77K están/está presente, la adhesina de la invención debe tener por lo menos alguna otra de las mutaciones anteriormente mencionadas. Esto se aplica en particular a aquellas mutaciones que están presentes en una adhesina del grupo DraE.

Las mutaciones preferidas son V28W; V28F; A39Q; A39S; I41L; Q47S; Q47T; I85L; T95L; G118S y T123I.

Para el propósito de la invención, "adhesina" se refiere en principio a cualquier proteína que puede unirse al dominio N-terminal de un receptor de la familia CEACAM (también la proteína de unión mencionada a continuación), en

particular a CEA y/o NCA. Incluye adhesinas del "grupo adhesina", del "grupo DraE" y, en particular, las proteínas DraE y AfaE-III. También incluye proteínas que tienen las secuencias de consenso derivadas de dichas adhesinas.

Las adhesinas de acuerdo con la invención preferiblemente tienen una secuencia de 139 aminoácidos y un tamaño de 17 kDa. No obstante, pueden también tener una eliminación N-terminal y/o C-terminal, siempre y cuando esto no resulte en una pérdida de la capacidad de unirse a CEACAM, en particular a CEA y/o NCA. La eliminación C-terminal no debería exceder 5, 8 o como máximo 10 aminoácidos, en lo posible. La eliminación N-terminal puede ser de hasta 18 aminoácidos. Sin embargo, también es posible cualquier eliminación más corta, por ejemplo de 5, 8 o 10 aminoácidos. En una realización de la invención, las adhesinas tienen por lo tanto 111 aminoácidos de largo.

El "grupo adhesina" consiste en AfaE-5, DrbE-122, DraE, SM254, DaaE; AfaE-2, AfaE-1 y NfaE-111 (en este contexto, véase también la fig. 2; alineación). De acuerdo con la invención, tienen una o más de las mutaciones anteriormente mencionadas.

Lo mismo se aplica al "grupo DraE" que consiste en las siguientes proteínas (en este contexto, véase también la fig. 4, alineación): G2152, SM297, JJB30, SM437, SM249, SM246, SM245, SM54, G2171, G2166, G2106, G2102, G2097, G2096, DraE, G2099, G2100, SM252, JJB17, SM293, G2076, SM513, AfaE-III. Tienen un consenso de acuerdo con la fig. 5. En una realización, la invención se refiere por consiguiente a adhesinas con la secuencia de la fig. 5 que tiene una o más de las mutaciones anteriormente mencionadas.

Se da preferencia particular a las adhesinas que tienen un consenso de acuerdo con la fig. 6. Esta última deriva de la alineación de DraE y AfaE-III. Se da particular preferencia a DraE.

Las adhesinas de la invención se unen a la secuencia N-terminal de proteínas del grupo CEACAM. Los miembros de este grupo son CEA (CEACAM 5), NCA (CEACAM 6), CEACAM 1,3,4,7 y 8 (véase también la fig. 8). Se unen preferiblemente a la secuencia N-terminal de proteínas con la secuencia de la fig. 9, que deriva de la alineación de CEA y NCA (fig. 9, la región que contiene solamente CEA está subrayada). En una realización, las proteínas de la invención se unen al dominio N-terminal de CEA (fig. 10) y NCA (fig. 11).

En una realización preferida, las adhesinas modificadas de acuerdo con DraE (secuencia en la fig. 1), que se unen a CEA y/o NCA, tienen una de las mutaciones anteriormente mencionadas. En consecuencia, se da preferencia a una adhesina que tenga una secuencia de consenso de acuerdo con la alineación de la fig. 12, de la siguiente manera:

```

XXXXXXXX T7(N, F, C, S, V, R, A, I, L, Y) XXXXXXXXXXXX E17 (S, P, K, G, D, R, N, H, Q) XXXX R22(T, A, S, N, K) XX
D25(S, G, N, A, T, K, R, H, Q, M) X T27(K, R, L, V, Y, P, N, Q) V28(W, F) A29(K, R, S, E, Q, F, G, L, H, P, N, T, W) X
T31(G, D, S, N) XX Q34(D, G, S, N, L, V, T, A) XX D37N A38(S, T, L) X A39(Q, S, D, M, G, F) X I41(V) XXXXX
Q47(T, N, C, S, G, A, P) XXXX D52(G, N, S, C, P, Q, Y, H, K, R, T) XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
N84(D, S, H) X R86V X T88(M, L) XXXXXX T95(L, M, Y, F, C, W, Q, N, E, S, I, H) XXXX F100(Y, V) XXXX V105(S,
A, T, R, M, V, P, N, E, Q, G, K, H) XXXXX I111(C, V, H, Y, T, M, F) XX I114(V, L, A, C) Y115(T, W, E, V) V116(A, S,
L) X G118(P, S) XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX.
    
```

En otra realización, las adhesinas, en particular de DraE, tienen una secuencia de consenso de acuerdo con (alineación en la fig. 13):

```

XXXXXXXX T7(N, F, C, S, V, R, A, I, L, Y) XXXXXXXXXXXX E17 (S, P, K, G, D, R, N, H, Q) XXXX R22(T, A, S, N, K) XX
D25(S, G, N, A, T, K, R, H, Q, M) L26 T27(K, R, L, V, Y, P, N, Q) V28(W, F) A29(K, R, S, E, Q, F, G, L, H, P, N, T, W)
X T31(G, D, S, N) XX Q34(D, G, S, N, L, V, T, A) XX D37N A38(S, T, L) X A39(Q, S, D, M, G, F) X I41(V) G42 P43
V44 XX Q47(T, N, C, S, G, A, P) X L49 XX D52(G, N, S, C, P, Q, Y, H, K, R, T)
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
N84(D, S, H) X R86V X T88(M, L) D89 X S91 XXX T95(L, M, Y, F, C,
W, Q, N, E, S, I, H) XXXX F100(Y, V) XXXX V105(S, A, T, R, M, V, P, N, E, Q, G, K, H) X S107 W108 X G110
I111(C, V, H, Y, T, M, F) XX I114(V, L, A, C) Y115(T, W, E, V) V116(A, S, L) X G118(P, S)
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX.
    
```

En otra realización, las adhesinas, en particular de DraE, tienen la siguiente secuencia de consenso (fig. 14):

```

XXXXXXXX T7(N, F, C, S, V, R, A, I, L, Y) XXXXXXXXXXXX E17 (S, P, K, G, D, R, N, H, Q) X C19 XX R22(T, A, S, N, K)
XX D25(S, G, N, A, T, K, R, H, Q, M) L26 T27(K, R, L, V, Y, P, N, Q) V28(W, F) A29(K, R, S, E, Q, F, G, L, H, P, N,
T, W) X T31(G, D, S, N) XX Q34(D, G, S, N, L, V, T, A) X2 D37N A38(S, T, L) A39(Q, S, D, M, G, F) X I41(V) G42
P43 V44 XX Q47(T, N, C, S, G, A, P) X L49 X C51 D52(G, N, S, C, P, Q, Y, H, K, R, T)
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
N84(D, S, H) X R86V X T88(M, L) D89 X S91 XXX T95(L, M, Y, F, C,
W, Q, N, E, S, I, H) XXXX F100(Y, V) XXXX V105(S, A, T, R, M, V, P, N, E, Q, G, K, H) G106 S107 W108 X G110
1111(C, V, H, Y, T, M, F) XX I114(V, L, A, C) Y115(T, W, E, V) V116(A, S, L) X G118(P, S) XXXXXXXXXXXX Y128 T129
XXXXXXXXXXXX.
    
```

Las secuencias especificadas, de las fig. 12 a 14, se basan en la numeración de la secuencia en la fig.1. Aquí también, las eliminaciones anteriormente mencionadas pueden estar en el término N y/o en el término C, siempre y cuando esto no torne imposible la unión de la adhesina a un miembro CEACAM, en particular CEA y/o NCA.

En una realización particular, se da preferencia a una adhesión de la secuencia en la fig. 1, que comprende las siguientes mutaciones, a saber N77K, T88M, I111V, I114V y V116A (también "Fünffach-Mutante"[mutante quintuple], FM, a continuación; fig. 15).

5 El experto en la técnica está en principio familiarizado con la preparación de monómeros de adhesina. En la proteína recombinante AfaE-III-dsc, por ejemplo, la sección de reticulación N-terminal G está clonada al término C, y se introduce un enlazador entre F y G. La sección G luego se pliega nuevamente a través del enlazador y se une a la ahora sección N-terminal A1 y así estabiliza la estructura monomérica. Esta estructura monomérica de AfaE-III-dsc puede luego detectarse por filtraciones de gel (véase la fig. 1C, de Anderson et al., 2004).

10 Piatek et al. (Infection and Immunity (2005) 73(1) pág. 135-145, "Molecular Aspects of Biogenesis of Escherichia coli Dr Fimbriae: Characterization of DraB-DraE-Complexes") describen otra posibilidad de generar adhesinas monoméricas. QUITAN un número diferente de aminoácidos del término N de adhesina y por lo tanto obtienen proteínas monoméricas (véase la fig. 2, de Piatek et al., 2005). Estos principios conocidos son básicamente también aplicables a las adhesinas modificadas de acuerdo con la invención.

15 Para obtener una adhesina modificada, se puede someter una adhesina de tipo natural a mutagénesis, por ejemplo a una mutagénesis específica del sitio basada en oligonucleótidos (p. ej., EP1777292 A1).

En una realización preferida, las adhesinas de la invención pueden prepararse empleando un constructo de adhesina que tenga una afinidad reducida hacia DAF (factor acelerante de descomposición, CD55) como molde para mutagénesis adicionales. Un ejemplo de esto es la mutación N77K (van Loy et al., Molecular Microbiology (2002) 45(2), pág. 439-452, "Identification of amino acids in Dr adhesin required for binding to decay-accelerating factor").

20 Las genotecas producidas por dicha mutagénesis se pueden transformar junto con la diana en levadura, y puede detectarse la lectura del gen indicador (en este contexto, véanse también las realizaciones ilustrativas siguientes). Esto permite que las adhesinas de la invención tengan una mayor para identificar CEA y/o NCA.

25 Las adhesinas de la invención pueden unirse a nanopartículas. Estas últimas preferiblemente se pueden emplear como agentes de contraste *in vivo* para detectar células CRC. El documento WO 2007/057182 A3 describe nanopartículas ventajosas y hace referencia a todos sus contenidos para los fines de describir la preparación y el uso de dichas nanopartículas. Dichas nanopartículas son en particular aquellas cuyo diámetro hidrodinámico no excede 15 nm y que no son inertes en sistemas biológicos.

30 Las nanopartículas de la invención comprenden por lo menos tres estructuras, a saber, un núcleo orgánico que está recubierto con una capa de pasivación que a su vez porta ligandos específicos, donde dichos ligandos específicos pueden también ser parte de la capa de pasivación. Dichos ligandos producen la unión de la nanopartícula específicamente a la diana del sistema biológico.

35 En nanopartículas preferidas, el núcleo inorgánico que incluye la capa de pasivación que lo rodea tiene un diámetro hidrodinámico de no más de 15, si es posible, preferiblemente no más de 10 nm. Se da particular preferencia a los diámetros hidrodinámicos de no más de 8 nm o no más de 5 nm. Esto se aplica especialmente a nanopartículas esféricas. Las nanopartículas de este tamaño pueden iluminarse mediante los riñones y, por consiguiente, no se acumulan en el organismo, o al menos se acumulan en cantidades tolerables. Esto hace posible la aplicación *in vivo*. Esto se aplica en particular a nanopartículas que tienen un diámetro hidrodinámico de no más de 5 nm.

40 En una realización alternativa, las nanopartículas pueden también ser de tipo varilla. En este desarrollo, es ventajoso que el diámetro de la varilla no exceda el límite anteriormente mencionado de 15 nm. Aquí también se da preferencia a diámetros en el intervalo de 5, 8 o 10 nm para facilitar la eliminación del cuerpo. Por lo tanto, por ejemplo, las nanopartículas utilizables de acuerdo con la invención pueden tener dimensiones de longitud/amplitud de 8 x 15 nm.

45 Las nanopartículas utilizables de acuerdo con la invención preferiblemente tienen una emisión máxima en una longitud de onda entre 600 y 700 nm, por ejemplo entre 620 y 660, particular y preferiblemente de aproximadamente 625 nm o 655 nm. Dicha emisión es fácilmente visible al ojo humano, y dichas nanopartículas pueden por lo tanto utilizarse directamente como agentes de contraste para intervenciones médicas. En consecuencia, se pueden dispensar con instrumentos ópticos auxiliares en algunas circunstancias.

50 En una realización alternativa, las nanopartículas que exceden los diámetros hidrodinámicos anteriormente indicados pueden emplearse de acuerdo con la invención, siempre y cuando se garantice que las partículas no sean inertes *in vivo*. Esto último es una precondition para que dichas partículas sean biodegradables y, en consecuencia, los metales (p. ej., Cd) están unidos allí como particulados inicialmente para ser convertidos a la forma iónica. Los productos de degradación pueden iluminarse vía los riñones.

55 Las nanopartículas inorgánicas que tienen una capa de pasivación que contiene un componente de imidazol no son en realidad inertes *in vivo*, como se ha demostrado previamente, pero se degradan bajo estas condiciones. Dichas nanopartículas por lo tanto satisfacen el criterio de biodegradabilidad y el pasaje renal de los productos de degradación, que es particularmente relevante para aplicación *in vivo*. Éste fue un hallazgo sorprendente porque la capa de pasivación sirve especialmente también para incrementar la estabilidad química y/o física de las nanopartículas (en este contexto, véanse también los comentarios adicionales que siguen). Por ende, la relación

entre por un lado la estabilidad de las nanopartículas que se requiere para buenos diagnósticos, y por el otro la biodegradabilidad que se requiere para el pasaje renal de “grandes” partículas, es adecuada para uso como agente de contraste *in vivo*.

La tarea principal de la capa de pasivación es aumentar la intensidad de fluorescencia y la estabilidad físico-química del núcleo orgánico. Los núcleos inorgánicos recubiertos por la capa de pasivación se caracterizan por un rendimiento cuántico de por lo menos 10%, ventajosamente por lo menos 30, 50 o incluso 70%. Rendimiento cuántico significa aquí la relación de la cantidad de luz emitida por una muestra a la cantidad de luz absorbida por la muestra. Ventajosamente, la capa de pasivación tiene un espesor de no más de 1 nm. En este caso, el diámetro del núcleo pasivado aumentó por no más de 2 nm.

Ventajosamente, las nanopartículas están en cada caso también provistas con modificadores, en particular para mejorar la compatibilidad con el entorno biológico. Preferiblemente, el incremento en el radio hidrodinámico debido al uso de modificadores no excede 2 nm. En casos particulares, el espesor de la capa de pasivación y los modificadores también depende de las relaciones de las dos estructuras entre sí y en relación con el núcleo inorgánico.

Las nanopartículas de la invención, si se restringen en tamaño como se mencionó anteriormente, son particularmente adecuadas para uso como agente diagnóstico en un paciente vivo. Por lo tanto, la reducción del tamaño aumenta el índice de difusión y la profundidad de penetración en el tejido. Esto permite que las nanopartículas se propaguen uniforme y rápidamente en el entorno biológico, y que penetren lo más rápido posible en un tejido (por ejemplo, un tumor) después de la administración local. Las nanopartículas de la invención asimismo permiten la administración sistémica que puede llevarse a cabo por inyección. No obstante, la administración local, por ejemplo la aplicación tópica o la administración intra- o peritumoral para el tratamiento de tumores es también posible.

Las realizaciones particularmente ventajosas de la invención que comprenden las nanopartículas acopladas a las adhesinas modificadas tienen un diámetro hidrodinámico de no más de 8, particular y preferiblemente no más de 4 nm. Las nanopartículas de este orden de magnitud pueden ya estar iluminadas a través de los riñones y por ende no acumularse, o acumularse en un grado notoriamente menor, en el organismo. Como consecuencia, las nanopartículas de la invención reducen considerablemente el problema de la toxicidad a largo plazo probablemente asociada con puntos cuánticos conocidos.

Las nanopartículas ventajosamente emiten un espectro fluorescente entre 600 y 700 nm, particular y preferiblemente con emisión máxima entre 600 y 660 nm, particular y preferiblemente entre 620 y 660 nm. Dicho espectro de emisión tiene la ventaja de una muy alta transmisión de tejido debido solamente a la baja absorción por hemoglobina y otras sustancias de absorción de luz en un sistema viviente (incluida el agua). La luz de estas longitudes de onda puede incluso ser detectada por el ojo humano y en consecuencia permite que el médico a cargo del tratamiento identifique el tejido marcado sin la ayuda de ninguna otra técnica complicada para detección (p. ej., cámaras CCD). Esto es particularmente ventajoso cuando se usan las nanopartículas de la invención como agentes de contraste durante una intervención quirúrgica para identificar células que expresan CEA y/o NCA, en particular para discriminar tejidos cancerígenos y sanos.

En una realización, las nanopartículas preferiblemente utilizables son nanopartículas conocidas que tienen un núcleo de, por ejemplo, CdSe, CdS o CdTe, como se describe, por ejemplo, en el documento US 2004/0247861 con referencia a publicaciones científicas. Esta publicación impresa también hace referencia a documentos que tratan sobre la preparación de los materiales del núcleo, por ejemplo al documento US 6.179.912. Se hace referencia a todos los contenidos de estos documentos con respecto a la descripción de las propiedades de estas nanopartículas conocidas y su preparación. Un método para preparar nanopartículas se describe también en más detalle en el documento US 7.147.12 B2 al que se hace referencia para fines descriptivos.

Particular y ventajosamente, el núcleo inorgánico de las nanopartículas consiste esencialmente en semiconductores. Estos núcleos emiten luz de diversos colores, dependiendo de su tamaño y/o composición individual, pero todos ellos absorben en una banda ancha dentro del mismo intervalo del espectro de luz (intervalo de UV a VIS). Debido al alto desvío de Stokes, los espectros de excitación y emisión están apartados, permitiendo la excitación simple y simultánea de distintas nanopartículas. Tienen espectros de emisión angostos y simétricos que se superponen ligeramente o no se superponen. Otras propiedades beneficiosas que son de gran importancia, particularmente para una mejor profundidad de filtración y marcado *in vivo*, son el alto rendimiento cuántico de hasta 80% y la alta fotoestabilidad.

Las nanopartículas preferidas se han descrito, por ejemplo, en el documento WO 2005/001889. Por consiguiente, comprenden un núcleo inorgánico hecho de una aleación de por lo menos dos semiconductores que o bien están distribuidos homogéneamente o para los cuales hay en cada caso un gradiente de concentración dentro de la aleación. Con respecto a la descripción de la naturaleza y preparación de dichas nanopartículas, se hace referencia al documento WO 2005/001889 anteriormente citado. Los núcleos pueden desviarse en tamaño, en cada caso en 5%.

Por consiguiente, el núcleo inorgánico de las nanopartículas puede comprender una aleación de por lo menos dos semiconductores, donde el núcleo tiene una composición homogénea y se caracteriza por una "energía de anchura de banda" que es no lineal a la relación molar de los dos semiconductores.

Alternativamente, el núcleo puede no ser homogéneo, donde la concentración del primer semiconductor aumenta gradualmente, comenzando desde el centro del núcleo hacia la superficie del núcleo, y la concentración del segundo se reduce gradualmente desde el centro del núcleo hacia su superficie.

Para ambos núcleos, por lo menos uno de los semiconductores es un semiconductor del grupo II-grupo VI o un semiconductor del grupo III-grupo V (la definición de grupos corresponde a los grupos de la Tabla Periódica de los Elementos). Por ejemplo, la aleación puede seleccionarse del grupo de las siguientes aleaciones: CdSeTe, CdSSe, CdSTe, ZnSeTe, ZnCdTe, CdHgS, CdHgTe, InGaAs, InGaP, GaAlAs, InGaN. Estos núcleos pueden además portar un recubrimiento de material inorgánico tal como, por ejemplo, semiconductores (p. ej., ZnS). El experto en la técnica conoce esta capa adicional como "cubierta" o "envoltura".

Los semiconductores del grupo II-grupo VI y grupo III-grupo V en general se conocen e incluyen, por ejemplo, $CdS_{1-x}Se_x$, $CdS_{1-x}Te_x$, $CdSe_{1-x}Te_x$, $ZnSe_{1-x}Te_x$, $Zn_{1-x}Cd_xTe$, $Cd_{1-x}Hg_xS$, $Cd_{1-x}Hg_xTe$, $In_{1-x}Ga_xAs$, $Ga_{1-x}Al_xAs$ and $In_{1-x}Ga_xP$. Se prefiere el uso de los semiconductores $CdSe_{1-x}Te_x$, $CdS_{1-x}Te_x$, $ZnSe_{1-x}Te_x$, $Zn_{1-x}Cd_xTe$, $Cd_{1-x}Hg_xS$, $Cd_{1-x}Hg_xTe$, $In_{1-x}Ga_xAs$, $In_{1-x}Ga_xP$, donde x es una fracción entre 0 y 1.

La relación molar de los semiconductores puede ser cualquier relación molar. No obstante, si la aleación comprende CdSSe, se da preferencia a una aleación que tenga la fórmula molecular $CdS_{1-x}Se_x$. Si la aleación comprende CdSTe, se da preferencia a una aleación que tenga la fórmula molecular $CdS_{1-x}Te_x$. Si la aleación comprende ZnSeTe, se da preferencia a una aleación que tenga la fórmula molecular $ZnSe_{1-x}Te_x$. Si la aleación comprende ZnCdTe, se da preferencia a una aleación que tenga la fórmula molecular de CdTe solo. En cada uno de estos casos, x es una fracción entre 0 y 1.

Estos núcleos inorgánicos preferidos de las nanopartículas pueden prepararse usando las siguientes etapas: (i) preparación de una primera disolución bajo condiciones que permiten que se formen nanocristales, (ii) preparación de una segunda disolución que comprende un precursor de los semiconductores con una relación molar bajo una condición que no permite que se formen nanocristales, (iii) adición de la segunda disolución a la primera disolución que permite que se formen nanopartículas, y (iv) alteración de las condiciones, lo que permite el crecimiento y la formación de los nanocristales. El método para preparar los núcleos se ilustra en el documento WO 2005/001889 al que se hace referencia con respecto a la descripción de la preparación de esta realización preferida del núcleo inorgánico de las nanopartículas de la invención.

En una realización alternativa, el núcleo inorgánico puede consistir esencialmente en una agrupación de metales nobles que preferiblemente comprende entre 2 y 27 átomos de metales nobles. En una realización preferida, el metal noble se seleccionó del grupo que consiste en oro, plata, cobre, platino, paladio, osmio, iridio, rutenio y rodio. La agrupación puede tener cargas variables.

Estos núcleos tienen la ventaja de que pueden ser detectados fácilmente como "nanopuntos", individuales, usando una excitación de lámpara de mercurio débil, debido a su fuerte absorbancia y emisión. Las nanopartículas de la invención que contienen estos núcleos pueden utilizarse ventajosamente como etiquetas de moléculas individuales fluorescentes y etiquetas de masas.

La expresión "metal noble" se refiere a un grupo de elementos seleccionados de un grupo que consiste en oro, plata y cobre, y metales del grupo de platino (PGM), platino, paladio, osmio, iridio, rutenio y rodio. En realizaciones preferidas de la presente invención, los metales nobles se seleccionan del grupo que consiste en oro, plata y cobre. En una realización particularmente preferida, el metal noble es plata u oro.

El término "agrupación" se refiere a un compuesto de 2-27 átomos de metal. Las agrupaciones se conocen, entre otros, de los campos de catálisis química, tecnología de cerámica, semiconductores y ciencias de los materiales. El experto en la técnica está por lo tanto familiarizado con su preparación. El documento WO 2004/003558 describe, entre otros, la preparación de agrupaciones de metales nobles y además contiene más referencias extensas a este tema. Más específicamente, describe la preparación de nanoagrupaciones de metales nobles asociadas con moléculas orgánicas. El término asociación significa aquí cualquier forma de unión, independientemente de la naturaleza química o física de la unión (por lo tanto, por ejemplo, la unión covalente, no covalente, electrostática o van der Waals). Se hace referencia al documento WO 2004/00355 con respecto a la preparación de las nanoagrupaciones como el núcleo de las nanopartículas de la invención.

Las nanopartículas preferiblemente utilizables de acuerdo con la invención tienen una capa de pasivación que aumenta la intensidad de fluorescencia y mejora la estabilidad físico-química del núcleo inorgánico. Como consecuencia, las nanopartículas emiten luz preferiblemente con un rendimiento cuántico de más de 10%, preferiblemente más de 50%.

Dichas nanopartículas preferiblemente tienen una estabilidad de almacenamiento de por lo menos 12 meses en un entorno acuoso a 4°C y son, si es posible, estables en un intervalo de pH de pH 5 a pH 10, preferiblemente de pH 7

a pH 10, es decir, exhiben desviaciones de menos de 50% con respecto a sus características espectrales específicas tales como rendimiento cuántico, posición de emisión máxima, semianchura del espectro de emisión. Las partículas preferidas exhiben desviaciones de menos de 10% con respecto a estas características espectrales.

Las nanopartículas utilizables de acuerdo con otra realización de la invención exhiben esencialmente una constancia/estabilidad de las propiedades del núcleo (incluyendo la capa de pasivación que lo rodea) también bajo condiciones biológicas (es decir fisiológicas) o *in vivo* durante un periodo de por lo menos tres días. Las partículas preferidas exhiben una constancia/estabilidad de esta clase por un periodo de 7 a 14 días, donde mediante la estabilidad se retiene por lo menos 50% de la constancia de las propiedades. Esta información se refiere especialmente a la estabilidad de las nanopartículas en el órgano diana real. Cabe destacar que la estabilidad de las nanopartículas en los órganos que tienen función principalmente catabólica puede ser notablemente menos estable (por ejemplo en el hígado). Esto puede incluso ser expresamente conveniente.

Si bien las nanopartículas son estables en el sentido anteriormente mencionado, no obstante son fundamentalmente degradables *in vivo* y en consecuencia no son inertes. En este sentido, "no inerte" significa que por lo menos 50% de las nanopartículas ya se han degradado después de 12 semanas o más post-administración. Se da preferencia a por lo menos 50% de degradación que ya es detectable después de 8, 6 o 4 semanas. La detección de las partículas que permanecen en el cuerpo incluye detección en los órganos del cuerpo y en el plasma para este propósito. Por ende, "inerte" significa que más de 50%, incluso hasta casi 100%, de las partículas son todavía detectables en el cuerpo del paciente 4 semanas post-administración.

La degradabilidad de las nanopartículas puede detectarse mediante ensayos conocidos por el experto en la técnica, a saber, por ejemplo, mediante espectrometría de masas de plasma inductivamente acoplada (ICP-MS), donde los ensayos pueden también complementarse por mediciones de espectrometría de fluorescencia, si las muestras son adecuadas (véase también lo sucesivo respecto a esto).

La capa de pasivación contiene por lo menos un compuesto que es capaz de coordinar átomos de metal o iones de metal, por ejemplo iones de zinc, iones de mercurio o iones de cadmio. Este compuesto puede ser una base de Lewis o un compuesto insaturado cíclico o lineal con electrones resonantes. Mediante un compuesto insaturado cíclico, también puede ser un heterociclo o un heteroaromático. En una realización preferida, el grupo insaturado o conjugado está en una posición terminal basada en la estructura de la molécula. La capa de pasivación puede a su vez tener un reticulante, o el compuesto insaturado cíclico o lineal puede también actuar como reticulante. El reticulante puede ser básico.

Los compuestos de coordinación que contienen átomos de metal o iones de metal pueden unirse funcionalmente a núcleos inorgánicos fluorescentes mediante quelación, coordinación o propiedades de donantes de electrones de bases de Lewis, y tener restos/grupos correspondientemente conjugados. Dichas moléculas pueden a su vez contener restos que imparten solubilidad o humectación a los núcleos recubiertos con ellos en disoluciones acuosas.

Dichas moléculas o compuestos pueden incluir un sistema de anillo homogéneo o heterogéneo (heterocíclico) que contiene uno, dos o más anillo enlazados (o también condensados). Los ejemplos preferidos de sistemas heteroaromáticos son tiazoles, derivados de tiazol, oxazoles, derivados de oxazol, pirroles, derivados de pirrol incluyendo polipirrol purificado o impurificado o purificado oligómeros, tiofenos, derivados de tiofeno incluyendo politiofenos impurificados o purificados, furanos, derivados de furano, piridina y derivados de piridina, pirimidina y sus derivados, pirazinas, derivados de pirazina, triazina y derivados de triazina, triazoles, derivados de triazol, ftalocianinas y derivados de ftalocianina, porfirina y derivados de porfirina. Dichos compuestos pueden incluir hidrocarburos insaturados (olefínicos) o aminas, derivados de fósforo o sus derivados de oxígeno que pueden incluir acetileno, propino y aleno, pero sin limitarse a ellos. Se debe dar preferencia a la molécula que tenga suficiente densidad de electrones p o π con el fin de participar en la formación de aductos o resonancia en la superficie del núcleo del semiconductor.

Dicho compuesto heteroaromático es preferiblemente un componente de imidazol. Se da preferencia además a añadir un compuesto de fosfina, preferiblemente un compuesto de alquilfosfina, como reticulante.

La expresión "componente de imidazol" significa para los fines de la presente descripción una molécula heterocíclica o heteroaromática que contiene por lo menos un grupo imidazol (incluyendo derivados de imidazol) y que está disponible para unión del núcleo orgánico o la capa de pasivación que tiene un metal tal como cadmio, zinc, galio, o un catión de metal o un sustrato que contiene dicho catión. En este sentido, preferiblemente por lo menos un grupo imidazol debe estar en una posición terminal basada en la estructura de la molécula. El componente de imidazol en su forma funcional se une mediante el anillo que contiene orbitales moleculares deslocalizadas al nanocrystal fluorescente. Por lo general, los átomos de nitrógeno del anillo imidazol sirven como ligandos de coordinación para unir funcionalmente un ión de metal como cadmio o zinc.

En una realización, el componente de imidazol comprende grupos funcionales reactivos tales como uno o dos aminoácido(s), por ejemplo histidina, carnosina, anserina, baleína, homocarnosina, histidilfenilalanina, ciclo-histidilfenilalanina, 5-amino-4-imidazolcarboxamida histidilileucina, 2-mercaptoimidazol, boc-histidina, hidrazida, histinol, 1-metilhistidina, 3-metilhistidina, imidazolisina, ornitina que contiene imidazol (p.e j., 5-metilimidazol), alanina

que contiene imidazol (p. ej., (beta)-(2-imidazolil)-L-(alfa) alanina), carzinina, histamina. Estas moléculas basadas en histidina o aminoácidos que contienen imidazol pueden sintetizarse por métodos generalmente conocidos.

5 El término "fosfina" significa para los fines de la invención una molécula que tiene por lo menos un grupo fosfina (incluidos sus derivados) para unir o quelar un no metal tal como Se, S u otros no metales o sustratos que contienen dichos átomos, y provee por lo menos un grupo funcional (por ejemplo hidroxil-, amino-, tiol-, carboxil-, carboxamida- etc.) para la reacción con moléculas vecinas.

Preferiblemente, por lo menos un grupo fosfina deber estar ubicado en una posición terminal basada en la estructura de la molécula. Los restos fosfina sirven como ligandos de coordinación para unir en su forma funcional con un núcleo fluorescente o un compuesto de la capa de envoltura un no metal o ión tal como Se o S.

10 En una realización preferida, el compuesto que contiene fosfina incluye uno, dos o más grupos fosfina acoplados entre sí (p. ej., en forma polimérica) que pueden incluir compuestos de hidroximetilfosfina o similares, aunque sin limitarse a ellos. Los compuestos que contienen fosfina pueden sintetizarse por métodos generalmente conocidos. A su vez, se sabe que los compuestos que contienen alquilfosfina posiblemente tengan también uno o más grupos funcionales adicionales (p. ej., hidroxil-, amino-, tiol-, carboxil-, carboxamida-, etc.). Los ejemplos de derivados son 15 derivados de hidroximetilfosfina, amidas o ésteres, siempre y cuando dicha derivatización sea compatible con las funciones descritas en la presente memoria de la fosfina como recubrimiento.

Se da particular preferencia a tris(hidroximetil)fosfina y ácido β -[tris(hidroxi)fosfino]propanoico para recubrir los núcleos inorgánicos fluorescentes de las nanopartículas de la invención. Los compuestos que contienen fosfina 20 reticulada se conocen por ser además capaces de unirse funcionalmente a átomos y/o iones metálicos tales como Zn o Cd. Los isocianatos o alquiliacrilatos funcionalizados en este sentido pueden a su vez ser útiles como reticulantes para ligandos y formación de aductos con núcleos fluorescentes. Dichos reticulantes pueden también ser básicos.

El efecto pasivante de la capa de pasivación presente de acuerdo con la invención se basa en la envoltura de átomos de cadmio o zinc superficiales o similares mediante la formación de complejo con el heteroaromático o 25 heterociclo (preferiblemente con el componente de imidazol), y en la envoltura de los contra-átomos (Se o S, o similar) mediante la formación de complejo con los compuestos que contienen fosfina.

La capa de pasivación de las nanopartículas de la invención se ha descrito en el documento US 2004/0247861 A1. Esta solicitud en trámite describe la preparación de núcleos inorgánicos recubiertos con la capa de pasivación, por 30 ejemplo de puntos cuánticos. Se hace referencia entonces al documento US 2004/0247861 para propósitos descriptivos de la preparación de la capa de pasivación empleada de acuerdo con la invención y de los núcleos inorgánicos recubiertos con ésta.

Las moléculas de la capa de pasivación pueden a su vez tener o portar grupos químicos con el fin de unir y reticular moléculas y células diana (ligandos específicos). En presencia de reactivos adecuados tales como $ZnSO_4$ y Na_2S , 35 dichas moléculas o compuestos pueden formar una capa de pasivación con las moléculas en el núcleo fluorescente ("cubierta" o "envoltura"). Estos reactivos también pueden unirse funcionalmente a átomos o iones en la superficie del nanocrystal fluorescente y, como consecuencia, esta capa de pasivación adicional puede también formarse directamente en la superficie del núcleo.

En una realización ventajosa, las nanopartículas de la invención pueden tener adicionalmente modificadores que 40 pueden consistir en restos orgánicos y/o inorgánicos. Se usan para mejorar la compatibilidad, eficacia y/o solubilidad de las nanopartículas en un medio líquido o suspensión, en particular en el entorno fisiológico. Esta modificación de la superficie es especialmente ventajosa para lograr muy baja adsorción inespecífica y mayor compatibilidad en sistemas biológicos, en particular en el cuerpo humano.

Una posibilidad consiste en modificar la superficie con polietilenglicol (PEG), que ya ha sido aprobado para 45 aplicaciones médicas particulares, en particular en formas de bajo peso molecular para que la nanopartícula mantenga un tamaño total pequeño. De este modo, pueden incrementarse tanto la biocompatibilidad como el tiempo de circulación en la sangre de las nanopartículas, y también la eficiencia de absorción en las células. La combinación de una capa de PEG de bajo peso molecular con otras sustancias tales como vitaminas, por ejemplo ácido fólico, puede lograr una absorción inferior de dichas nanopartículas en los macrófagos, ya que la adsorción de 50 proteínas a las nanopartículas, que de este modo se reduce, hace que el reconocimiento de dichas nanopartículas por el sistema inmunitario sea más difícil.

Otra modificación de superficie posible y ventajosa mediante el uso de modificadores es el recubrimiento con monosacáridos, di- o trisacáridos hasta polisacáridos de bajo peso molecular compuestos por un tipo de 55 monosacárido o distintos monosacáridos. Un tipo de desarrollo posible es una modificación con poliglucosa, por ejemplo, en la que se puede utilizar dextrano, que ya ha sido probado médicamente como sustituto de la sangre. Exhibe buena biocompatibilidad/tolerancia. Otra realización consiste en el uso de formas estereoisoméricas (D-/L-) de sacáridos con el fin de contrarrestar la posible degradación.

- 5 Otra realización consiste en el uso de vitaminas hidrófilas biológicamente compatibles como modificadores, por ejemplo tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina, cobalamina, ácido pantoténico, ácido ascórbico y ácido fólico. Por lo tanto, por ejemplo, el ácido fólico puede conducir a una unión preferida de las nanopartículas a las células cancerosas. Esta vitamina exhibe solamente baja inmunogenicidad y por ende alta biocompatibilidad. La internalización de las nanopartículas es facilitada por la unión al receptor de ácido fólico unido a la membrana.
- Las modificaciones de superficie son también posibles con vitaminas lipófilas, tales como retinol, colecalférol, tocoferol y filoquinona. Por consiguiente, por ejemplo, la vitamina E puede aumentar la absorción celular de nanopartículas.
- 10 Los ácidos grasos, tales como por ejemplo 1-octadeceno o ácido 18-metileicosanoico y sus derivados, pueden aumentar la solubilidad y estabilidad de los coloides y tienen un grupo carboxilo funcional terminal que puede utilizarse para unión subsiguiente de ligandos específicos. Es por lo tanto útil incluir ácidos grasos como modificadores.
- 15 Otra realización de modificación de superficie es un recubrimiento con polialcoholes tales como, por ejemplo dietilenglicol (DEG), que son particularmente buenos para reducir la adsorción de proteínas no específicas. Lo mismo se aplica para politetrafluoroetileno (PTFE, Teflon), en particular en sus formas de bajo peso molecular, que puede lograr una reducción de la adsorción de proteínas. El politetrafluoroetileno frecuentemente se utiliza en aplicaciones cardioquirúrgicas.
- 20 Las modificaciones de superficie pueden a su vez llevarse a cabo empleando uno o más aminoácidos naturales, que incluyen tanto aminoácidos proteínogénicos como no proteínogénicos, y aminoácidos sintéticos. Ambos estereoisómeros (formas D y L) pueden usarse aquí. Los d-, tri-, tetra- hasta pequeños polipéptidos de los aminoácidos anteriormente mencionados apenas estimulan el sistema inmunitario y son por consiguiente también adecuados para una capa de compatibilidad delgada. Pueden ser secuencias de aminoácidos artificiales como también secuencias de proteínas biológicas. Los derivados de péptidos de proteínas naturales tales como, por ejemplo, fitoquelatina, pueden también utilizarse para modificación de superficie. La modificación de superficie con el péptido Tat y con péptidos que contienen el péptido Tat es otra posibilidad para elaborar nanopartículas disponible para uso en aplicaciones biomédicas. El péptido Tat es una molécula eficaz, por ejemplo, para suministrar nanopartículas de oro a través de la membrana celular hasta el núcleo.
- 25 Otra realización de posibles modificadores es la formación de un recubrimiento de fosforilcolina. La fosforilcolina reduce una posible adsorción de proteínas inespecíficas, por ejemplo en lentes de contacto. Debido a sus propiedades no trombogénicas, una modificación de fosforilcolina puede emplearse fácilmente en sistemas biológicos y se distingue por una alta estabilidad de conservación.
- 30 Dado que el poliacetato es biocompatible, esta sustancia se emplea en una diversidad de aplicaciones médicas. Más específicamente, las formas de bajo peso molecular de poliacetato constituyen otra modificación de superficie posible de las nanopartículas de la invención. Ambos estereoisómeros (formas D/L) pueden emplearse aquí con el fin de reducir la posible biodegradación.
- 35 Aparte de las modificaciones de superficie mencionadas, es también posible la unión proteolíticamente escindible de proteínas inespecíficas a las nanopartículas. Esto puede aumentar la biocompatibilidad/compatibilidad. En el sitio diana, la proteína grande puede eliminarse con las nanopartículas pequeñas que están siendo liberadas en el tejido. Dicha eliminación puede también tener lugar después de un tiempo de inactividad apropiado. Las proteínas comúnmente utilizadas son adecuadas para esto, tales como transferrina, lactoferrina, ceruloplasmina, elastina y albúmina, además de otras proteínas que reducen la adsorción inespecífica. Por lo tanto, por ejemplo, el recubrimiento superficial compuesto por combinaciones de polipéptidos con elastina puede prevenir la formación indeseada de coágulos y en consecuencia incrementar la biocompatibilidad de las nanopartículas.
- 40 La principal proteína sérica albúmina puede reducir interacciones no específicas con membranas plasmáticas. Asimismo, la nanopartícula apropiadamente modificada retiene la capacidad de desarrollar interacciones específicas con células diana mediante un ligando específico, uniéndose simultáneamente a la superficie de la partícula. Un recubrimiento con albúmina de suero puede resultar en un tiempo de circulación de la sangre sustancialmente más largo, previniendo una rápida absorción por los macrófagos después de la administración intravenosa, en comparación con nanopartículas no recubiertas.
- 45 Al margen de los recubrimientos inespecíficos señalados anteriormente, las nanopartículas de la invención portan una marca selectiva con ligandos específicos de las células diana; se conjugan, por ejemplo, con proteínas, anticuerpos, péptidos o, particular y preferiblemente, dominios de proteínas pequeños de gran afinidad, fragmentos de anticuerpo u otras moléculas orgánicas que se unen, por ejemplo, a estructuras específicas de células tumorales u otras dianas. Un ligando preferido es adhesina (véase la realización ilustrativa 4). "Específico" en este contexto significa que el ligando se expresa en la diana o bien exclusivamente o hasta un grado aumentado.
- 50 La combinación de un diámetro hidrodinámico reducido que resulta en los índices más altos de difusión y perfusión mencionados, junto con las propiedades y avances anteriormente descritos y la alta intensidad de fluorescencia, especialmente en el rango de luz roja visible, torna las nanopartículas de la invención en un agente de diagnóstico

simple que puede emplearse en muchas maneras distintas para discriminación selectiva y exacta de formas de tejido *in vivo*. Estas posibilidades, en combinación con biomarcadores específicos de antígenos, se emplean especialmente para identificar células que expresan CEA y/o NCA, en particular para distinguir tejido anormal, (pre-)cancerígeno de tejido normal y ayudar en la evaluación visual durante una intervención quirúrgica para una extirpación más precisa del tumor. Las nanopartículas de la invención utilizables en la presente memoria sirven por lo tanto como agentes de contraste. Esto se aplica en particular al uso en el diagnóstico y la cirugía de cáncer de intestino.

Las nanopartículas que tienen las adhesinas modificadas de acuerdo con la invención pueden emplearse o bien como agentes de diagnóstico, agentes diagnóstico-terapéuticos y/o agentes terapéuticos *in vitro* o *in vivo*. Para este propósito, pueden administrarse localmente (p. ej., por vía intratumoral, intramuscular, o en los tejidos/órganos quirúrgicamente accesibles) o también sistémicamente (p. ej., por vía intravenosa). La administración local/tópica puede llevarse a cabo mediante un líquido, disolución de pulverización, gel, espuma, crema, parche activo. Esto puede ser preferible, en particular para el tratamiento/diagnóstico de órganos huecos tales como es el caso del cáncer de intestino. La ingesta oral es también posible, por ejemplo como jarabe o en la forma de comprimidos o cápsulas. Es igualmente posible la inhalación (p. ej., aerosol). Se contempla la administración anal con supositorios. En una variante, las nanopartículas se pueden implantar en forma de medicamento de absorción lenta.

La expresión “agente diagnóstico” se utiliza en el contexto de la presente invención como sinónimo de “agente de contraste”, es decir, sirve para discriminar la visualización de estructuras morfológicas o funcionales en sistemas biológicos, especialmente en personas vivas, para ayudar en una intervención médica.

Las nanopartículas pueden emplearse como agente diagnóstico especialmente en intervenciones quirúrgicas. Pueden asimismo utilizarse en métodos mínimamente invasivos (p. ej., espectroscopía, laparoscopia). Es válida la combinación con métodos por imágenes tales como PET, MRT, CT, etc.

Como ya se mencionó, el uso de acuerdo con la invención en la forma de administración local es particularmente ventajoso. La cantidad de Cd empleada en la administración local en este sentido ventajoso no excede un décimo de la exposición total que normalmente se acumula de cualquier manera a lo largo de la vida en el hígado y en el riñón de una persona de edad avanzada y con un estilo de vida usual. La exposición total de estos órganos es de aproximadamente 18 mg (Satrag et al 2000; British Journal of Nutrition; 2000, (84), 791-802). Por consiguiente, es ventajoso en la administración local que la cantidad de nanopartículas sea limitada, de manera tal que la cantidad de Cd suministrada al menos no exceda sustancialmente 2 mg. En una realización particularmente preferida, la visualización del tumor es posible incluso con una cantidad de agente de contraste que no excede una cantidad total de 0,6 mg, particular y preferiblemente 0,2 mg, de cadmio.

“Administración local” significa, para los fines de la invención, cualquier administración en la que pueda esperarse una cantidad o dosis aumentada del agente de contraste en regiones distintas del cuerpo, dependiendo del modo de administración. Por lo tanto, una administración vascular del agente de contraste es también una administración local, siempre y cuando las medidas tomadas por el personal que administra, por ejemplo, aplicar una ligadura a vasos aferentes o eferentes, prevengan que el agente de contraste se propague por el sistema vascular sanguíneo del organismo en un modo esencialmente no limitado.

La ventaja particular de esta realización es que el uso de las nanopartículas en aplicación médica a una persona viva es así posible por primera vez, ya que de otra manera – es decir como administración sistémica – esto se restringe debido a la toxicidad asociada con ello. Esto se debe a que la administración local reduce la dosis de nanopartículas necesaria para una visualización adecuada.

Ha surgido que el agente de contraste que contiene Cd se emplea ventajosamente de acuerdo con la invención para visualizar un tumor *in vivo* en una dosis correspondiente a una cantidad entre 0,002 y 0,02 mg de Cd por cm³ de tejido tumoral. Las dosis del agente de contraste de 0,002 a 0,015 mg de Cd/cm³ de tejido tumoral son particularmente ventajosas, en particular aquellas entre 0,002 y 0,010 mg de Cd/cm³. Es posible con esta dosis ventajosa visualizar tumores con un volumen de hasta aproximadamente 150 cm³ *in vivo* sin exceder así el límite superior normalmente aceptable de exposición para seres humanos. La visualización de tumores con un volumen de hasta 50 cm³ es particularmente favorable.

Las investigaciones pueden relacionarse con todos los tejidos/órganos accesibles del paciente, especialmente en la piel, órganos huecos (p. ej., en el tubo digestivo, el aparato urogenital y las vías respiratorias) o en regiones externamente accesibles de los órganos sensoriales y también el sistema cardiovascular.

También es posible el uso como agente diagnóstico *in vitro*, por ejemplo inmunohistoquímica o FACS, y ELISA. Es particularmente ventajosa una combinación de diagnóstico *in vivo* e *in vitro* (p. ej., material de biopsia).

Las adhesinas modificadas de acuerdo con la invención pueden permanecer unidas a las nanopartículas o pueden ser eliminables, detectables o liberables.

REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

I. Suministro de las adhesinas modificadas

CEACAM N-terminal, p. ej., el dominio CEA, es suficiente para la unión de adhesivos. Esto se sabe a partir de estudios de unión que usan fimbrias modificadas que además contienen la adhesina particular (Korotkova et al., The Journal of Biological Chemistry (2006) 281(39), pág. 29120-29139, "A Subfamily of Dr Adhesins of Escherichia coli Bind Independently to Decay-accelerating Factor and the N-domain of Carcinoembryonic Antigen"). El dominio N-terminal de CEA y NCA (CEACAM6) se empleó por lo tanto como diana para las adhesinas de acuerdo con la presente realización.

Con este fin, el uso del codón del dominio N-terminal de CEA y NCA y de la proteína madura de DraE como ligando (adhesina) se optimizó de antemano para expresión en *Saccharomyces cerevisiae*. Los genes se sintetizaron.

Se clonaron constructos DraE, preferiblemente que contenían la mutación N77K, y el dominio terminal de CEA (N-CEA en lo sucesivo) en vectores de levadura TH y se transformaron en levadura.

La adhesina se sometió a mutagénesis, en una realización particularmente preferida a una mutagénesis específica del sitio basada en oligo (p. ej., EP1777292 A1). La genoteca resultante de allí se caracteriza por colonias sencillas de secuenciación y el DNA de la genoteca.

La genoteca y la diana (N-CEA) se transforman en la cepa de levadura Y190, que ha sido modificada por integración del gen Met1 (codifica una metil transferasa Uroporfirinógeno III) en el genoma, y las levaduras se colocan en placas en medio que contiene 3-AT 25 mM. Las dos proteínas deben interactuar para que puedan leerse los genes indicadores, Met1 y β -galactosidasa.

Se lleva a cabo la evaluación cuantitativa como se describe en el documento EP1721974 A1. El gen indicador Met1 se detecta mediante la fluorescencia del producto, que resulta de una conversión enzimática de Uroporfirinógeno III.

Para confirmar los prototipos (hits) obtenidos, se utiliza otra prueba antes de secuenciar el segundo gen indicador, lacZ. Con este fin, se determinó la actividad de β -galactosidasa mediante conversión del sustrato FDG, por la enzima en un producto fluorescente, reduciendo de este modo el número de prototipos a 25% antes de secuenciar.

Por lo tanto, es posible proveer mutantes de adhesina que tengan mejor afinidad hacia CEA y/o NCA en comparación con el tipo natural, pero en particular también en comparación con el molde. El avance en la afinidad – registrado, por ejemplo, como lectura del gen indicador de acuerdo con el método de evaluación descrito en el documento EP1721974 A1 – en comparación con el molde, es de por lo menos aproximadamente 5%, preferiblemente por lo menos 100%, particular y preferiblemente por lo menos 300 o por lo menos 500%. La afinidad comparada con el tipo natural puede incluso aproximarse aquí a un valor que es hasta dos veces o hasta cuatro veces aquel del molde.

Los avances particularmente grandes en la afinidad se logran combinando por lo menos dos mutaciones, preferiblemente también hasta 3, 5 o 7 mutaciones. Un incremento particularmente grande en afinidad es posible especialmente repitiendo (opcionalmente también varias veces) la etapa de evaluación del documento EP1721974 A1.

Se tiene como fin la detección de mutantes mejorados de afinidad diferente. Es importante aquí encontrar el tipo natural con el objetivo de identificar adhesinas que estén mejoradas en comparación con dicho tipo natural. Esto abarca el espacio completo de la secuencia con mutantes mejorados en cuanto a afinidad.

Las adhesinas modificadas de la invención que se han alterado, a saber, en una o más posiciones de aminoácidos, pueden derivar de estas investigaciones.

1. Modificaciones ventajosas

Realización ilustrativa 1 – posición 88 – treonina

Se sabe a partir de la bibliografía (Korotkova et al., The Journal of Biological Chemistry (2006) 281(39), pág. 29120-29139, "A Subfamily of Dr Adhesins of Escherichia coli Bind Independently to Decay-accelerating Factor and the N-domain of Carcinoembryonic Antigen") que la mutación T88M causa en las adhesinas, especialmente en DraE, un aumento en la afinidad de dicha adhesina hacia CEA. En consecuencia, se eligió la posición T88 para la primera mutagénesis.

Ésta y toda la información subsiguiente se refieren a las posiciones de aminoácidos en DraE de acuerdo con la secuencia en la fig. 1.

Se llevó a cabo la evaluación cuantitativa como se describe en el documento EP1721974 A1.

(i) Secuenciación y evaluación de prototipos

La secuenciación del DNA de los prototipos después de la transformación en bacterias produce el siguiente orden de mutantes con mejor afinidad hacia CEA, en base a la frecuencia de prototipos identificados:

M > L > WT

El mutante más mejorado en esta posición, T88M, se empleó como molde para las siguientes mutagénesis.

A su vez, se introdujo la mutación N77K con el fin de prevenir la adhesina de unión a DAF (van Loy et al., Molecular Microbiology (2002) 45(2), pág. 439-452, "Identification of amino acids in Dr adhesin required for binding to decay-accelerating factor"). Esta mutación no afecta la unión de la adhesina a N-CEA (Korotkova et al., The Journal of Biological Chemistry (2006) 281(39), pág. 29120-29139, "A Subfamily of Dr Adhesins of Escherichia coli Bind Independently to Decay-accelerating Factor and the N-domain of Carcinoembryonic Antigen" y datos propios). El molde para las mutagénesis es por lo tanto DraE T88M N77K.

Realización ilustrativa 2 – posición 7 – treonina

Se llevó a cabo la evaluación cuantitativa como se describe en el documento EP1721974 A1; además, se realizó una re-evaluación (ver arriba).

(i) (i) Secuenciación y evaluación de prototipos

La secuenciación del DNA de los prototipos después de la transformación en bacterias produce el siguiente orden de mutantes con mejor afinidad hacia CEA, en base a la frecuencia de prototipos identificados:

$N > (F, C) > S > V > R, A > (I, L, Y) > WT$

Realización ilustrativa 3 – posición 17 – glutamato

La evaluación cuantitativa se llevó a cabo como se describe en el documento EP1721974 A1; además, se realizó una re-evaluación (ver arriba).

(i) Secuenciación y evaluación de prototipos

La secuenciación del DNA de los prototipos después de la transformación en bacterias produce el siguiente orden de mutantes con mejor afinidad hacia CEA, en base a la frecuencia de prototipos identificados:

$S > P > K > G, D, R, N > H, Q > WT$

Realización ilustrativa 4 – posición 22 – arginina

La evaluación cuantitativa se llevó a cabo como se describe en el documento EP1721974 A1; además, se realizó una re-evaluación (ver arriba).

(i) Secuenciación y evaluación de prototipos

La secuenciación del DNA de los prototipos después de la transformación en bacterias produce el siguiente orden de mutantes con mejor afinidad hacia CEA, en base a la frecuencia de prototipos identificados:

$T > A > S > N > K > WT$

Realización ilustrativa 5 – posición 25 – aspartato

La evaluación cuantitativa se llevó a cabo como se describe en el documento EP1721974 A1; además, se realizó una re-evaluación (ver arriba).

(i) Secuenciación y evaluación de prototipos

La secuenciación del DNA de los prototipos después de la transformación en bacterias produce el siguiente orden de mutantes con mejor afinidad hacia CEA, en base a la frecuencia de prototipos identificados:

$S > G > N > A, T > K, R, H, Q, M > WT$

Realización ilustrativa 6 – posición 27 – treonina

La evaluación cuantitativa se llevó a cabo como se describe en el documento EP1721974 A1; además, se realizó una re-evaluación (ver arriba).

(i) Secuenciación y evaluación de prototipos

La secuenciación del DNA de los prototipos después de la transformación en bacterias produce el siguiente orden de mutantes con mejor afinidad hacia CEA, en base a la frecuencia de prototipos identificados:

$K > R > L > V, Y > P, N, Q > WT$

Realización ilustrativa 7 – posición 28 – valina

La evaluación cuantitativa se llevó a cabo como se describe en el documento EP1721974 A1; además, se realizó una re-evaluación (ver arriba).

(i) Secuenciación y evaluación de prototipos

- 5 La secuenciación del DNA de los prototipos después de la transformación en bacterias produce el siguiente orden de mutantes con mejor afinidad hacia CEA, en base a la frecuencia de prototipos identificados:

W = F > WT

Realización ilustrativa 8 – posición 29 – alanina

- 10 La evaluación cuantitativa se llevó a cabo como se describe en el documento EP1721974 A1; además, se realizó una re-evaluación (ver arriba).

(i) Secuenciación y evaluación de prototipos

La secuenciación del DNA de los prototipos después de la transformación en bacterias produce el siguiente orden de mutantes con mejor afinidad hacia CEA, en base a la frecuencia de prototipos identificados:

K > R > S > E, Q > F, G > L, H > P, N, T, W > WT

- 15 Realización ilustrativa 9 – posición 31 – treonina

La evaluación cuantitativa se llevó a cabo como se describe en el documento EP1721974 A1; además, se realizó una re-evaluación (ver arriba).

(i) Secuenciación y evaluación de prototipos

- 20 La secuenciación del DNA de los prototipos después de la transformación en bacterias produce el siguiente orden de mutantes con mejor afinidad hacia CEA, en base a la frecuencia de prototipos identificados:

G = D > S > N > WT

Realización ilustrativa 10 – posición 34 – glutamina

La evaluación cuantitativa se llevó a cabo como se describe en el documento EP1721974 A1; además, se realizó una re-evaluación (ver arriba).

- 25 (i) Secuenciación y evaluación de prototipos

La secuenciación del DNA de los prototipos después de la transformación en bacterias produce el siguiente orden de mutantes con mejor afinidad hacia CEA, en base a la frecuencia de prototipos identificados:

D >> G > S = N > L = V = T = A > WT

Realización ilustrativa 11 – posición 37 – aspartato

- 30 La evaluación cuantitativa se llevó a cabo como se describe en el documento EP1721974 A1; además, se realizó una re-evaluación (ver arriba).

(i) Secuenciación y evaluación de prototipos

La secuenciación del DNA de los prototipos después de la transformación en bacterias produce el siguiente orden de mutantes con mejor afinidad hacia CEA, en base a la frecuencia de prototipos identificados:

- 35 N >> WT

Realización ilustrativa 12 – posición 38 – alanina

La evaluación cuantitativa se llevó a cabo como se describe en el documento EP1721974 A1; además, se realizó una re-evaluación (ver arriba).

(i) Secuenciación y evaluación de prototipos

- 40 La secuenciación del DNA de los prototipos después de la transformación en bacterias produce el siguiente orden de mutantes con mejor afinidad hacia CEA, en base a la frecuencia de prototipos identificados:

S = T > L > WT

Realización ilustrativa 13 – posición 39 – alanina

La evaluación cuantitativa se llevó a cabo como se describe en el documento EP1721974 A1; además, se realizó una re-evaluación (ver arriba).

(i) Secuenciación y evaluación de prototipos

- 5 La secuenciación del DNA de los prototipos después de la transformación en bacterias produce el siguiente orden de mutantes con mejor afinidad hacia CEA, en base a la frecuencia de prototipos identificados:

Q > S > D, M > G, F > WT

Realización ilustrativa 14 – posición 41 – isoleucina

- 10 La evaluación cuantitativa se llevó a cabo como se describe en el documento EP1721974 A1; además, se realizó una re-evaluación (ver arriba).

(i) Secuenciación y evaluación de prototipos

La secuenciación del DNA de los prototipos después de la transformación en bacterias produce el siguiente orden de mutantes con mejor afinidad hacia CEA, en base a la frecuencia de prototipos identificados:

V >> WT

- 15 En la re-evaluación mediante el ensayo FDG, los clones I41L tuvieron una lectura más alta que los clones I41V. Al analizar la secuencia, se reveló que todos estos clones también tenían la mutación adicional V116A. I41L V116A, por lo tanto, también representan un mutante mejorado.

Realización ilustrativa 15 – posición 47 – glutamina

- 20 La evaluación cuantitativa se llevó a cabo como se describe en el documento EP1721974 A1; además, se realizó una re-evaluación (ver arriba).

(i) Secuenciación y evaluación de prototipos

La secuenciación del DNA de los prototipos después de la transformación en bacterias produce el siguiente orden de mutantes con mejor afinidad hacia CEA, en base a la frecuencia de prototipos identificados:

T >> N = C > S > G = A = P > WT

- 25 Realización ilustrativa 16 – posición 52 – aspartato

La evaluación cuantitativa se llevó a cabo como se describe en el documento EP1721974 A1; además, se realizó una re-evaluación (ver arriba).

(i) Secuenciación y evaluación de prototipos

- 30 La secuenciación del DNA de los prototipos después de la transformación en bacterias produce el siguiente orden de mutantes con mejor afinidad hacia CEA, en base a la frecuencia de prototipos identificados:

G > N, S > C, P, Q, Y, H, K, R, T > WT

Realización ilustrativa 17 – posición 84 – asparagina

La evaluación cuantitativa se llevó a cabo como se describe en el documento EP1721974 A1; además, se realizó una re-evaluación (ver arriba).

- 35 (i) Secuenciación y evaluación de prototipos

La secuenciación del DNA de los prototipos después de la transformación en bacterias produce el siguiente orden de mutantes con mejor afinidad hacia CEA, en base a la frecuencia de prototipos identificados:

D >> S > H > WT

- 40 La evaluación también halló el mutante (combinación) Q34L N84S, que tiene una lectura más alta en la re-evaluación mediante el ensayo FDG, en comparación con N84S.

Esto indica que la combinación de mutantes produce una mayor afinidad hacia CEA en comparación con el mutante individual.

Realización ilustrativa 18 – posición 86 – arginina

La evaluación cuantitativa se llevó a cabo como se describe en el documento EP1721974 A1; además, se realizó una re-evaluación (ver arriba).

(i) Secuenciación y evaluación de prototipos

- 5 La secuenciación del DNA de los prototipos después de la transformación en bacterias produce el siguiente orden de mutantes con mejor afinidad hacia CEA, en base a la frecuencia de prototipos identificados:

V >> WT

Realización ilustrativa 19 – posición 95 – treonina

- 10 La evaluación cuantitativa se llevó a cabo como se describe en el documento EP1721974 A1; además, se realizó una re-evaluación (ver arriba).

(i) Secuenciación y evaluación de prototipos

La secuenciación del DNA de los prototipos después de la transformación en bacterias produce el siguiente orden de mutantes con mejor afinidad hacia CEA, en base a la frecuencia de mutantes identificados:

L >> M, Y, F > (C, W, Q) > N, E, S, I, H > WT

- 15 También se halló el mutante combinado T95E T123I; esta combinación tuvo una lectura más alta en FDG que el mutante T95E.

Esto indica que la combinación de mutantes produce una mayor afinidad hacia CEA, en comparación con el mutante individual.

Realización ilustrativa 20 – posición 100 – fenilalanina

- 20 La evaluación cuantitativa se llevó a cabo como se describe en el documento EP1721974 A1; además, se realizó una re-evaluación (ver arriba).

(i) Secuenciación y evaluación de prototipos

La secuenciación del DNA de los prototipos después de la transformación en bacterias produce el siguiente orden de mutantes con mejor afinidad hacia CEA, en base a la frecuencia de prototipos identificados:

- 25 Y > V > WT

También se halló el mutante combinado F100S T111 D37G; esta combinación tuvo una lectura más alta en FDG que el mutante F100S. Asimismo, se halló el mutante combinado y F100I T123I, lo que demostró una lectura más alta en el ensayo FDG que el mutante F100I.

- 30 Esto indica que la combinación de mutantes produce una mayor afinidad hacia CEA, en comparación con el mutante individual.

Realización ilustrativa 21 – posición 105 – valina

La evaluación cuantitativa se llevó a cabo como se describe en el documento EP1721974 A1; además, se realizó una re-evaluación (ver arriba).

(i) Secuenciación y evaluación de prototipos

- 35 La secuenciación del DNA de los prototipos después de la transformación en bacterias produce el siguiente orden de mutantes con mejor afinidad hacia CEA, en base a la frecuencia de prototipos identificados:

S > A, T > R > M, V, P, N, E > Q, G, K, H > WT

Realización ilustrativa 22 – posición 111 – isoleucina

- 40 La evaluación cuantitativa se llevó a cabo como se describe en el documento EP1721974 A1; además, se realizó una re-evaluación (ver arriba).

(i) Secuenciación y evaluación de prototipos

La secuenciación del DNA de los prototipos después de la transformación en bacterias produce el siguiente orden de mutantes con mejor afinidad hacia CEA, en base a la frecuencia de prototipos identificados:

C > V > H > Y > T > M = F > WT

Realización ilustrativa 23 – posición 114 – isoleucina

La evaluación cuantitativa se llevó a cabo como se describe en el documento EP1721974 A1; además, se realizó una re-evaluación (ver arriba).

(i) Secuenciación y evaluación de prototipos

5 La secuenciación del DNA de los prototipos después de la transformación en bacterias produce el siguiente orden de mutantes con mejor afinidad hacia CEA, en base a la frecuencia de prototipos identificados:

V >> L > A = C > WT

Realización ilustrativa 24 – posición 115 – tirosina

10 La evaluación cuantitativa se llevó a cabo como se describe en el documento EP1721974 A1; además, se realizó una re-evaluación (ver arriba).

(i) Secuenciación y evaluación de prototipos

La secuenciación del DNA de los prototipos después de la transformación en bacterias produce el siguiente orden de mutantes con mejor afinidad hacia CEA, en base a la frecuencia de prototipos identificados:

T = W > E > V > WT

15 Realización ilustrativa 25 – posición 116 – valina

La evaluación cuantitativa se llevó a cabo como se describe en el documento EP1721974 A1; además, se realizó una re-evaluación (ver arriba).

(i) Secuenciación y evaluación de prototipos

20 La secuenciación del DNA de los prototipos después de la transformación en bacterias produce el siguiente orden de mutantes con mejor afinidad hacia CEA, en base a la frecuencia de prototipos identificados:

A > S > L > WT

Realización ilustrativa 26 – posición 118 – glicina

La evaluación cuantitativa se llevó a cabo como se describe en el documento EP1721974 A1; además, se realizó una re-evaluación (ver arriba).

25 (i) Secuenciación y evaluación de prototipos

La secuenciación del DNA de los prototipos después de la transformación en bacterias produce el siguiente orden de mutantes con mejor afinidad hacia CEA, en base a la frecuencia de prototipos identificados:

P > S > WT

30 También se halló el mutante combinado G118S I85L; esta combinación tuvo una lectura más alta en FDG, en comparación con G118S, y se halló entre los primeros prototipos.

Esto indica que la combinación de mutantes produce una mayor afinidad hacia CEA, en comparación con el mutante individual.

Sumario de realizaciones ilustrativas 1 a 26

35 Todas las siguientes secuencias de consenso se especifican en base a la siguiente secuencia de DraE N77K (véase también la fig. 11):

GFTPSGTTGTTKLTVTEECQVRVGDLTVAKTRGQLTDAAPIGPVTVQALGCDARQVALKADTDNFEQKGKFFLISDNKR
DKLYVNIPTDNSAWTTDNGVFYKNDVGSWGGIIGIYVDGQQTNTPPGNYTLTLTGGYWAK

Estas realizaciones ilustrativas resultan en la siguiente secuencia de consenso para aquellos aminoácidos cuya mutación dentro del gen de adhesina produce una mejor afinidad de dicha adhesina hacia CEA:

40 Secuencia de consenso de la alineación en la fig. 12

45 XXXXXX T7(N, F, C, S, V, R, A, I, L, Y) XXXXXXXXXX E17 (S, P, K, G, D, R, N, H, Q) XXXX R22(T, A, S, N, K) XX
D25(S, G, N, A, T, K, R, H, Q, M) X T27(K, R, L, V, Y, P, N, Q) V28(W, F) A29(K, R, S, E, Q, F, G, L, H, P, N, T, W) X
T31(G, D, S, N) XX Q34(D, G, S, N, L, V, T, A) XX D37N A38(S, T, L) X A39(Q, S, D, M, G, F) X I41(V) XXXXX
Q47(T, N, C, S, G, A, P) XXXX D52(G, N, S, C, P, Q, Y, H, K, R, T) XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
N84(D, S, H) X R86V X T88(M, L) XXXXXX T95(L, M, Y, F, C, W, Q, N, E, S, I, H) XXXX F100(Y, V) XXXX V105(S,

A, T, R, M, V, P, N, E, Q, G, K, H) XXXXX I111(C, V, H, Y, T, M, F) XX I114(V, L, A, C) Y115(T, W, E, V) V116(A, S, L) X G118(P, S) XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

La alineación se representa en la fig. 12.

- 5 En una realización ventajosa, las adhesinas modificadas de acuerdo con la invención tienen uno o más de los siguientes aminoácidos: L26, G42, P43, V44, L49, D89, S91, S107, W108, G110. En una realización particularmente preferida, están presentes todos estos aminoácidos.

Esto produce ventajosamente un consenso de la siguiente manera:

Secuencia de consenso de la alineación en la fig. 13

10 XXXXXX T7(N, F, C, S, V, R, A, I, L, Y) XXXXXXXXXX E17 (S, P, K, G, D, R, N, H, Q) XXXX R22(T, A, S, N, K) XX D25(S, G, N, A, T, K, R, H, Q, M) L26 T27(K, R, L, V, Y, P, N, Q) V28(W, F) A29(K, R, S, E, Q, F, G, L, H, P, N, T, W) X T31(G, D, S, N) XX Q34(D, G, S, N, L, V, T, A) XX D37N A38(S, T, L) X A39(Q, S, D, M, G, F) X I41(V) G42 P43 V44 XX Q47(T, N, C, S, G, A, P) X L49 XX D52(G, N, S, C, P, Q, Y, H, K, R, T) XX N84(D, S, H) X R86V X T88(M, L) D89 X S91 XXX T95(L, M, Y, F, C, W, Q, N, E, S, I, H) XXXX F100(Y, V) XXXX V105(S, A, T, R, M, V, P, N, E, Q, G, K, H) X S107 W108 X G110
15 I111(C, V, H, Y, T, M, F) XX I114(V, L, A, C) Y115(T, W, E, V) V116(A, S, L) X G118(P, S) XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

La alineación se representa en la fig. 13. Los aminoácidos ventajosamente presentes se subrayan aquí.

Es ventajoso que las adhesinas de la invención tengan adicionalmente uno o más, en particular todos los siguientes aminoácidos: C19, C51, G106, Y128, T129.

- 20 Por consiguiente, las adhesinas de la invención ventajosamente tienen un consenso como sigue: secuencia de consenso de la fig. 14, todos los aminoácidos ventajosamente presentes están subrayados; combinación de estructuras de consenso de las fig. 12 y 13 y los otros aminoácidos preferidos de acuerdo con la información anteriormente expuesta:

Secuencia de consenso de la figura 14:

25 XXXXXX T7(N, F, C, S, V, R, A, I, L, Y) XXXXXXXXXX E17 (S, P, K, G, D, R, N, H, Q) X C19 XX R22(T, A, S, N, K) XX D25(S, G, N, A, T, K, R, H, Q, M) L26 T27(K, R, L, V, Y, P, N, Q) V28(W, F) A29(K, R, S, E, Q, F, G, L, H, P, N, T, W) X T31(G, D, S, N) XX Q34(D, G, S, N, L, V, T, A) XX D37N A38(S, T, L) A39(Q, S, D, M, G, F) X I41(V) G42 P43 V44 XX Q47(T, N, C, S, G, A, P) X L49 X C51 D52(G, N, S, C, P, Q, Y, H, K, R, T) XX N84(D, S, H) X R86V X T88(M, L) D89 X S91 XXX T95(L, M, Y, F, C, W, Q, N, E, S, I, H) XXXX F100(Y, V) XXXX V105(S, A, T, R, M, V, P, N, E, Q, G, K, H) G106 S107 W108 X G110
30 I111(C, V, H, Y, T, M, F) XX I114(V, L, A, C) Y115(T, W, E, V) V116(A, S, L) X G118(P, S) XXXXXXXXXX Y128 T129 XXXXXXXXXX

2. Combinaciones particularmente preferidas de mutaciones

Se ha comprobado que la siguiente combinación de mutantes individuales es particularmente ventajosa:

- 35 La mutagénesis de la adhesina de tipo natural DraE produjo un mejor mutante T88M (véase la realización ilustrativa 1), y se detectaron otros mutantes mejorados en tandas adicionales de mutagénesis usando este mutante, DraE T88M (N77K), como molde (véanse las realizaciones ilustrativas 2 a 26). Por lo tanto, por ejemplo, se generó el múltiple mutante DraE T88M (N77K) I111H, que exhibió una afinidad notablemente mayor hacia CEA, comparado con la adhesina natural DraE y el mutante DraE T88M.

- 40 Otro ejemplo es el constructo DraE T88M Q34L N84S, que tiene una mayor afinidad hacia CEA que DraE T88M N84S (véase realización ilustrativa 17). El mutante de combinación DraE T88M G118S I85L también tiene una mayor afinidad hacia CEA comparado con el mutante DraE T88M G118S (realización ilustrativa 26).

- 45 El mutante de combinación F100S T111 D37G tuvo una mayor afinidad hacia CEA en comparación con F110S (véase realización ilustrativa 20). Éste también fue el caso del mutante de combinación F100I T123I que tuvo una mayor afinidad hacia CEA comparado con F100I (véase realización ilustrativa 20). También se halló el mutante de combinación T95E T123I; esta combinación tuvo una mayor afinidad hacia CEA que el mutante T95E (véase realización ilustrativa 19).

- 50 En consecuencia, el objeto de la invención se resuelve definiendo realizaciones preferidas de un ligando de adhesina mejorado con respecto a afinidad hacia CEA y/o NCA, donde las realizaciones en cada caso tienen cualquier combinación posible de los mutantes individuales enumerados en la secuencia de consenso 1.

Las realizaciones ilustrativas enumeradas demuestran que el método de evaluación nHybrid/Two-Hybrid utilizado en la presente memoria permite que se generen mutantes de combinación que tienen mayores afinidades hacia CEA y/o NCA llevando a cabo ciclos repetitivos.

3. Mutagénesis múltiple

Estos experimentos se llevaron a cabo en el sistema nHybrid (EP1721974 A1).

Primero se empleó DraE T88M N77K I111V (TM = mutante triple) como molde de mutagénesis, en segundo lugar se usó DraE T88M N77K I111V I114V V116A (FM = "Fünffachmutante" [mutante quintuple]), que tiene incluso mayor afinidad hacia CEA.

Realización ilustrativa 27 – Posición 39 – alanina

a) TM como molde

La evaluación cuantitativa se llevó a cabo como se describe en el documento EP1721974 A1; además, se realizó una re-evaluación (ver arriba).

(i) Secuenciación y evaluación de prototipos

La secuenciación del DNA de los prototipos después de la transformación en bacterias produce el siguiente orden de mutantes con mejor afinidad hacia CEA, en base a la frecuencia de prototipos identificados:

$S > G > D = H > Q > WT$

Con DraE T88M N77K como molde, el orden de los mutantes mejorados fue $Q > S > D > M > G > F$, lo que significa que TM probablemente tenga una estructura alterada que resulta en diferentes mutantes o en los mutantes conocidos en un orden distinto hallado en la posición 39.

b) FM como molde

La evaluación cuantitativa se llevó a cabo como se describe en el documento EP1721974 A1; además, se realizó una re-evaluación (ver arriba).

(i) Secuenciación y evaluación de prototipos

La secuenciación del DNA de los prototipos después de la transformación en bacterias produce el siguiente orden de mutantes con mejor afinidad hacia CEA, en base a la frecuencia de prototipos identificados:

$S > WT$

Con DraE T88M N77K como molde, el orden de los mutantes mejorados fue $Q > S > D > M > G > F$, lo que significa que FM probablemente tenga una estructura alterada que resulta en diferentes mutantes o en los mutantes conocidos en un orden diferente hallado en la posición 39.

c) Comparación de los dos moldes

TM: $S > G > D = H > Q > WT$

FM: $S > WT$

Realización ilustrativa 28 – posición 41 – isoleucina

a) TM como molde

La evaluación cuantitativa se llevó a cabo como se describe en el documento EP1721974 A1; además, se realizó una re-evaluación (ver arriba).

(i) Secuenciación y evaluación de prototipos

La secuenciación del DNA de los prototipos después de la transformación en bacterias produce el siguiente orden de mutantes con mejor afinidad hacia CEA, en base a la frecuencia de prototipos identificados:

$V > L > T > WT$

Esto significa que una mutación en este sitio mejora la afinidad hacia CEA, incluso con TM como molde; en este caso, el mismo espectro de mutantes aparece como con DraE T88M N77K como molde. Este hecho sugiere que la modificación estructural en TM no afecta en gran medida la posición del aminoácido 41.

b) FM como molde

La evaluación cuantitativa se llevó a cabo como se describe en el documento EP1721974 A1; además, se realizó una re-evaluación (ver arriba).

(i) Secuenciación y evaluación de prototipos

La secuenciación del DNA de los prototipos después de la transformación en bacterias produce el siguiente orden de mutantes con mejor afinidad hacia CEA, en base a la frecuencia de prototipos identificados:

L > WT

- 5 Con DraE T88M N77K como molde, L se había detectado como un mutante ligeramente mejorado; V fue el mejor mutante. Esto significa que FM probablemente tenga una estructura alterada que resulta en diferentes mutantes o en los mutantes conocidos en un orden distinto que se halla en la posición 41.

c) Comparación de los dos moldes

TM: V > L > T > WT

- 10 FM: L > WT

Realización ilustrativa 29 – posición 47 – glutamina

a) TM como molde

La evaluación cuantitativa se llevó a cabo como se describe en el documento EP1721974 A1; además, se realizó una re-evaluación (ver arriba).

- 15 (i) Secuenciación y evaluación de prototipos

La secuenciación del DNA de los prototipos después de la transformación en bacterias produce el siguiente orden de mutantes con mejor afinidad hacia CEA, en base a la frecuencia de prototipos identificados:

S > A > C > T > WT

- 20 Con DraE T88M N77K como molde, el orden de los mutantes mejorados fue T > N = C > S > G = A = P > WT, lo que significa que TM probablemente tenga una estructura alterada que resulta en diferentes mutantes o en los mutantes conocidos en un orden distinto que se halla en la posición 47.

b) FM como molde

La evaluación cuantitativa se llevó a cabo como se describe en el documento EP1721974 A1; además, se realizó una re-evaluación (ver arriba).

- 25 (i) Secuenciación y evaluación de prototipos

La secuenciación del DNA de los prototipos después de la transformación en bacterias produce el siguiente orden de mutantes con mejor afinidad hacia CEA, en base a la frecuencia de prototipos identificados:

S > WT

- 30 Con DraE T88M N77K como molde, el orden de los mutantes mejorados fue T > N = C > S > G = A = P > WT, lo que significa que FM probablemente tenga una estructura alterada que resulta en mutantes diferentes o en los mutantes conocidos en un orden distinto que se halla en la posición 47.

c) Comparación de los dos moldes

TM: S > A > C > T > WT

FM: S > WT

- 35 Estas realizaciones ilustrativas demuestran nuevamente que el método de evaluación nHybrid utilizado en la presente memoria permite que se generen mutantes de combinación con mayores afinidades hacia CEA llevando a cabo ciclos repetitivos.

3. Análisis de degradación *in vivo* de las nanopartículas utilizables de acuerdo con la invención mediante evaluación de alto contenido

- 40 El objetivo de este estudio fue detectar la degradación biológica de la nanopartícula recubierta con dipéptido (núcleo: CdSe, cubierta: ZnS, emisión máxima: 655 nm, diámetro hidrodinámico de aproximadamente 12,5 nm sin ligando de proteínas) en órganos de ratón seleccionados, comparando la fluorescencia en los días 2 y 42 después de la inyección intravenosa de conjugados de nanopartículas fluorescentes en una dosis de 1,7 mg/kg de peso corporal.

Método

5 Seis ratones NMRI recibieron una inyección de 1,7 mg/kg de peso corporal de conjugado de nanopartícula fluorescente (QD655#D416-36-KNH – clon de ligando de proteína 5582 (“Fünfach-Mutante” FM [mutante quintuple], ver arriba) a través de la vena del rabo. Los ratones fueron sacrificados en los días 2 y 42, respectivamente, post-inyección, los órganos se extirparon y se congelaron rápidamente a -80°C.

Preparación de la muestra:

Se pesaron 200 mg del órgano particular y se homogeneizaron con 1 ml de tampón Bicine 500 mM (pH = 8,3) en tubos Cryo y 1 g de esferas de homogeneización (MatrixD de MP Biomedicals) durante 1 min, usando el homogeneizador Fastprep24 (MP Biomedicals). El homogeneizado se dispuso en hielo.

10 Mezcla de embebido para la muestra (todos los volúmenes en μ l)

Disolución de BSA al 30%	106,4
Homogeneizado	213,6
Disolución de glutaraldehído al 25%	17,0

15 La disolución de BSA se introdujo en un recipiente Eppendorf, y después se añadió el homogeneizado, y la muestra se enfrió en hielo durante 2 min. A esto le siguió la adición de la disolución de glutaraldehído y mezclado rápido. En cada caso, se introdujeron con pipeta 200 μ l de las muestras en el pocillo de una placa de microvaloración con fondo cubreobjetos (Greiner). La fijación del glutaraldehído demoró algunos minutos y residió en un gel sólido.

Medición de datos en bruto

20 Se llevó a cabo microscopía usando el sistema Olympus Scan^R con una lente de 60x/1,2 W. Las imágenes de las muestras se generaron usando el software Scan^R Aquisition: se registraron 16 pilas por muestra (= por pocillo) con, en cada caso, 40 marcos/pila, y los marcos se espaciaron a 0,5 μ m. Las imágenes se tomaron en 2 canales en paralelo: el tiempo de exposición en el canal de las nanopartículas (filtro de emisión 655/16) fue 200 ms, y en el canal de la autofluorescencia (filtro de emisión 525/30) fue 1000 ms.

Información con respecto al área y volumen de las imágenes:

Ancho	109 μ m
Longitud	109 μ m
Altura	20 μ m
Volumen/pila	2,38E-10 l
Volumen total	3,80E-09 l

Evaluación de datos en bruto

25 Las nanopartículas se cuantificaron mediante el software Scan^R Analysis. En primer lugar, se generó la proyección máxima de las pilas, a lo largo del eje z hacia un plano, seguido de alisado con una esfera, y finalmente el canal de autofluorescencia ponderado se restó del canal de nanopartículas. El umbral de intensidad para segmentación se estableció en 43.

30 Las nanopartículas encontradas se dividieron mediante compuertas en 3 categorías (pequeña, mediana y grande), siendo el criterio el área de las nanopartículas encontradas, dentro de un corredor sensible definido por la intensidad media (valores en escala de grises en el intervalo de 60 - 400). Las compuertas eran rectangulares y se definieron de la siguiente manera:

pequeña : 4 - 35 píxeles

mediana : 36 – 400 píxeles

grande: 401 – 100 000 píxeles

35 La mayoría de los objetos se encontraron en la compuerta pequeña, la minoría en la grande.

Debido a la aparición de agregados grandes y medianos, no es posible un enunciado cuantitativo exacto, ya que no puede determinarse con exactitud el número de nanopartículas individuales que forman cada agregado. No obstante, se puede hacer un enunciado cualitativo en la distribución y la farmacocinética de las nanopartículas

mediante la fluorescencia como el parámetro sin dimensiones que es aproximadamente proporcional al número de nanopartículas en un agregado.

Cálculo de la fluorescencia sin dimensiones:

5 El número de objetos se multiplica con la intensidad total media (intensidad de fluorescencia total promedio por objeto) de la clase particular de nanopartículas.

Objetos x intensidad media = fluorescencia

Se calculó la fluorescencia de los homogeneizados de hígados, bazos y pulmones en los días 2 y 42 y se determinaron sus su promedios. La fluorescencia en el día 2 se normalizó en cada caso hasta 100%.

10 Los resultados se compilan en la fig. 16. Según esto, solamente 0,54% de fluorescencia fue detectable en el hígado, solamente 4,97% de fluorescencia fue detectable en el bazo y solamente 18,66% de fluorescencia fue detectable en el pulmón en el día 42, en comparación con el día 2. Esto indica que las nanopartículas acopladas a adhesina de la invención se degradan *in vivo*.

REIVINDICACIONES

1. Adhesina que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias
- a. grupo DraE como se muestra en la Figura 5
 - 5 b. DraE/AfaE-III como se muestra en la Figura 6
 - c. DraE como se muestra en la Figura 1
- donde la adhesina tiene una o más de las siguientes mutaciones y puede tener una eliminación N-terminal de hasta 18, preferiblemente hasta 12, 10 o 5, y/o C-terminal de hasta 10, preferiblemente hasta 8 o 5 aminoácidos:
- T7(N, F, C, S, V, R, A, I, L, Y); E17 (S, P, K, G,
 10 D, R, N, H, Q); R22(T, A, S, N, K); D25(S, G, N,
 A, T, K, R, H, Q, M); T27(K, R, L, V, Y, P, N, Q);
 V28(W, F); A29(K, R, S, E, Q, F, G, L, H, P, N,
 T, W); T31(G, D, S, N); Q34(D, G, S, N, L, V, T,
 A); D37N; A38(S, T, L); A39(Q, S, D, M, G, F);
 15 I41(V); Q47(T, N, C, S, G, A, P); D52(G, N, S,
 C, P, Q, Y, H, K, R, T); N84(D, S, H); R86V; T88
 (M, L); T95(L, M, Y, F, C, W, Q, N, E, S, I, H);
 F100(Y, V); V105(S, A, T, R, M, V, P, N, E, Q,
 G, K, H); I111(C, V, H, Y, T, M, F) I114(V, L, A,
 20 C); Y115(T, W, E, V); V116(A, S, L); G118(P, S),
- donde la adhesina tiene por lo menos una más de las mutaciones anteriormente mencionadas, si están presentes las mutaciones T88M y/o N77K.
2. La adhesina de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque es capaz de unirse a la secuencia N-terminal de una proteína de unión que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las siguientes secuencias
- 25 a. CEA/NCA (secuencia de la Fig. 9)
 - b. CEA (secuencia de la Fig. 10) y/o NCA (secuencia de la Fig. 11).
3. La adhesina de acuerdo con alguna de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizada porque la adhesina tiene una afinidad hacia la proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 2, en particular hacia la secuencia N-terminal de CEA, que está mejorada en por lo menos 5%, preferiblemente en por lo menos 100%, en particular por lo menos 300% o 500% en comparación con aquella de tipo natural.
- 30 4. La adhesina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque tiene una o más de las siguientes mutaciones:
- V28W; V28F; A39Q; A39S; I41L; Q47S; Q47T;
 35 I85L; G118S and T123I.
5. La adhesina que tiene una secuencia de acuerdo con la Fig. 15.
6. Nanopartícula, conjugada a una adhesina de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriormente expuestas.
7. Nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizada porque tiene un núcleo inorgánico y una capa de pasivación, donde el diámetro más pequeño del núcleo inorgánico junto con la capa de pasivación no tiene más de 15 nm, preferiblemente no más de 10 nm, especial y preferiblemente no más de 5 nm.
- 40 8. Nanopartícula de acuerdo con alguna de las reivindicaciones 6 o 7, caracterizada porque la nanopartícula no es inerte.

9. El uso de la adhesina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o de la nanopartícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 para la preparación de un agente de contraste para uso médico.

10. El uso de la adhesina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o de la nanopartícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 para la preparación de un agente de contraste para identificar cáncer de intestino, en particular células CRC.

5

Fig. 1, SEC. ID Núm. 1.

,

GFTPSGTTGT TKLTVTEECQ VRVGDLTVAK TRQQLTDAAP IGPVTVQALG 50
CDARQVALKA DTDNFEQGKF FLISDNKRDK LYVNIRPTDN SAWTTDNGVF 100
YKNDVGSWGG IIGIYVDGQQ TNTPPGNYTL TLTGGYWAK . 139

CLUSTAL 2.0.8 alineación de secuencia múltiple de, en cada caso, una representativa de cada grupo de adhesina (acc. to Korotkova, 2007)

Fig. 2

```

AfaE-5      AFTGSGTGTTLVTEQCQVLVTGSD--VTKTRGELTDGARVGLVVTAKGCNT-EHAA 57
DraE-122    AFTASGNTGTTKLVTEQCQVWVTGSA--STKTRGELIDGARVGLSLMARGCNT-EHAA 57
DraE        GFTPSGTTGTTKLVTEECQVRVGLT--VAKTRGQLTDAAPIGPVTVQALGCDA-RQVA 57
SM254       QFSYSGNTGIVKVIIVTEECIQVGF--TTKPRSQLTNGAAIGPINTARGCDT-RQIA 57
DeaE        TFQASGTTGTTLVTEECRVQGVNVT--ATLRSKLKDDTAIGVIGVTALGCNG-LQAA 57
AfaE-2      -AVDKHATGYTLNVTECAVHLTDNT--ESLRKLDLTEKLLAGVGLSATGCAN-SKVA 56
AfaE-1      NFTSSGTMGKVDLITTEECRVVESKS--ESFLRSLVANRHITNLGIQSTGCCGTCORVA 58
NfaE-111    GIRLGTATASGTLINMESCTVNLTIATPDAKMNRACHQENREITKFKYASNDCTPTDYAV 60
            x'q :;0 *.*:; : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
            : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

AfaE-5      LRAQPDNYHQK-IVLIRDDYQARINVRLOAT-----DGRAWNTNGDVTYRADAGNUGGS 111
DraE-122    LRAQADNYHNGK-IVLLREDOQARINVRIVAS-----DGGQUTNDGATTYRDAAGDUGGS 111
DraE        LKADTDNFEQK-FFLISDMNRDKLYVNIPT-----DNSAUTTDNGVFKNDVGSUGGI 111
SM254       LQAGADNIEGDK-LYMRSDNGGDKLYVLSAL-----DGSNUTTDNGVFNTPGNUGGT 111
DeaE        LQADPDNYDATN-LYMTSRN-HDKLNVKPKAT-----DGSUTYNGVFKYKTEGNGWGGH 110
AfaE-2      FSADAGNLKGTN-ILLKADKTSFIPVYWEATATAAGDDSHNWTATTEGIHRNSNGPWEGT 115
AfaE-1      LKLGAGSYDDTNGAHTHEMGTDKLVSMGSA-----TGDGTQDGGVYIINRDGNWNGQ 112
NfaE-111    WFKRIDNVANGI--AOGKSEYQTRFYLRMAST-----NGTESQKDISVGNKTKGGLSGKL 113
            .. : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

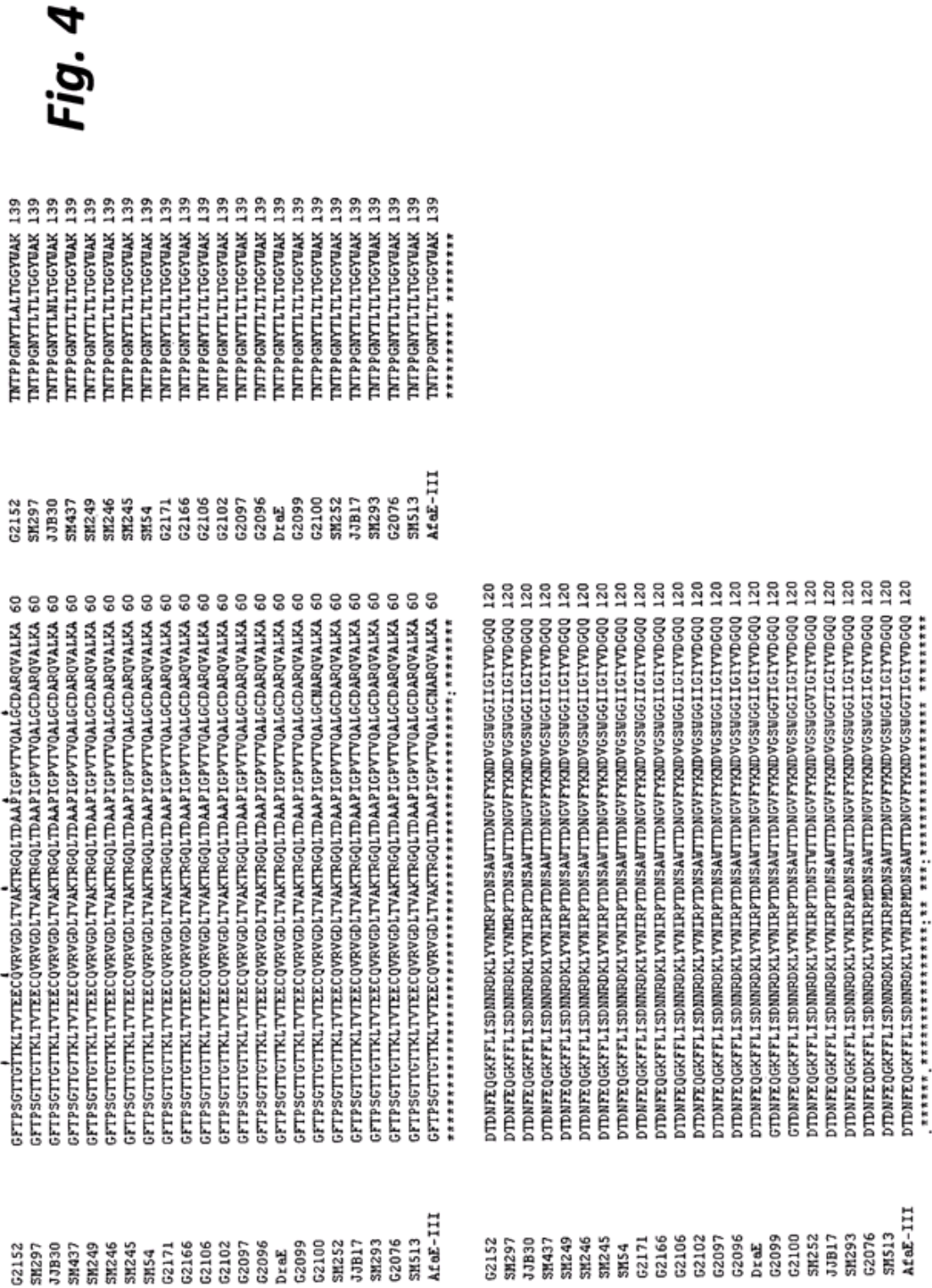
AfaE-5      LF-----VVVDGDNVDKPTGSYTLNLDGUYVVS 139
DraE-122    LY-----VVVDGDNVTSNOAGSYTLNMDGGYVAS 139
DraE        IG-----IYVDGQQTNPFGNYTLTLTGGYUAK 139
SM254       IG-----VKVQGDQTRTPFGNYTLTLTGGYUAK 139
DeaE        VG-----ISVDGNQTDKPTGEYTLNLTGGYUIN 138
AfaE-2      IR-----LRVIGDQTSAKAQAYTLVNLGGTWIE 143
AfaE-1      MV-----FIVRNDQOHLPTGKYTLNLEGGFWTK 140
NfaE-111    ANGAFEGKITLAQDITGVPVDVYTYNLMMAAVYSQ 147
            . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
            ** : : : : :
    
```

sin secuencia de señal

Fig. 3, SEC ID Núm. 2

XXXXXXXXXXXXXXXXEXXXXXXXXXX--XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCXX-
XXXXXXXXXXXXXXXXXX-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-----
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXGXXXXXXXX- ---- -XXXXXXXXXXXXXXXXXYTXXXXXXXXXXXX

CLUSTAL 2.0.8 alineación de secuencia múltiple de adhesinas del grupo DraE (acc. to Korotkova, 2007)



GFTPSGTTGTTKLTVTEECQVRVGDLTVAKTRGQLTDAAPIGPVTVQALGCXARQVALKAXT
DNFEQXKFFLISDNKRDKLYVNXPXDNSXWTTDNGVIFYKNDVGSWGGXIGIYVDGQQTNTP
PGNYTLXLTGGYWAK

Fig. 5, SEC ID Núm. 3

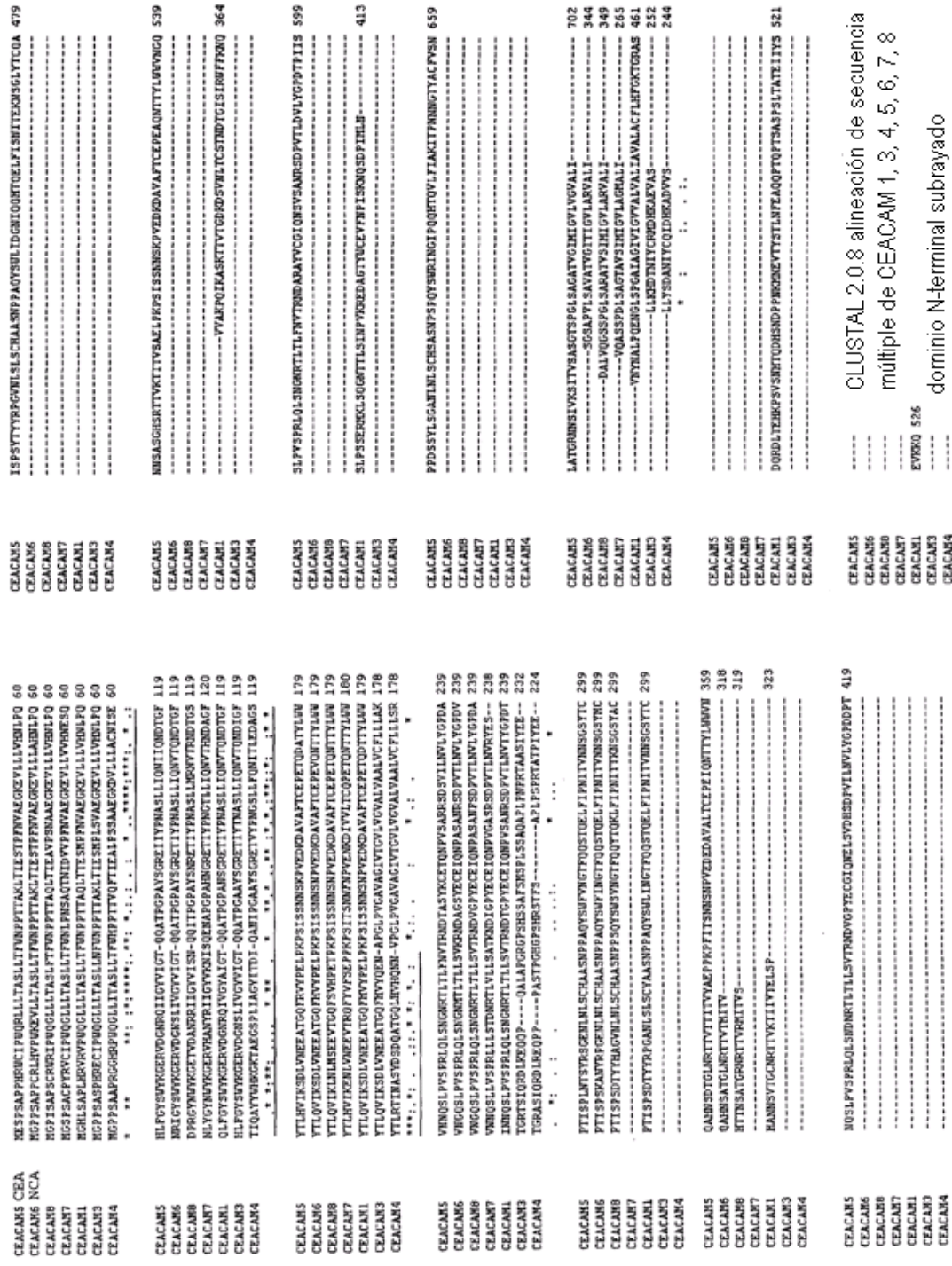
GFTPSGTTGTTKLTVTEECQVRVGD LTVAKTRGQLTDAAPIGPVTVQALGCXARQVALKADT
DNFEQGKFFLISDNNRDKLYVNI RPXDNSAWTTDNGVIFYKNDVGSWGGXIGIYVDGQQTNTF
PGNYTLTLTGGYWAK

Fig. 6, SEC ID Núm. 4

XXXXXXXXPXXXAEGKXVLLXXXNXXXXXXXXYXWXKGXXXXXXXXIXGYXXX-
QXXXPGXAXXXREXXYXNXXLLXNXXXXDXGYTLXIXXXXXXXXXXTXQXXVXXXXXXXXPX
XXXXXXXXXXXXXXXXVXXXXXXXXXXXXXXXXLXXXXXSXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXAXXXXXXXXXXXXXYXX

Fig. 7, SEC ID Núm. 5

Fig. 8



KLTIESTPFNVAEGKEVLLLXHNLPQXXXGYSWKGERVDGNXXIXGYVIGTQQATPGPAYS
GREXIYPNASLLIQNXXQNDTGFYTLXVIKSDLVNEEATGQFXVYPELPKPSISSNNSXPVE
DKDAVAFTCEPEXQXXTYLWWVNXQSLPVS PRLQLSNGNXTLTLXXVXRNDXXSYXCEXQNP
XSAXRSDXVXLNVLYGPDPTISPXXXXYRXGENLNLSCHAASNPPAQYSWFXNGTFQQSTQ
ELFIPNITVNNSGSYXCOAHNSXTGLNRTTVTXITVYAEPKPFITSNNSNPVEDEDAVALT
CEPEIQNTTYLWWVNAHNSATGLNRTTVTMITVQSLPVS PRLQLSNDNRTLTL LSVTRNDV
GPYECGIQNELSVDHSDPVILNVLYGPDDPTISPSYTYRPGVNL SLSCHAASNPPAQYSWL
IDGNIQQHTQELFISNITEKNSGLYTCQANNSASGHSRTTVKTI TVSAELPKPSISSNNSKP
VEDKDAVAFTCEPEAQNTTYLWWVNGQSLPVS PRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDARAYVCGIQ
NSVSANRSDPVTLDVLYGPDPTIISPDPSSYLSGANLNLSCHSASNPSPOYSWRINGIQQH
TQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGXXPXSAXATVGIXIGVLXX
VALI

Fig. 9, SEC ID Núm. 6

KLTIESTPFNVAEGKEVLLL VHNLPQH LFGYSWYKGERVDG NRQI IGYVIGTQQATPGPAYS
GREIIYPNASLLIQNI IQNDTGFYTLHVIKSDLVNEEATGQFRVYPELPKPSISSNNSKPVE
DKDAVAFTCEPETQDATYLWWVNNQSLPVS PRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDTASYKCETQNP
VSARRSDSVILNVLYGPDAPTISPLNTSYRSGENL NLSCHAASNPPAQYSWFVNGTFQQSTQ
ELFIPNITVNNSGSYTCQAHNSDTGLNRRTVTTITVYAEPPKPFITSNNSNPVEDEDAVALT
CEPEIQNTTYLWWVNNQSLPVS PRLQLSNDNRTLTL LSVTRNDVGPYECGIQNELSVDHSDP
VILNVLYGDDPTISPSYTYRPGVNLSLSCHAASNPPAQYSWLIDGNIQQHTQELFISNIT
EKNSGLYTCQANNSASGHSRTTVKTI TVSAELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPEAQNT
TYLWWVNGQSLPVS PRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDARAYVCGIQNSVSANRSDPVTLDVLYG
PDTPIISPDSYLSGANL NLSCHSASNPSQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYA
CFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAGATVGMIGVLVGVALI

Fig. 10, SEC ID Núm. 7

KLTIESTPFNVAEGKEVLLLAHNLPQNRI GYSWYKGERVDGNSLIVGYVIGTQQATPGPAYS
GRETIYPNASLLIQNVTONDTGFYTLQVIKSDLVNEEATGQFHVYPELPKPSISSNNSNPVE
DKDAVAFTCEPEVQNTTYLWWVNGQSLPVS PRLQLSNGNMTLTLLSVKRNDAGSYECEIQNP
ASANRSDPVT LNVLYGPDVPTISPSKANYRPGENLNLSCHAASNPPAQYSWFINGTFQOSTQ
ELFIPNITVNNSGSYMCQAHNSATGLNRRTVTMITVSGSAPVLSAVATVGITIGVLARVALI

Fig. 11, SEC ID Núm. 8

Fig. 12

GFTPSGTTGT	TKLTVTECQ	VRVGLTVAK	TRGOLTDAA	IGPVTVOALG	50
N	S	T S KWK	G D NSQ	V	I
F	P	A G RFR	D G TS		N
C	K	S N L S	S S LD		C
S	G	N A V E	N N M		S
V	D	K T Y Q	L G		G
R	R	K P F	V F		A
A	N	R N G	T		P
I	H	H Q L	A		
L	Q	Q H			
Y		M P			
		N			
		T			
		W			
CDARQVALKA	DTDNFEQKF	FLISDNKRDK	LYVNIRPTDN	SAWTTDNGVF	100
G		D V M		L Y	
N		S L		M V	
S		H		Y F	
C				C W	
P				Q N	
Q				E E	
Y				S S	
H				I I	
K				H H	
R					
R					
T					
YKNDVGSWGG	IIGIYVDGQQ	TNTPPGNYTL	TLTGGYWAK		139
S	C VTA P				
A	V LWS S				
T	H AEL				
R	Y CV				
M	T M				
V	M F				
P					
N					
E					
Q					
G					
K					
H					

Fig. 13

```

GFTFSGTTGT TKLTVTEECQ VRVGDLTIVAK TRGQLTDAAP IGFVTVQALG 50
N S P T S KMK G D NSQ V T
F A G RFR D G TS N
C K S N L S S LD C
S G N A V E N N M S
V D K T Y Q L G G
R R K P F V F A
A N R N G T A
I H H Q L H A
L Q Q M P N
Y Y N T W

CDARQVALKA DTDNFEQCKF FLISDNKRDK LYVNIRPTDN SAWTTDNGVF 100
G D V M L Y
N S S H S L M Y
C P Q Y H K R T H F C W Q N E S I
T YKNDVGSWGG IIGIYVDGQQ TNTPPGNYTL TLTGGYWAK 139
S C V LWS S
A V H AEL
R R Y CV
M V T M F
P P N E Q G K H
    
```

Fig. 14

```

GFTPSGTTGT TKLTVTEECQ VRVGDLTIVAK TRGQLTDAAP IGPVTVQALG 50
N S T S KWK G D NSQ V T
F P A G RFR D G TS N
C K S N L S S LD C
S G N A V E N N M S
V D K T Y Q L G G
R R K P F V F A
A N R N G T T P
I H Q H Q L A
L C Q H
Y M P N N T W

CDARQVAKA DTDNFEQCKF FLISDNKRDK LYVNIRPTDN SAWTTDNGVP 100
G D V M L Y
N S C P Q Y H K R T
S H S L M Y F C W Q N E S I H
YKNDVGSWGG IIGIYVDGQQ TNPFGNYTL TLITGGYWAK 139
S C VTA P
A V LWS S
T H AEL
R R Y CV
M V T M F
P N E Q G K H

```

EECQVRVGDLTVAKTRGQLTDAAPIGPVTVQALGCDARQVALKADTDNFEQGKFFLISDNKR
DKLYVNIRPMDNSAWTTDNGVIFYKNDVGSWGGVIGVYADGQQTNTPPGNYTLTLTGGYWAKD
NKQGFTPSGTTGTTKLTVT

Fig. 15, SEC ID Núm. 12

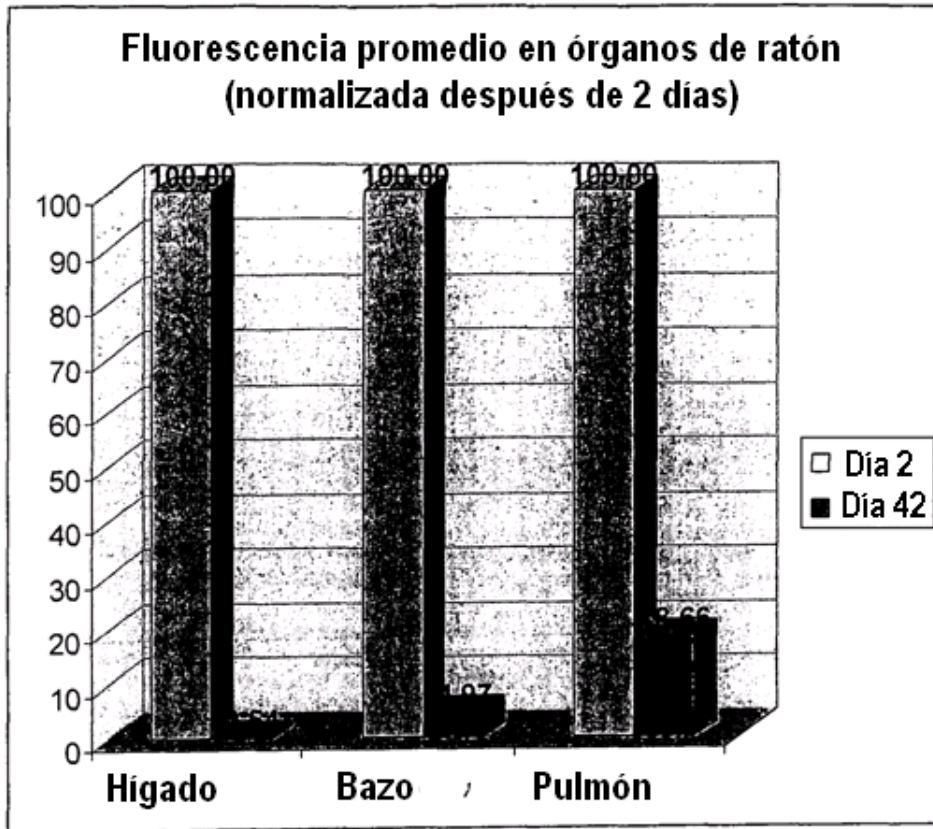


Fig. 16