

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 957**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2004 E 10009913 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2013 EP 2277548**

54 Título: **Nanopartículas magnéticas ligadas a un ligando**

30 Prioridad:

09.06.2003 GB 0313259

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

25.04.2013

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTIFICAS (50.0%)
Calle Serrano, 117
28006 Madrid, ES y
MIDATECH LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PENADES, S.;
MARTIN-LOMAS, M.;
MARTINES DE LA FUENTE, J. y
RADEMACHER, THOMAS WILLIAM**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 401 957 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

Nanopartículas magnéticas ligadas a un ligando

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a nanopartículas magnéticas, y en particular a nanopartículas magnéticas que tienen ligandos inmovilizados y a su uso en el tratamiento del cáncer.

10 **Antecedentes de la invención**

[0002] El desarrollo de metodologías para producir nanopartículas con propiedades biosensibles ha abierto el camino para producir herramientas útiles para los diagnósticos moleculares, la terapéutica y la biotecnología [1]. Las nanopartículas coloidales metálicas, semiconductoras y magnéticas son actualmente objeto de un intenso estudio para posibles aplicaciones [2].

[0003] Se han fabricado nanopartículas que contienen materiales paramagnéticos tales como óxido de hierro que presentan propiedades magnéticas excepcionalmente fuertes bajo campos magnéticos externos. Estas nanopartículas magnéticas pueden usarse en muchas aplicaciones biomédicas que incluyen separación de células, marcado de células y de tejidos *in vivo*, mejora del contraste en la obtención de imágenes de resonancia magnética, elección de tumores como diana, terapias de hipertermia y administración de fármacos.

[0004] Para tales aplicaciones, las nanopartículas deberán ser preferentemente suficientemente pequeñas para evitar provocar una respuesta inmunitaria y ser captadas por células, si es necesario. También es útil si el tamaño de las partículas puede controlarse, ya que las partículas deberán ser de aproximadamente el mismo tamaño de forma que muestren las mismas propiedades magnéticas. Las partículas también deberán ser preferentemente químicamente estables de forma que no sean descompuestas por el cuerpo.

[0005] También se prefiere que las nanopartículas magnéticas para uso en biomedicina sean solubles, especialmente en agua, con el fin de que puedan almacenarse y administrarse eficazmente. Idealmente, tales partículas serían estables en disolución y no se agregarían, tanto cuando se almacenaran antes de uso como en el cuerpo. Las nanopartículas magnéticas tienden a aglutinarse juntas en disolución debido a que se atraen entre sí. Si esto ocurriera en el cuerpo, obstaculizaría la circulación sanguínea y posiblemente sería peligroso; en disolución coloidal harían que el coloide fuera difícil de usar.

[0006] Previamente, las partículas de óxido de hierro comercialmente disponibles se han usado en clasificación y separación de células [3]. Las nanopartículas magnéticas monodispersas de Fe/Pt [4], Co y Co/Fe [5], Fe [6] y óxidos de hierro [7] se han sintetizado recientemente por química de disolución para aplicaciones en materiales [8]. También se han descrito nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con dextrano reticulado para evitar aglutinación, véase por ejemplo el documento WO 03/005029.

[0007] Idealmente, las nanopartículas magnéticas están fabricadas de metal magnético elemental en vez de óxido metálico ya que el metal elemental es un mejor potenciador de la obtención de imágenes magnéticas. Sin embargo, tales nanopartículas son frecuentemente químicamente inestables, ya que el metal puede oxidarse. Una posibilidad para aumentar la estabilidad química de las nanopartículas magnéticas es sintetizarlas a partir de un metal magnético con un metal pasivo para estabilizar el metal magnético.

[0008] El documento US 2002/0068187 desvela nanopartículas con núcleo-envoltura de oro-hierro protegidas con tensioactivo sintetizadas por medio de micelas inversas. Sin embargo, este procedimiento es complejo, requiriendo tres etapas de síntesis. La composición multicapa de las partículas resultantes también aumenta el límite de tamaño inferior para las partículas, que puede ser una desventaja si se requieren partículas muy pequeñas [14].

[0009] Jordon et al. (1999) describen el tratamiento contra el cáncer con la excitación inducida por un campo magnético AC de nanopartículas superparamagnéticas (óxido de hierro) biocompatibles.

[00010] Gordon et al. (1999) describe el tratamiento contra el cáncer a través de alteraciones de la temperatura intracelular y biofísicas utilizando nanopartículas magnéticas.

[00011] Benderbous y Bonnemain (1996) describen macromoléculas biológicas unidas a lantánidos y nanopartículas de óxido de hierro ultrapequeñas para el uso en agentes de contraste de resonancia magnética e imágenes de perfusión.

[00012] La patente de EE.UU. n°: 6.254.662 da a conocer el uso de nanopartículas de aleaciones de FePt y CoPt para formar finas películas nanocristalinas sobre una superficie sólida para uso en la fabricación de medios de

grabación de densidad ultra-alta. Otros usos de las películas se mencionan en la patente, que incluyen el uso como películas de polarización magnética y puntas magnéticas para microscopía de fuerza magnética, pero no se prevén aplicaciones biomédicas.

5 **[0013]** Para muchas de las aplicaciones descritas anteriormente es necesario ligar las nanopartículas a moléculas biológicamente activas tales como ligandos que se unen a moléculas intracelulares o extracelulares. Tales ligandos pueden ser, por ejemplo, hidrato de carbono, ácido nucleico o proteína.

10 **[0014]** La patente de EE.UU. nº: 6.514.481 desvela nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con una envoltura de sílice en las que la envoltura está ligada a una molécula que elige diana tal como un péptido mediante una molécula espaciadora. Los documentos WO 02/098364 y WO 01/19405 desvelan nanopartículas magnéticas de óxido metálico recubiertas con dextrano y funcionalizadas con péptidos y oligonucleótidos.

15 Se han usado estrategias similares para preparar nanopartículas para el mercado intracelular [9] y como nanosensores [10]. Todos estos procedimientos son procedimientos de múltiples etapas que requieren mucho tiempo que requieren que las nanopartículas se recubran con dextrano o sílice, que las nanopartículas recubiertas se funcionalicen de forma que se unan al ligando, y finalmente que el ligando se una a las nanopartículas.

20 **[0015]** El documento WO 03/073444 desvela nanopartículas superparamagnéticas que tienen un núcleo formado de átomos de los metales Au y Fe en una relación de al menos 3:7. La solicitud dice que los ligandos pueden ligarse al núcleo mediante un grupo sulfuro y que las nanopartículas se usan para formar dispositivos nanoelectrónicos. Los núcleos de las nanopartículas tienen diámetros en el intervalo de 5 nm a 50 nm.

25 **[0016]** El documento WO 02/093140 desvela nanoalambres magnéticos que comprenden uno o más segmentos y grupos funcionales o ligandos asociados a al menos uno de dichos segmentos. Los nanoalambres tienen un diámetro en el intervalo de aproximadamente 10-300 nm y una longitud de 10 nm a decenas de micrómetros. Los segmentos de los nanoalambres pueden formarse a partir de materiales tales como oro, plata, platino, cobre, hierro y cobalto en forma pura o aleada y los grupos funcionales pueden ser átomos o grupos de átomos que pueden tener más reactividad química tal como reaccionar con un ligando para unir el ligando al alambre, o para unirse a una molécula diana.

30 **[0017]** Aunque se propone una variedad de posibles formas de asociar los ligandos y los nanoalambres, los ejemplos se basan en la interacción iónica entre ligandos que contienen grupos ácido carboxílico y el nanoalambre.

35 **[0018]** La patente de EE.UU. nº: 6.531.304 desvela un coloide a escala nanométrica formado a partir de aleaciones metálicas que se hace reaccionar y se une no covalentemente a un "modificador" de polisacárido o de azúcar.

40 **[0019]** El documento WO 02/32404 desvela nano-herramientas solubles en agua para estudiar interacciones mediadas por carbohidratos [11], [12]. Estas herramientas son gliconanopartículas de oro y gliconanopuntos de sulfuro de cadmio que incorporan antígenos de hidrato de carbono. Estos nanopuntos de oro y semiconductores solubles en agua son estables durante meses en disoluciones fisiológicas y presentan tamaños de núcleo excepcionalmente pequeños. Son resistentes a glicosidasas y no presentan citotoxicidad. También son plataformas útiles para estudios básicos de interacciones de carbohidratos [13] y son herramientas para aplicaciones biotecnológicas y biomédicas. Sin embargo, estas nanopartículas no son magnéticas.

45 **[0020]** Por tanto, hay una necesidad continua en la materia de nanopartículas magnéticas estables que estén unidas a ligandos para hacerlas adecuadas para usos biomédicos que pueden sintetizarse a un tamaño deseado, y que pueden producirse mediante un procedimiento de síntesis fidedigno simple.

50 **Características de la invención**

55 **[0021]** En líneas generales, la presente invención proporciona una composición que comprende nanopartículas magnéticas para utilizar en un método de tratamiento de un cáncer, mediante la introducción de las nanopartículas en un paciente y la aplicación de un campo magnético de alta frecuencia para eliminar las células cancerosas. La presente invención proporciona nanopartículas que tienen núcleos de átomos metálicos seleccionados entre átomos de oro, platino, plata o cobre, teniendo los núcleos un diámetro inferior a 2,5 nm. Según la presente invención, los núcleos están unidos covalentemente a un conjunto de ligandos, por lo menos uno de los cuales comprende un grupo carbohidrato.

60 **[0022]** En una realización de la presente invención, el núcleo tiene un diámetro inferior a 2,0 nm y el núcleo está formado de átomos de oro. Los ligandos pueden comprender un grupo polisacárido, un oligosacárido o un monosacárido o un glicanoconjugado y pueden estar unidos adicionalmente al núcleo a través de un grupo sulfuro. Adicionalmente, la composición de la presente invención puede ser un coloide.

[0023] En una realización adicional, las nanopartículas de la presente invención son solubles en agua. Adicionalmente, las nanopartículas de la presente invención pueden comprender además un péptido, ADN o ARN.

[0024] La composición, según la presente invención, es para utilizar en el tratamiento de un tumor. Las nanopartículas de la presente invención pueden comprender además un ligando que incluye un antígeno específico de tumor para dirigir específicamente las nanopartículas a las células tumorales.

[0025] En una realización adicional de la composición según la presente invención para utilizar en un método de tratamiento de un tumor, el ligando es un antígeno asociado a tumor o un factor autocrino de tumor.

[0026] Como se usa en este documento, el término "metal pasivo" se refiere a metales que no muestran propiedades magnéticas y son químicamente estables a la oxidación.

[0027] Los metales pasivos de la invención pueden ser diamagnéticos. "Diamagnético" se refiere a materiales con todos los electrones apareados que, por tanto, no tienen momento magnético neto permanente por átomo. Los materiales "magnéticos" tienen algunos electrones sin aparear y son positivamente susceptibles a campos magnéticos externos - es decir, el campo magnético externo induce a los electrones para que se alineen con el campo aplicado, de forma que los momentos magnéticos de los electrones están alineados.

[0028] Los materiales magnéticos pueden ser paramagnéticos, superparamagnéticos o ferromagnéticos. Los materiales paramagnéticos no son muy susceptibles a campos magnéticos externos y no conservan sus propiedades magnéticas cuando se quita el campo magnético externo. Los materiales ferromagnéticos son altamente susceptibles a campos magnéticos externos y contienen dominios magnéticos incluso cuando no está presente ningún campo magnético externo debido a que los átomos vecinos cooperan de forma que sus espines electrónicos sean paralelos. Los campos magnéticos externos alinean los momentos magnéticos de dominios vecinos, amplificando el efecto magnético. Partículas muy pequeñas de materiales que normalmente tienen propiedades ferromagnéticas no son ferromagnéticas, ya que el efecto de colaboración no se produce en partículas de 300 nm o menos, de forma que el material no tiene magnetismo permanente. Sin embargo, las partículas todavía son muy susceptibles a campos magnéticos externos y tienen fuertes propiedades paramagnéticas, y se conocen como superparamagnéticas. Preferentemente, las nanopartículas de la invención son superparamagnéticas.

[0029] Se describe en este documento la utilización de las partículas definidas anteriormente para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una patología mejorada mediante la administración del ligando. A modo de ejemplo, esto puede tener lugar cuando el ligando bloquea una interacción mediada por carbohidratos que de otro modo tendería a conducir a una patología.

[0030] En esta realización, la presente invención tiene ventajas con respecto a las soluciones de la técnica anterior para tratar afecciones que implican interacciones mediadas por hidrato de carbono. Como se ha descrito anteriormente, normalmente las interacciones son polivalentes, mientras que el agente usado para tratar las interacciones sólo puede modular frecuentemente una o algunas de estas interacciones. Esto tiene como resultado que es difícil administrar un agente al sitio de la interacción que pueda modular de forma fidedigna la interacción para el efecto terapéutico deseado. A diferencia de este problema, la presente invención proporciona agentes que tienen una pluralidad de ligandos para modular las interacciones mediadas por hidrato de carbono, venciendo posiblemente la dificultad para modular las interacciones polivalentes.

[0031] En realizaciones preferidas de la invención, el diámetro promedio del núcleo es inferior a 2,5 nm. Más preferiblemente, el diámetro promedio del núcleo es inferior a 2 nm. El diámetro promedio se puede medir utilizando técnicas conocidas en el sector, tales como la microscopía electrónica de transmisión.

[0032] El ligando unido al núcleo puede comprender uno o más grupos carbohidratos (sacáridos), por ejemplo, que comprende un grupo polisacárido, un oligosacárido o un sacárido individual tal como se define en las reivindicaciones. El ligando también puede ser un glicanoconjugado, tal como un glicolípido o una glicoproteína. Además del grupo carbohidrato, el ligando puede comprender adicionalmente uno o más de un grupo péptido, un dominio de proteína, una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un segmento de ADN, una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla o doble, una molécula de ARN de cadena sencilla o doble, una molécula de ARN que tiene de 17 a 30 ribonucleótidos, por ejemplo, un ligando siARN o miARN) y/o una sonda fluorescente.

[0033] En otra realización, el ligando puede ser un péptido o una proteína. Éstos pueden ser péptidos que se unen a receptores en una célula o pueden ser anticuerpos o proteínas terapéuticas.

[0034] En una realización adicional, el ligando puede ser una molécula de ácido nucleico. El ácido nucleico puede ser una sonda de oligonucleótido que se une a una secuencia en la célula. Alternativamente, el ácido nucleico puede comprender una secuencia génica codificante para la liberación a una célula.

[0035] Las partículas pueden tener más de una especie de ligando inmovilizado sobre ellas, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 10, 20 ó 100 ligandos diferentes. Alternativamente o adicionalmente pueden emplearse juntos una pluralidad de diferentes tipos de partículas. Los ligandos con múltiples sitios de unión pueden ligarse a una pluralidad de núcleos de nanopartículas, por ejemplo 2, 3 ó 4 partículas. Un ejemplo de esto serían núcleos de nanopartículas unidos a los extremos de polipéptidos o moléculas de ácidos nucleicos.

[0036] En realizaciones preferidas, el número medio de ligandos ligados a un núcleo metálico individual de la partícula es al menos 20 ligandos, más preferentemente al menos 50 ligandos, y lo más preferentemente 60 ligandos.

[0037] Los ligandos están unidos covalentemente al núcleo de las partículas tal como se define en las reivindicaciones. Los protocolos para llevar a cabo esto se conocen en la técnica, aunque el trabajo descrito en este documento es el primer informe de las reacciones que se usan para unir covalentemente ligandos al núcleo de la partícula.

[0038] Esto puede llevarse a cabo haciendo reaccionar ligandos con grupos terminales reductores con oro y hierro bajo condiciones reductoras. Un procedimiento preferido de producción de las partículas emplea restos de hidrato de carbono derivatizados con tiol para acoplar los ligandos a partículas. Por tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de preparación de las partículas anteriormente definidas, por ejemplo, que tiene un núcleo que comprende oro u oro y hierro, núcleo que está covalentemente ligado a una pluralidad de ligandos, comprendiendo el procedimiento:

(a) sintetizar un derivado de sulfuro del ligando; y

(b) hacer reaccionar el ligando derivatizado de sulfuro con HAuCl_4 (ácido tetracloroáurico), y opcionalmente con una sal férrica en la que están presentes átomos de hierro en el núcleo, en presencia de un agente reductor para producir las partículas. Una sal de hierro preferida es FeCl_3 .

[0039] En algunas realizaciones, el ligando se derivatiza con un ligador. Preferentemente, el ligador es un ligador de disulfuro, por ejemplo, un ligador de disulfuro mixto. El ligador puede comprender adicionalmente en la cadena grupos etileno, grupos péptido o aminoácido, grupos polinucleótido o nucleótido. Un grupo ligador a modo de ejemplo se representa por la fórmula general $\text{HO}-(\text{CH}_2)_n-\text{S}-\text{S}-(\text{CH}_2)_m-\text{OH}$ en la que n y m son independientemente número enteros entre 1 y 5. El ligando puede ligarse convenientemente al espaciador mediante un grupo adecuado, y en el caso de los ligadores de disulfuro mixtos preferidos mediante uno de los ligadores de grupos hidroxilo terminales. Si se sintetizan las nanopartículas, el -S-S- del ligador se disocia para formar dos ligadores tio que pueden cada uno unirse covalentemente al núcleo de la nanopartícula mediante un grupo -S-. Por tanto, en una realización preferida, el ligando se derivatiza como un disulfuro protegido. Convenientemente, el ligando protegido de disulfuro en metanol o agua puede añadirse a una disolución acuosa de ácido tetracloroáurico. Un agente reductor preferido es borohidruro de sodio. Otras características preferidas del procedimiento se describen en los ejemplos más adelante.

[0040] La presente invención proporciona una forma de presentar una matriz esférica de ligandos que tiene ventajas con respecto a los otros tipos de matriz propuestos en la técnica anterior. En particular, las nanopartículas son solubles en la mayoría de los disolventes orgánicos y especialmente agua. Esto puede usarse en su purificación y, lo que es más importante, significa que pueden usarse en disolución para presentar el ligando inmovilizado sobre la superficie de la partícula. El hecho de que las nanopartículas sean solubles tiene la ventaja de presentar los ligandos en una conformación natural. Para aplicaciones terapéuticas, las nanopartículas son no tóxicas, solubles y estable bajo condiciones fisiológicas.

[0041] Las nanopartículas magnéticas en disolución forman coloides magnéticos conocidos como ferrofluidos. Los ferrofluidos tienen las propiedades fluidas de un líquido y las propiedades magnéticas de un sólido. Tienen una variedad de aplicaciones, como se describe más adelante. El principal problema encontrado con los ferrofluidos conocidos en la técnica es su falta de estabilidad: debido a que las partículas magnéticas se atraen entre sí, se aglomerarán después de un cierto tiempo. Los procedimientos previamente usados para prevenir la aglomeración incluyen recubrir las partículas con tensioactivos, reticular polímeros o polisacáridos. Si la nanopartícula va a unirse a un ligando o molécula que elige diana se requiere otra etapa de síntesis.

[0042] Las partículas de la presente invención son altamente solubles en agua y, por tanto, son ideales para preparar ferrofluidos. Además, los ferrofluidos resultantes son extremadamente estables y pueden guardarse durante muchos meses sin agregarse. Los ferrofluidos de la invención se han guardado durante un año sin signos de agregación. Los procedimientos del presente documento permiten nanopartículas magnéticas que son estables y que ya están unidas a ligandos funcionales que van a sintetizarse en una única reacción en vez de requerir que las partículas se recubran primero y luego se unan a ligandos.

[0043] La estabilidad puede evaluarse a ojo - una disolución coloidal sigue siendo transparente en ausencia de

aglomeración, pero se vuelve opaca una vez empieza a aglomerarse. Alternativamente, la presencia de floculación puede determinarse por micrografía electrónica de transmisión (TEM), o comparando los espectros de RMN de protones de las partículas en agua deuterada con aquellos de nanopartículas recientemente preparadas. Preferentemente, las partículas magnéticas no mostrarán signos de aglomeración durante al menos un año después de la preparación.

[0044] En el procedimiento descrito en este documento, la formación del núcleo y el enlace covalente del ligando es un procedimiento simultáneo, de manera que la presencia del neoglicoconjugado controla la forma y el tamaño de las nanoagrupaciones. Las gliconopartículas preparadas de esta forma tienen un núcleo menos de 2 nm de diámetro, que es más pequeño que cualquiera de las nanopartículas magnéticas conocidas en la técnica. El comportamiento superparamagnético se muestra a todas las temperaturas y las mediciones con el dispositivo de interferencia de cuántos superconductores (SQUID) también indican la existencia de un componente ferromagnético a temperatura ambiente. Esta propiedad magnética anómala puede ser de importancia para obtener imágenes y separaciones de células.

[0045] Algunos de los siguientes ejemplos ilustran la presente invención tal como se define en las reivindicaciones, otros proporcionan una base útil.

[0046] Las nanopartículas magnéticas y los ferrofluidos de la presente invención se pueden utilizar para el tratamiento del cáncer tal como se define en las reivindicaciones. Las nanopartículas magnéticas pueden usarse para tratamiento hipertérmico de tumores, en el que las nanopartículas magnéticas se inyectan en tumores y se someten a un campo magnético de CA o CC de alta frecuencia. Alternativamente puede usarse luz de IR próximo. Por tanto, el calor generado por la energía magnética de relajación del material magnético destruye el tejido tumoral alrededor de las partículas. En una realización de la presente invención, las células tumorales pueden elegirse específicamente como diana incorporando antígenos específicos de tumor en las nanopartículas. Esto permite que tumores no fácilmente alcanzados por la inyección sean elegidos como diana por las partículas terapéuticas, y se evita destruir células sanas normales.

[0047] Para una frecuencia de excitación dada existe un tamaño de nanopartícula óptimo que proporciona una tasa de absorción específica (SAR) máxima y, por tanto, el calentamiento más eficiente. Por tanto, esta técnica requiere nanopartículas magnéticas con una estrecha distribución de tamaño del núcleo para maximizar la eficiencia de la terapia y minimizar la cantidad de ferrofluido que va a administrarse. Por tanto, las nanopartículas magnéticas de la invención son particularmente muy adecuadas para la presente aplicación ya que el procedimiento de síntesis permite que el tamaño de las nanopartículas se controle estrechamente.

[0048] En otra realización, las nanopartículas pueden ligarse a sustancias terapéuticamente activas tales como anticuerpos o fármacos destructores de tumores. Las propiedades magnéticas de las nanopartículas también pueden usarse para elegir como diana tumores usando un campo magnético para guiar las nanopartículas a las células tumorales. Sin embargo, el uso de un campo magnético solo para dirigir nanopartículas a células tumorales no siempre es factible o preciso, por lo que la presente invención proporciona una ventaja permitiendo que las nanopartículas sean específicamente dirigidas a células tumorales mediante ligandos específicos de tumor. Esto puede permitir que se use menos fármaco y reducir la posibilidad de efectos secundarios, ya que el fármaco sólo se dirige a las células en las que se necesita y no a células sanas.

[0049] Otra ventaja de las nanopartículas de la presente invención es su tamaño excepcionalmente pequeño, que hace que sea más probable que sean captadas por células incluso cuando se ligan a moléculas que eligen diana o terapéuticas.

[0050] Se describe en este documento una estrategia alternativa que puede ser útil en el tratamiento del cáncer ya que muchos antígenos asociados a tumor o factores autocrinos de tumor tienen una base de carbohidratos. En este caso, las nanopartículas podrían proporcionarse como vacunas para cebar el sistema inmunitario para producir anticuerpos que pueden atacar células tumorales que presentan los carbohidratos sobre su superficie. A este respecto, se sabe que muchas células tumorales poseen patrones de glicosilación atípicos que pueden permitir que la respuesta inmunitaria sea estimulada por nanopartículas que van a dirigirse específicamente a células tumorales a diferencia de a células normales sanas. Las nanopartículas también pueden usarse para inhibir metástasis en cáncer, por ejemplo, mediante la migración de células tumorales a través de las células endoteliales.

[0051] La detección no invasiva de metástasis de los ganglios linfáticos clínicamente ocultas en cáncer de próstata ya se ha demostrado usando nanopartículas superparamagnéticas linfotrópicas conjuntamente con MRI. A continuación se enumeran ejemplos de gliconopartículas que pueden tener afinidad o especificidad aumentada por metástasis.

Le^x-GNP
Globo-H-GNP

Le^y-GNP
Gg³-GNP

STn-GNP
Gluco-GNP

Malto-GNP

Lacto-GNP

Man-GNP

[0052] Además de otros ligandos que pueden estar presentes tales como gliconanopartículas, hormonas tales como estrógeno, DHEA, etc., también pueden unirse a las nanopartículas y solubilizarse. Éstas pueden tener uso en la detección de cánceres tales como de mama. Los péptidos también pueden unirse a nanopartículas que se localizan en receptores específicos tales como receptores oncógenos codificados de la superficie celular. También pueden unirse lípidos, en particular aquellos que se unen a receptores toll. Ligandos químicos tales como azul de metileno pueden unirse a las gliconanopartículas que pueden ser útiles en la detección de metástasis de melanoma. Finalmente, pueden prepararse nanopartículas de siARN que, después de la captación en la célula, podrían obtener imágenes de la expresión de ARNm de oncogenes o específico de virus. A continuación, se describirán realizaciones de la presente invención a modo de ejemplo y sin limitación con referencia a las figuras que se acompañan. Algunas de éstas ilustran la invención tal como se define en las reivindicaciones, otras proporcionan una base útil.

Breve descripción de las figuras

15

[0053]

La Figura 1 muestra las curvas de enfriamiento de campo cero (ZFC, símbolos en negrita) y de enfriamiento de campo (FC, símbolos vacíos) para las gliconanopartículas *lacto*-AuFe (a) y las gliconanopartículas *malto*-AuFe (b).

20 La Figura 2 muestra micrografías electrónicas de transmisión (izquierda) e histogramas de la distribución del tamaño de núcleo (derecha) para las gliconanopartículas *lacto*-AuFe (A) y las gliconanopartículas *malto*-AuFe (B).

La Figura 3 representa esquemáticamente la síntesis de las gliconanopartículas magnéticas.

25 La Figura 4 muestra a) el neoglicoconjugado 1 usado para la preparación de las gliconanopartículas *malto*-Au y la micrografía y el histograma de TEM correspondientes; b) RMN ¹H en D₂O y DMSO-d₆ de las nanopartículas *malto*-Au.

La Figura 5 muestra HRTEM de gliconanopartículas *malto*-Au que muestran la estructura de fcc.

30

La Figura 6 muestra bucles de histéresis correspondientes a gliconanopartículas *malto*-Au protegidas con oro-tiol de 1,5 nm a 5K. La magnetización se facilita en uem por gramo de oro, es decir, no se asume contribución de la magnetización procedente del ligando.

35 La Figura 7 muestra cambios en los valores de T₁ (A) y T₂ (B) de gliconanopartículas *malto*-Au con concentración creciente de Gd (III).

La Figura 8 muestra cambios en los valores de r₁ (A) y r₂ (B) de gliconanopartículas *malto*-Au con concentración creciente de Gd (III).

40

Descripción detallada

Composiciones farmacéuticas

45 **[0054]** Las nanopartículas tal como se definen en las reivindicaciones pueden formularse en composiciones farmacéuticas y administrarse a pacientes en una variedad de formas. Por tanto, las nanopartículas pueden usarse como medicamento para el tratamiento de un cáncer.

50 **[0055]** Las composiciones farmacéuticas para administración por vía oral pueden ser un comprimido, cápsula, polvo o forma líquida. Un comprimido puede incluir un vehículo sólido tal como gelatina o un adyuvante o un diluyente inerte. Las composiciones farmacéuticas líquidas incluyen generalmente un vehículo líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Pueden incluirse solución salina fisiológica, o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Tales composiciones y preparaciones contienen generalmente al menos el 0,1% en peso del compuesto.

55

60 **[0056]** La administración parenteral incluye administración por las siguientes vías: intravenosa, cutánea o subcutánea, nasal, intramuscular, intraocular, transepitelial, intraperitoneal y tópica (incluyendo dérmica, ocular, rectal, nasal, inhalación y aerosol), y vías sistémicas rectales. Para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o inyección en el sitio de afección, el principio activo estará en forma de una disolución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógenos y tiene pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Aquellos expertos en la materia saben bien preparar disoluciones adecuadas usando, por ejemplo, disoluciones de los compuestos o un derivado de los mismos, por ejemplo, en solución salina fisiológica, una dispersión preparada con glicerol, polietilenglicol líquido o aceites.

[0057] Además de uno o más de los compuestos, opcionalmente en combinación con otro principio activo, las composiciones pueden comprender uno o más de un excipiente, vehículo, tampón, estabilizador, agente isotonzante, conservante o antioxidante farmacéuticamente aceptables u otros materiales muy conocidos para aquellos expertos en la materia. Tales materiales no deberán ser tóxicos y no deberán interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material puede depender de la vía de administración, por ejemplo, por vía oral o parenteralmente.

[0058] Las composiciones farmacéuticas líquidas se formulan normalmente para tener un pH entre aproximadamente 3,0 y 9,0, más preferentemente entre aproximadamente 4,5 y 8,5, y todavía más preferentemente entre aproximadamente 5,0 y 8,0. El pH de una composición puede mantenerse mediante el uso de un tampón tal como acetato, citrato, fosfato, succinato, Tris o histidina, normalmente empleado en el intervalo de aproximadamente 1 mM a 50 mM. El pH de las composiciones puede ajustarse de otro modo usando ácidos o bases fisiológicamente aceptables.

[0059] Los conservantes se incluyen generalmente en composiciones farmacéuticas para retardar el crecimiento microbiano, prolongando la estabilidad en almacén de las composiciones y permitiendo envases de múltiples usos. Ejemplos de conservantes incluyen fenol, meta-cresol, alcohol bencílico, ácido para-hidroxibenzoico y sus ésteres, metilparabeno, propilparabeno, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio. Los conservantes se emplean normalmente en el intervalo de aproximadamente el 0,1 al 1,0% (peso/volumen).

[0060] Preferentemente, las composiciones farmacéuticas se administran a un individuo en una "cantidad profilácticamente eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" (según corresponda, aunque la profilaxis puede considerarse terapia), siendo esto suficiente para mostrar beneficio al individuo. Normalmente, esto será para producir una actividad terapéuticamente útil que proporciona beneficio al individuo. La cantidad real de los compuestos administrados, y la tasa y el transcurso de tiempo de administración, dependerán de la naturaleza y la gravedad de la afección que está tratándose. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre la dosificación, etc., estará dentro de la responsabilidad de los médicos generales y otros doctores médicos, y normalmente tiene en cuenta el trastorno que va a tratarse, la afección del paciente individual, el sitio de administración, el procedimiento de administración y otros factores conocidos para los médicos. Ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente pueden encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania, 19ª edición, 1995, Handbook of Pharmaceutical Additives, 2ª edición (eds. M. Ash y I. Ash), 2001 (Synapse Information Resources, Inc., Endicott, Nueva York, EE.UU.), y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2ª edición, 1994. A modo de ejemplo, y las composiciones se administran preferentemente a pacientes en dosificaciones de entre aproximadamente 0,01 y 100 mg de compuesto activo por kg de peso corporal, y más preferentemente entre aproximadamente 0,5 y 10 mg/kg de peso corporal.

Anticuerpos

[0061] Las nanopartículas pueden usarse como vehículos para fomentar respuestas de anticuerpos frente a los ligandos unidos a las partículas del núcleo. Estos anticuerpos pueden modificarse usando técnicas que son convencionales en la materia. También pueden producirse anticuerpos similares a aquellos ejemplificados por primera vez aquí usando la enseñanza en este documento conjuntamente con procedimientos conocidos. Estos procedimientos de producción de anticuerpos incluyen inmunizar un mamífero (por ejemplo, ratón, rata, conejo, caballo, cabra, oveja o mono) con la(s) nanopartícula(s). Los anticuerpos pueden obtenerse a partir de animales inmunizados usando cualquiera de una variedad de técnicas conocidas en la técnica, y cribarse, preferentemente usando la unión de anticuerpo a antígeno de interés. El aislamiento de anticuerpos y/o células productoras de anticuerpos a partir de un animal puede ir acompañado de una etapa de sacrificio del animal.

[0062] Como alternativa o complemento a inmunizar un mamífero con una nanopartícula, un anticuerpo específico para el ligando y/o nanopartícula puede obtenerse a partir de una biblioteca recombinantemente producida de dominios variables de inmunoglobulinas expresadas, por ejemplo, usando el bacteriófago lambda o el bacteriófago filamentoso que muestra dominios de unión a inmunoglobulina funcionales en sus superficies; por ejemplo, véase el documento WO92/01047. La biblioteca puede ser sin tratamiento previo, que se construye a partir de secuencias obtenidas a partir de un organismo que no ha sido inmunizado con ninguna de las nanopartículas, o puede ser una construida usando secuencias obtenidas a partir de un organismo que ha sido expuesto al antígeno de interés.

[0063] El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en menores cantidades. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse mediante el procedimiento descrito por primer vez por Kohler y Milstein, Nature, 256:495, 1975, o pueden prepararse por procedimientos recombinantes, véase Cabilly y col., patente de EE.UU. nº. 4.816.567, o Mage y Lamoyi en Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, páginas 79-97, Marcel Dekker Inc, Nueva York, 1987.

- [0064]** En el procedimiento de hibridomas, un ratón u otro animal huésped apropiado se inmuniza con el antígeno por las vías subcutánea, intraperitoneal o intramuscular para provocar que los linfocitos produzcan o puedan producir anticuerpos que se unirán específicamente a las nanopartículas usadas para la inmunización.
- 5 Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Entonces, los linfocitos se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado tal como polietilenglicol para formar una célula de hibridoma, véase Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pág. 59-103 (Academic Press, 1986).
- [0065]** Las células de hibridoma así preparadas pueden sembrarse y hacerse crecer en un medio de cultivo
10 adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma sin fusionar parentales. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.
- 15 **[0066]** Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan expresión de alto nivel estable de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como medio HAT.
- 20 **[0067]** El medio de cultivo en el que están creciendo las células de hibridoma se ensaya para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra las nanopartículas/ligandos. Preferentemente, la especificidad de unión se determina por ensayo de inmunoabsorbancia ligado a enzimas (ELISA). Los anticuerpos monoclonales de la invención son aquellos que se unen específicamente a las nanopartículas/ligandos.
- 25 **[0068]** En una realización preferida de la invención, el anticuerpo monoclonal tendrá una afinidad que es superior a micromolar o una afinidad mayor (es decir, una afinidad superior a 10^{-6} mol) como se determina, por ejemplo, por análisis de Scatchard, véase Munson & Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220, 1980.
- [0069]** Después de identificar que las células de hibridoma producen anticuerpos neutralizantes de la especificidad
30 y afinidad deseadas, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y hacerse crecer por procedimientos convencionales. Medios de cultivo adecuados para este fin incluyen medio Eagle modificado por Dulbecco o medio RPM1-1640. Además, las células de hibridoma pueden hacerse crecer *in vivo* como tumores de ascitis en un animal.
- 35 **[0070]** Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido ascítico o suero por procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía en hidroxapatito, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.
- 40 **[0071]** El ácido nucleico que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención puede aislarse fácilmente y secuenciarse usando procedimientos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos. Las células de hibridoma de la invención son una fuente preferida de ácido nucleico que codifica los anticuerpos o fragmentos de los mismos. Una vez aislado, el ácido nucleico se liga a vectores de expresión o de clonación, que
45 luego se transfectan en células huésped, que pueden cultivarse de manera que los anticuerpos monoclonales se produzcan en el cultivo de células huésped recombinantes.
- [0072]** En el presente documento se describen hibridomas capaces de producir anticuerpo con características de unión deseadas, ya que son células huésped que contienen anticuerpos que codifican ácidos nucleicos (incluyendo
50 fragmentos de anticuerpos) y que son capaces de su expresión. En el presente documento también se describen procedimientos de producción de los anticuerpos que incluyen hacer crecer una célula que puede producir el anticuerpo en condiciones en las que el anticuerpo se produce, y preferentemente se secreta.
- [0073]** Los anticuerpos pueden modificarse en varias formas. De hecho, el término "anticuerpo" debería
55 interpretarse como que cubre cualquier sustancia de unión que tiene un dominio de unión con la especificidad requerida. Por tanto, la invención cubre fragmentos de anticuerpos, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos que incluyen moléculas sintéticas y moléculas cuya forma imita a la de un anticuerpo permitiendo que se una a un antígeno o epítipo, aquí un ligando de carbohidrato como se define en este documento.
- 60 **[0074]** Ejemplos de fragmentos de anticuerpos que pueden unirse a un antígeno u otro componente de unión son el fragmento Fab que está constituido por los dominios VL, VH, Cl y CH1; el fragmento Fd que está constituido por los dominios VH y CH1; el fragmento Fv que está constituido por los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo; el fragmento dAb que está constituido por un dominio VH; regiones CDR aisladas y fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab ligados por un puente disulfuro en la región bisagra.

También están incluidos fragmentos Fv monocatenarios.

[0075] Un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal descrito en el presente documento puede someterse a mutación genética u otros cambios. Se entenderá adicionalmente por aquellos expertos en la materia que un anticuerpo monoclonal puede someterse a las técnicas de tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos, anticuerpos humanizados o moléculas quiméricas que conservan la especificidad del anticuerpo original. Tales técnicas pueden implicar introducir ADN que codifica la región variable de inmunoglobulina, o las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), de un anticuerpo con las regiones constantes, o regiones constantes más regiones estructurales, de una inmunoglobulina diferente. Véanse, por ejemplo, los documentos EP 0 184 187 A, GB 2 188 638 A o EP 0 239 400 A. La clonación y la expresión de anticuerpos quiméricos se describen en los documentos EP 0 120 694 A y EP 0 125 023 A.

Sección experimental

15 Ejemplo 1 - Nanopartículas de Au-Fe

[0076] Se creó un procedimiento de síntesis de gliconopartículas magnéticas covalentemente unidas a ligandos. A modo de ejemplo, se prepararon neoglicoconjugados 1 y 2 derivatizados con tiol de dos oligosacáridos significativos, el disacárido no antigénico maltosa ($\text{Glc}\alpha(1\rightarrow4)\text{Glc}\beta(1\text{-OR})$) y la lactosa antigénica ($\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{Gal}\beta(1\text{-OR})$), para funcionalizar *in situ* nanopartículas magnéticas (Figura 3, esquema 1). La síntesis de los disulfuros 1 y 2 se llevó a cabo por glicosidación de los derivados de maltosa y lactosa convenientemente protegidos con 11-acetiltio-undecanol y 11-acetiltio-3,6,9-trioxa-undecanol, respectivamente [12]. Ambos ligadores se han usado para probar la influencia de su naturaleza hidrófoba o hidrófila en las propiedades del material completo. Los compuestos 1 y 2 se aislaron como formas de disulfuro y se usaron en esta forma para la preparación de gliconopartículas protegidas de oro-hierro. Las gliconopartículas solubles en agua **1-AuFe** (*malto*-AuFe) y **2-AuFe** (*lacto*-AuFe) se obtuvieron en mezclas de metanol/agua usando síntesis de una etapa. FeCl_3 y HAuCl_4 en una relación 1:4 se redujeron con NaBH_4 en presencia de los disulfuros **1** ó **2**. La protección del núcleo de metal con las monocapas de neoglicoconjugado produce nanoagrupaciones altamente estables y biofuncionales. Se han purificado por medio de filtración centrífuga y se han caracterizado por RMN ^1H , UV-vis, ICP, TEM, EDX y SQUID.

[0077] Los análisis de hierro de la partícula, llevados a cabo por medio de espectrometría de emisión atómica por plasma inductivamente acoplado (ICP), indicaron el 0,27% y el 2,81% de contenido de hierro para 1-AuFe y para 2-AuFe, respectivamente. Estos datos se corresponden con una relación promedio de Au:Fe de 5:0,1 y 5:1 respectivamente. La Figura 1 muestra las curvas de magnetización de enfriamiento de campo cero y de enfriamiento de campo obtenidas a partir de las nanopartículas *lacto*-AuFe (A) y *malto*-AuFe (B) por medio del dispositivo de interferencia de cuántos superconductores (SQUID) entre 5k y 300k en un campo de 500Oe. A partir de las mediciones magnéticas se deduce que está presente tanto un comportamiento superparamagnético como ferromagnético entre 5k y 300k. Las mediciones con SQUID confirman el carácter superparamagnético de las gliconopartículas que tienen una temperatura de bloqueo (T_B) inferior a 5K (Fig. 1), que sería de esperar para una nanopartícula magnética de 2 nm de diámetro. El componente superparamagnético se observa claramente a partir de a) el ajuste parcial de la dependencia térmica experimental de la magnetización a la ley de Curie-Weiss; b) la dependencia parcial del bucle de histéresis de la relación entre el campo aplicado y la temperatura (H/T); y c) la diferencia entre las curvas de ZFC y FC.

[0078] La Figura 2 muestra micrografías electrónicas de transmisión (izquierda) e histogramas de la distribución de tamaño del núcleo (derecha) para las nanopartículas *lacto*-AuFe (A) y *malto*-AuFe (B). Cada punto negro se corresponde con una única partícula. Los puntos están regularmente separados por los ligandos (neoglicoconjugado) unidos al núcleo y forman monocapas ordenadas.

[0079] La TEM se registró a una energía del haz de electrones de 200 kV en un microscopio Philips CM200.

[0080] En el caso de la muestra 2-AuFe (*lacto*-AuFe), las gliconopartículas están dispersas, son esféricas y homogéneas. Se evaluó que el diámetro medio de la agrupación de oro/hierro era 2 nm. Se han encontrado unas pocas partículas aisladas con un tamaño de aproximadamente 10 nm en algunas regiones de la red, pero estas partículas no se han incluido en el histograma. En el caso de la muestra 1-AuFe (*malto*-AuFe), la gliconopartícula presenta una distribución bimodal del tamaño de partícula, como se indica por el histograma correspondiente (Fig. 2B). Se han encontrado partículas con un diámetro medio de la agrupación de oro/hierro de aproximadamente 2,5 nm e inferior a 1,5 nm. Es digno de mención la formación espontánea de cadenas alineadas en regiones extendidas de la red, que indica una fuerza magnetostática adicional (Fig. 2B). Este comportamiento podría atribuirse a fuerzas magnéticas dipolo-dipolo o a tunelaje cuántico entre las nanopartículas. La disposición alineada no se observó en las micrografías obtenidas a partir de los nanopuntos de **2-AuFe**, aunque se observa una monocapa altamente ordenada.

Preparación

[0081] MaltoC₁₁SauFe: Se añadió una disolución de FeCl₃ (2 mg; 0,013 mmol; 0,25 equiv) en agua (0,5 ml) a una disolución de disulfuro 1 (80 mg; 0,075 mmol; 3 equiv) en MeOH (11,5 ml) seguido de la adición de una disolución de
5 H₂O₂ (17 mg; 0,05 mmol; 1 equiv) en agua (2 ml). Entonces se añadió NaBH₄ 1 M (52 mg; 1,38 mmol; 27,5 equiv) en pequeñas porciones con agitación rápida. La suspensión negra formada se agitó durante 2 h adicionales y el disolvente se eliminó a vacío. Las gliconanopartículas son insolubles en MeOH, pero solubles en agua.

LactoEG₄SauFe: Se añadió una disolución de FeCl₃ (1 mg; 0,0065 mmol; 0,25 equiv) en agua (0,25 ml) a una disolución de disulfuro 2 (70 mg; 0,07 mmol; 5,5 equiv) en MeOH (12 ml) seguido de la adición de una disolución de
10 H₂O₂ (8 mg; 0,025 mmol; 1 equiv) en agua (1 ml). Entonces se añadió NaBH₄ 1 M (26 mg; 0,69 mmol; 27,5 equiv) en pequeñas porciones con agitación rápida. La suspensión negra formada se agitó durante 2 h adicionales y el disolvente se eliminó a vacío. Las gliconanopartículas son insolubles en MeOH, pero solubles en agua.

[0082] Purificación: La purificación se realizó por filtración centrífuga. El producto bruto se disolvió en agua (~15
15 ml) NANOpure y la disolución se cargó en un dispositivo de filtro centrífugo (CENTRIPLUS YM30, MICROCON, MWCO= 30000) y se sometió a centrifugación (3000 x g, 40 min). El residuo de gliconanopartículas oscuro se lavó con MeOH y agua y el procedimiento se repitió varias veces hasta que el material de partida ya no pudo detectarse por cromatografía en capa fina (CCF). El residuo se disolvió en agua y se centrifugó varias veces para eliminar materiales insolubles. La disolución transparente se liofilizó y los productos obtenidos estuvieron libres de sales y de
20 material de partida (ausencia de señales de disulfuro e iones Na⁺ en espectroscopia de RMN ¹H y ²³Na).

[0083] Caracterización: El examen de TEM de las muestras se llevó a cabo a 200 KV (microscopio Philips CM200). Una única gota (20 µl) de las disoluciones acuosas de las gliconanopartículas de Au/Fe se colocó sobre una rejilla de cobre recubierta de una película de carbono. La rejilla se dejó secar al aire durante varias horas a
25 temperatura ambiente. Las distribuciones del tamaño de partícula de las agrupaciones de Au/Fe se evaluaron a partir de varias micrografías usando un analizador de obtención de imágenes automático. El análisis de EDX se realizó con un equipo Philips DX4 unido al microscopio. El análisis de ICP se realizó por Agriquem S.L. siguiendo el protocolo de PEC-009. Se obtuvieron espectros de UV mediante un espectrofotómetro de UV/vis Perkin Elmer Lambda 12. Los espectros de RMN ¹H se adquirieron en espectrómetros Bruker DRX-500 y los desplazamientos
30 químicos se facilitan en ppm (δ) con respecto a D₂O.

[0084] 1-AuFe: TEM: diámetro promedio del núcleo metálico, 1,5 y 2,5 nm.

ICP: 0,27% de Fe

UV (H₂O): λ= 500 nm, resonancia de plasmones superficiales RMN ¹H (500 MHz, D₂O) δ: 5,32 (s, 1H, H-1'), 4,37 (s,
35 1H, H-1), 4,00-3,30 (m, 13H), 2,70 (s, 2H, CH₂S), 1,85-1,20 (m, 17H)

[0085] 2-AuFe: TEM: diámetro promedio del núcleo metálico, 2 nm.

ICP: 2,81% de Fe

UV (H₂O): λ= 500 nm, resonancia de plasmones superficiales RMN ¹H (500 MHz, D₂O) δ: 4,49 (da, 1H, H-1'), 4,40
40 (sa, 1H, H-1), 4,10-3,30 (m, 23H), 2,92 (m, 0,5H).

Ejemplo 2 - Nanopartículas de Au magnéticas

[0086] Se prepararon gliconanopartículas de oro (GNP) solubles en agua estabilizadas con monocapas
45 autoensambladas (SAM) de diferentes moléculas de carbohidrato mediante la reducción química de un precursor de sal metálica en disolución acuosa en presencia de un exceso de neoglicoconjugados derivatizados con tiol. El procedimiento de preparación de muestras usó como punto de partida el Penadés y col. [11] [19] que produce GNP de oro en las que la agrupación metálica se ha protegido y funcionalizado al mismo tiempo con la molécula orgánica. La formación de enlaces covalentes Au-S aísla la agrupación metálica, previniendo su crecimiento (diámetro del
50 núcleo ≈ 2 nm) y confiere a las nanoagrupaciones estabilidad excepcional en disolución.

[0087] En este ejemplo, los inventores informan de la observación experimental de histéresis magnética hasta temperatura ambiente en gliconanopartículas de oro con diámetros promedio de 1,4 y 1,5 nm. Aumentando la relación de tiol:oro en el procedimiento de Penadés pueden obtenerse muestras de GNP con diámetro inferior a 1,5
55 nm. Esto se ilustra por la preparación y las propiedades magnéticas de Au-GNP obtenidas usando el neoglicoconjugado de maltosa 1 como especie ligadora de tiol (Figura 4).

Preparación de gliconanopartículas de oro *malto*-Au:

60 **[0088]** Una disolución acuosa de ácido tetracloroáurico (HAuCl₄, 0,018 mmol) y un exceso de neoglicoconjugado de disulfuro 1 (0,2 mmol) se redujo con borohidruro de sodio (NaBH₄, 22 equiv) a temperatura ambiente. Inmediatamente se formó una suspensión marrón. La suspensión se agitó durante aproximadamente dos horas, luego el disolvente se eliminó y las gliconanopartículas (GNP) se purificaron lavando con agua y filtración centrífuga

(CENTRIPLUS, Mr 30000, 1 h, 3000xg). El residuo en el filtro se disolvió en agua y se liofilizó. Las GNP se caracterizaron por microscopía electrónica de transmisión (TEM), y espectroscopía de RMN ^1H y UV-visible, plasma de acoplamiento inducido (ICP) y análisis elemental. TEM: diámetro promedio y; número de átomos de Au, 1,5 nm y 79, respectivamente. UV-VIS (H_2O): $\lambda = 520$ nm. ICP: 28% de Au. Análisis elemental calculado para $(\text{C}_{23}\text{H}_{43}\text{O}_{11}\text{S})_n\text{Au}_n$ ($n = 79$): C 38,18; H 5,98; S 4,40; Au 27,18. Hallado: C 39,5; H 6,07; Au 28,0.

[0089] La Figura 4 muestra en a) el esquema de síntesis para las GNP *malto*-Au y las micrografías de TEM correspondientes para las GNP *malto*-Au y los histogramas de distribución del tamaño de partícula correspondientes para las muestras; y en b) también se muestran los espectros de RMN ^1H en D_2O y en DMSO-d_6 . Las GNP *malto*-Au presentan en todos los casos una estrecha distribución del tamaño de partícula con un tamaño promedio de 1,5 nm o menos. En la Figura 5 se muestra la micrografía electrónica de alta resolución (HRTEM) que indica la estructura fcc de las GNP *malto*-Au protegidas con tiol.

[0090] La magnetometría con el dispositivo de interferencia de cuántos superconductores (SQUID) indicó comportamiento ferromagnético incluso hasta temperatura ambiente. El bucle de histéresis medido a 5K presenta un campo coercitivo de 120 Oe. Se encontró que la temperatura de bloqueo, obtenida a partir de la dependencia térmica de la coercividad, era 395K, que se corresponde con una constante de anisotropía eficaz de 10 meV/átomo que es similar a la observada en un único átomo de Co sobre superficie de platino (III) [20]. La magnetización no cumplió la ley de Curie-Weiss, pero mostró una dependencia de la T mucho más lenta. Se derivó un momento magnético atómico de aproximadamente $0,003 \mu_B$ por átomo de Au de mediciones magnéticas a baja T.

[0091] La Figura 6 muestra los bucles de histéresis medidos a 5K para GNP de oro *malto*-Au protegidas con tiol. De la Figura 5 es evidente que el procedimiento de magnetización de gliconanopartículas protegidas con tiol presenta comportamiento similar ya que los materiales ferromagnéticos típicos describen bucles de histéresis incluso a temperatura ambiente. Además, se observó que las muestras no se saturan a ninguna temperatura. Se miden valores de remanencia de aproximadamente la mitad del valor de magnetización a 1T, que implica que los átomos, además de las GNP, mantienen un momento magnético permanente y que el sistema de GNP de oro está constituido por un ensamblaje de momentos magnéticos de orientación aleatoriamente distribuida.

[0092] Podría argumentarse si el comportamiento observado es debido o no a la presencia de impurezas ferromagnéticas. El análisis de plasma inductivo acoplado (ICP) indicó que la cantidad de impurezas de Fe (0,007% en peso) en *malto*-Au es muy bajo para explicar los valores de magnetización obtenidos. A pesar de ese análisis se han preparado muestras de GNP de Fe *malto*-Au que contienen el 0,2% en peso de hierro para caracterizar la influencia del Fe sobre el comportamiento magnético. La Figura 6 muestra los bucles de histéresis medidos a 5K para ambos conjuntos de GNP. Es evidente que la presencia de cantidades elevadas de hierro (impurezas ferromagnéticas) en las nanopartículas *malto*-AuFe reduce el comportamiento ferromagnético a esta temperatura, mientras que el bucle de histéresis todavía sigue para muestras de *malto*-Au. Como las GNP están dispersas, las interacciones entre partículas sólo pueden ser de naturaleza magnetostática. La distancia promedio entre núcleos de oro se determina por la longitud de dos moléculas consecutivas del neoglicoconjugado de maltosa 1 (6 nm). Como el momento magnético permanente de cada partícula es muy bajo, el campo magnético que actúa sobre una GNP por una única GNP vecina es inferior a 10 Oe. Por tanto, puede omitirse la influencia de los campos de dispersión.

[0093] Como el Au en masa es diamagnético, el comportamiento ferromagnético puede ser debido a la combinación de tanto el tamaño como los efectos de unión [21]. La discreta estructura de energía electrónica [22], la presencia de defectos de apilamiento [23], además del porcentaje extremadamente alto ($\geq 80\%$) de átomos de la superficie [24] unidos covalentemente a S, pueden ser la posible causa de la aparición de ferromagnetismo.

[0094] En conclusión, se ha mostrado (Figura 6) que gliconanopartículas de oro muy pequeñas protegidas con tiol presentan un magnetismo permanente localizado a diferencia de la característica de diamagnetismo metálica de otras nanopartículas de oro no protegidas con tiol u oro en masa. Esta observación señala que la unión tiol-oro induce en gliconanopartículas de oro momentos magnéticos permanentes probablemente asociados a los orificios d adicionales localizados próximos a los enlaces de Au. Esto sugiere la aplicación tecnológica de las nanopartículas de la presente invención para la grabación magnética. Además, la solubilidad en agua y la marca biológica de estas GNP amplifican enormemente su aplicación en el campo biológico.

Ejemplo comparativo 3 - Nanopartículas de Au-Gd (III)

[0095] La gliconanopartícula (GNP) de oro puede complejarse con Gd (III) y otros lantánidos para dar un nuevo agente de contraste. Los ligandos neoglicoconjugados presentes en las GNP (60 a 100 moléculas) son el resto quelante.

[0096] **Preparación de gliconanopartículas lactoEG₄-Au(Gd):** A una disolución de la gliconanopartícula de oro (20,0 mg) correspondiente en agua (1 ml) se añadió una disolución de GdCl_3 (0,5 M, 1,08 ml). La mezcla se agitó en ausencia de luz durante 20 h. La disolución se filtró por centrifugación (MICROCON YM30, 13000 rpm, 8 min). El

residuo se lavó (8 x 0,5 ml, metanol/agua, 1/3). Las nanopartículas se disolvieron en agua y se liofilizaron para dar 17,5 mg de nanopartículas violetas oscuras. TEM: diámetro promedio 2,5 nm. EDX: Gd 6,8%; Au 33,2% atómico.

Determinación de relaxividades: Los tiempos de relajación de RMN ^1H T_1 y T_2 (37°C, pH 7,2) de los protones del agua en disolución acuosa se midieron a 1,5 Tesla en un espectrómetro de RMN Bruker Minispec. Los valores de T_1 se determinaron por el procedimiento de recuperación de la inversión y los valores de T_2 se determinaron por la secuencia de Carr-Purcell-Maiboom-Gill. Se prepararon disoluciones de las nanopartículas **lacto-Au(Gd)** a cinco concentraciones diferentes (0,01, 0,1, 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$) en tampón Hepes con 150 mM de NaCl. Las relaxividades se calcularon a partir de las diferencias en las tasas de relajación longitudinal y transversal ($1/T_{1(2)}$) de los protones del agua en presencia y ausencia de las gliconopartículas, y la concentración de Gd(III) se expresó en mM. Las Figuras 7 y 8 muestran los resultados.

[0097] En conclusión, en los ejemplos descritos en este documento los inventores han desarrollado una metodología simple para preparar nanopartículas superparamagnéticas solubles en agua covalentemente ligadas a oligosacáridos antigénicos. La metodología puede extenderse a la preparación de nanopartículas híbridas que incorporan carbohidratos y otras moléculas. Las interacciones carbohidrato-receptor pueden dirigir las gliconopartículas magnéticas a células diana y tejidos permitiendo su marcado selectivo. Esto demuestra que este tipo de gliconopartículas magnéticas polivalentes complementa las nanopartículas magnéticas bioactivas apenas disponibles [9] [10] [17]. En consecuencia, la fácil preparación y purificación, su pequeño tamaño del núcleo y su estabilidad y solubilidad en condiciones fisiológicas de nanopartículas de la presente invención convierten estas herramientas en posibles candidatos para el tratamiento de un cáncer, tal como se define en las reivindicaciones.

Referencias

- [0098]** Las referencias mencionadas en el presente documento se incorporan todas expresamente por referencia:
- [1] Niemeyer, C.M. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 4128-4158.
- [2] Bergemann, C.; Muller-Schulte, D.; Oster, J.; Brassard, L.; Lübbe, A.S. *J. Magn. Magn. Mater.* 1999, 194, 45.
- [3] Whitesides, G.M.; Kazlauskas R.J.; Josephson L. *Trends Biotechnol.* 1983, 1, 144-148.
- [4] Sun, S.; Murray, C.B.; Weller, D.; Folks, L.; Moser, A. *Science* 2000, 287, 1989.
- [5] a) Shafi, K.V.P.M.; Gedanken, A.; Prozorov, R. *Adv. Matter*, 1998, 10, 590-593. b) Fried, T.; Shemer, G.; Markovich, G. *Adv. Mater.* 2001, 13, 1158-1161. c) Moumen, N.; Veillet, P.; Pileni, M.P.. *J. Magn. Magn. Mater.* 1995, 149, 67-71.
- [6] Park, S.-J.; Kim, S.; Lee, S.; Khim, Z.G.; Char, K.; Hyeon, T. *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 8581-8282.
- [7] a) Suslick, K.S.; Fang, M.; Hyeon, T. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 11960-11961. b) Sun, S.; Zeng H. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 8204-8205. c) Guo, Q.; Teng, X.; Rahman, S.; Yang, H. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 630-631.
- [8] Sun, S.; Anders, S.; Hamann H.F.; Thiele, J.-U.; Baglin, J.E.E.; Thomson, T.; Fullerton, E.E.; Murray, C.B.; Terris, B.D. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 2884-2885.
- [9] a) Josephson, L.; Tung, C.-H.; Moore, A.; Weissleder, R. *Bioconjugate Chem.* 1999, 10, 186-191. b) Lewin, M.; Carlesso, N.; Tung, C.-H.; Tang, X.-W.; Cory, D.; Scadden, D.T.; Weissleder, R. *Nat. Biotechnol.* 2000, 18, 410-414.
- [10] Josephson, L.; Pérez, J.M.; Weissleder, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 3204-3206.
- [11] de la Fuente, J.M.; Barrientos, A.G.; Rojas, T.C.; Rojo, J.; Cañada, J.; Fernández, A.; Penadés, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 2257-2261.
- [12] Barrientos, A.G.; de la Fuente, J.M.; Rojas, T.C.; Fernández, A.; Penadés, S. *Chem. Eur. J.* 2002, 9, 1909-2001.
- [13] Hernáiz, M.J.; de la Fuente, J.M.; Barrientos, A.G.; Penadés, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, 41, 1554-1557.
- [14] Zhou, W.L.; Carpenter, E.E.; Lin, J.; Kumbhar, A.; Sims, J.; O'Connor, C.J. *Eur. Phys. J. D.* 2001, 16, 289-292.
- [15] Mykhaylyk O.; Cherchenko A.; Ilkin A.; Dudchenko N.; Ruditsa V.; Novoseletz M.; Zozulya Y. *J. Magn. Magn. Mater.* 2001, 225, 241-247.
- [16] Jordan, A.; Scholz, R.; Wust, P.; Fähling, H.; Felix, R. *J. Magn. Magn. Mater.* 1999, 201, 413-419.
- [17] Josephson, L.; Kircher M.F.; Mahmood, U.; Tang, Y.; Weissleder R. *Bioconjugate Chem.* 2002, 13, 554-560.
- [18] Taton y col, *Science* 2000 289:1757-1760.
- [19] Barrientos A.G. y col., *Chem. Eur. J.* 9, 2003, 1909-1921.
- [20] Gambardela, P. y col, *Giant Magnetic Anisotropy of Single Cobalt Atoms and Nanoparticles*, *Science*, 2003, 300, 1130-1133.
- [21] Di Felice, R., Selloni, A., Molinari, E., *J. Phys. Chem. B.*, 2003, 107, 1151-1156.
- [22] D. Davidovic and M. Tinkham, *Phys. Rev. Lett.*, 1999, 83 (8), 1644-1647.
- [23] Vitos, L., Johansson, B., *Phys. Rev. B.*, 2000, 62 (18), R11957.
- [24] Villás, I.M.L., Châtelain, A., de Heer, W.A., *Science*, 1994, 265, 1682- 1684.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende nanopartículas magnéticas para utilizar en un método de tratamiento, en la que las nanopartículas tienen núcleos de átomos metálicos seleccionados entre átomos de oro, platino, plata o cobre, 5
teniendo los núcleos un diámetro inferior a 2,5 nm, en las que los núcleos están unidos covalentemente a un conjunto de ligandos, por lo menos uno de los cuales comprende un grupo carbohidrato, y en la que la composición es para utilizar en el tratamiento de un cáncer mediante la introducción de las nanopartículas en un paciente y la aplicación de un campo magnético de alta frecuencia para eliminar las células cancerosas.
- 10 2. Composición para utilizar en un método de tratamiento, según la reivindicación 1, en la que el núcleo tiene un diámetro inferior a 2,0 nm y el núcleo está formado de átomos de oro.
3. Composición para utilizar en un método de tratamiento, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que los ligandos están unidos al núcleo a través de un grupo sulfuro.
- 15 4. Composición para utilizar en un método de tratamiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las nanopartículas son solubles en agua.
5. Composición para utilizar en un método de tratamiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la composición es un coloide.
- 20 6. Composición para utilizar en un método de tratamiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las nanopartículas comprenden además un péptido, ADN o ARN.
- 25 7. Composición para utilizar en un método de tratamiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el ligando comprende: un grupo polisacárido, un oligosacárido o un monosacárido; o un glicanoconjugado.
8. Composición para utilizar en un método de tratamiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el tratamiento del cáncer es el tratamiento de un tumor.
- 30 9. Composición para utilizar en un método de tratamiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las nanopartículas comprenden un ligando que incluye un antígeno específico de tumor para dirigir específicamente las nanopartículas a las células tumorales.
- 35 10. Composición para utilizar en un método de tratamiento, según la reivindicación 9, en la que el ligando es un antígeno asociado a tumor o un factor autocrino de tumor.

Figura 1

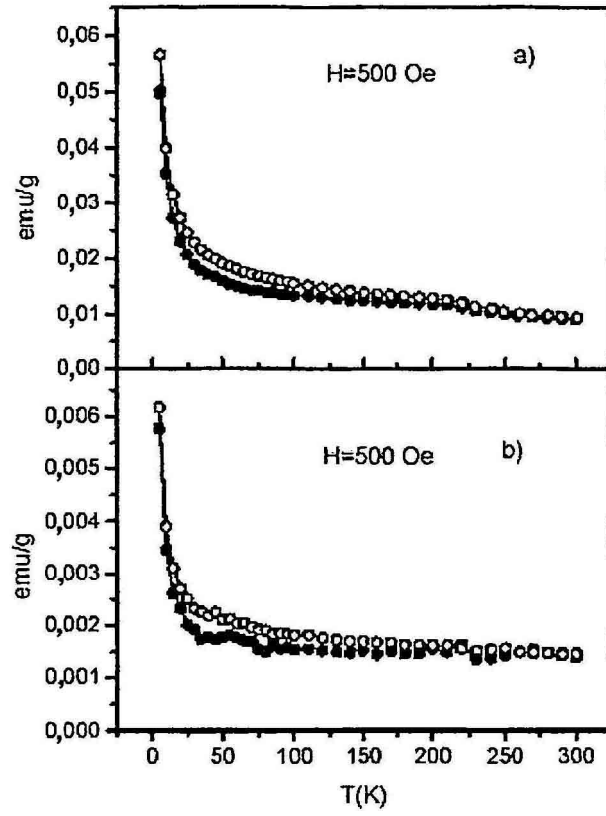


Figura 2A

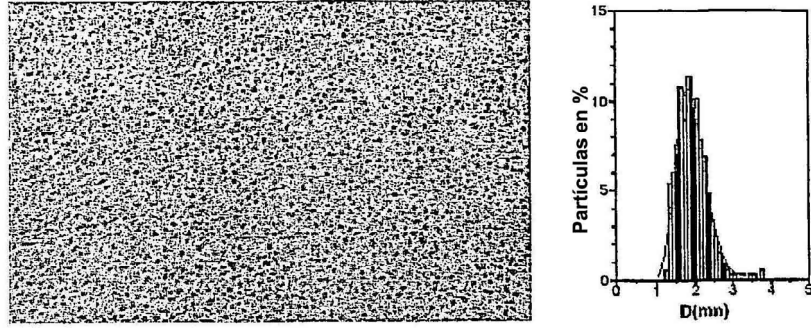


Figura 2B

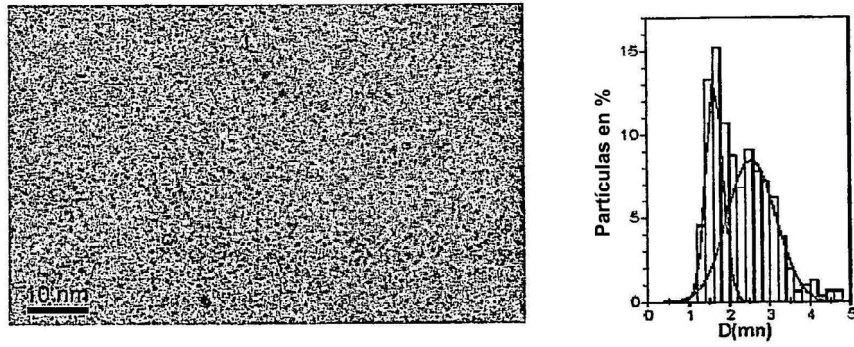


Figura 3

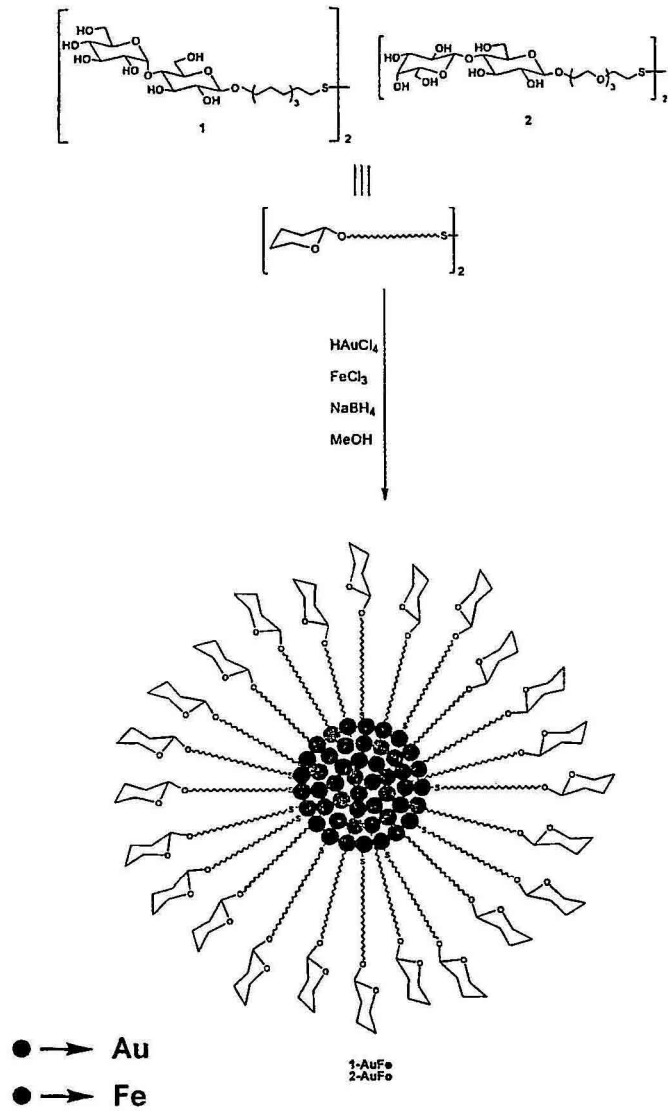


Figura 4A

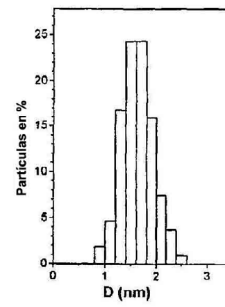
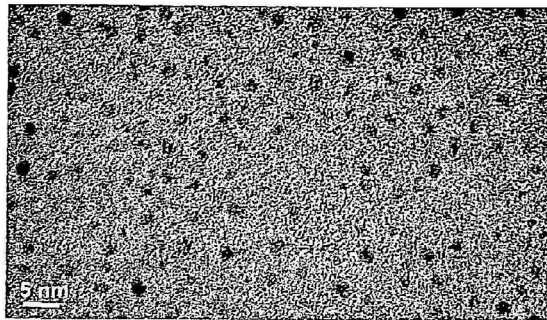
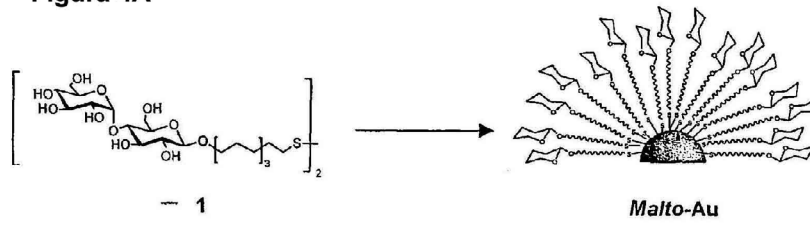


Figura 4B

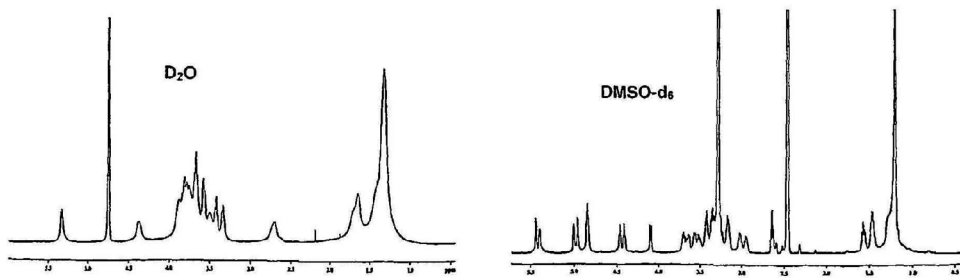


Figura 5

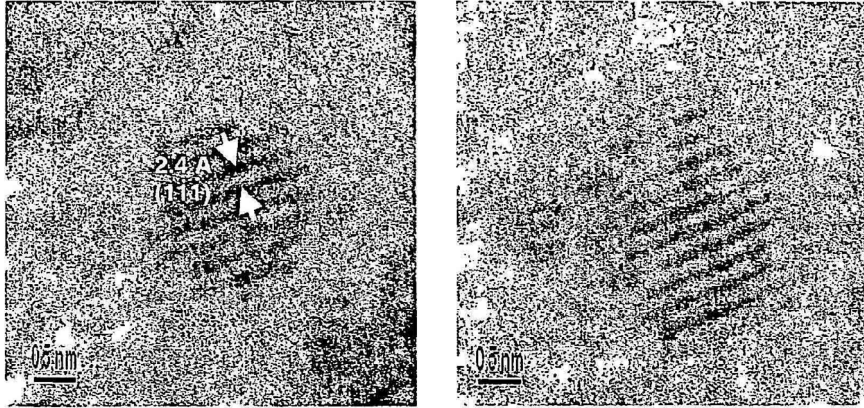


Figura 6

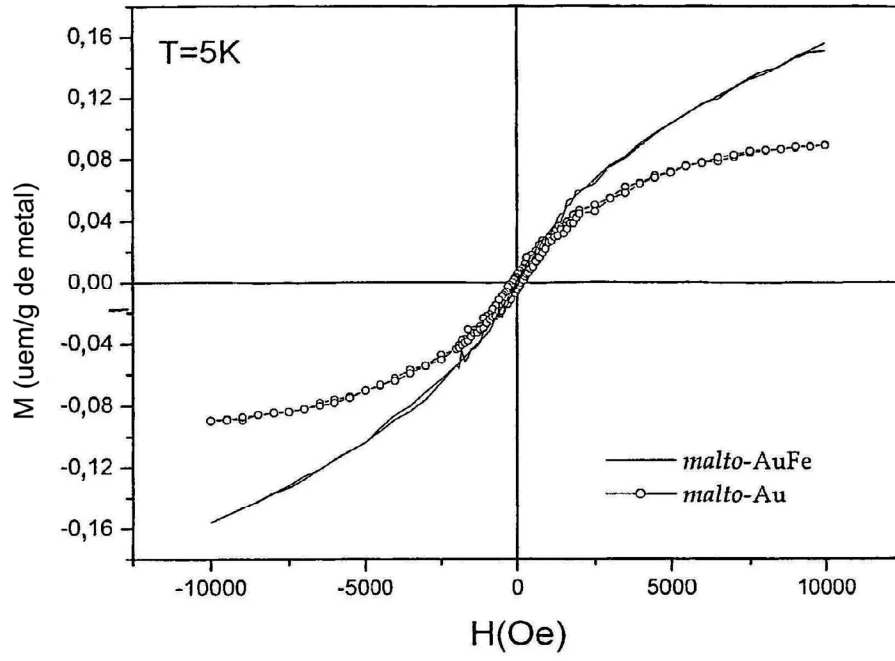


Figura 7A

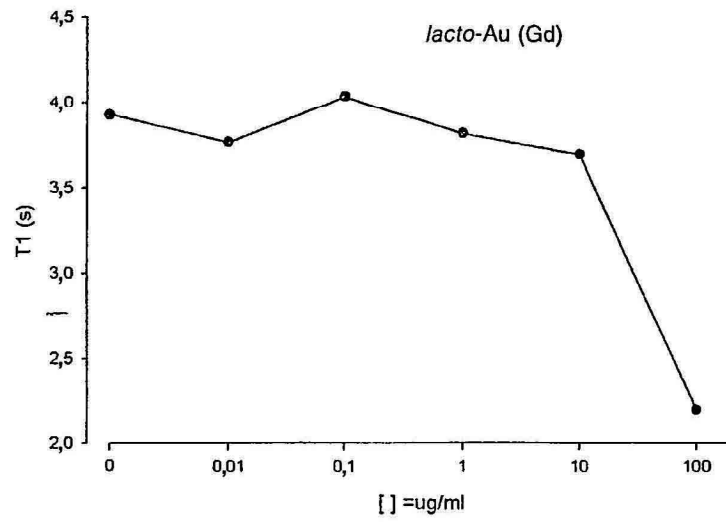


Figura 7B

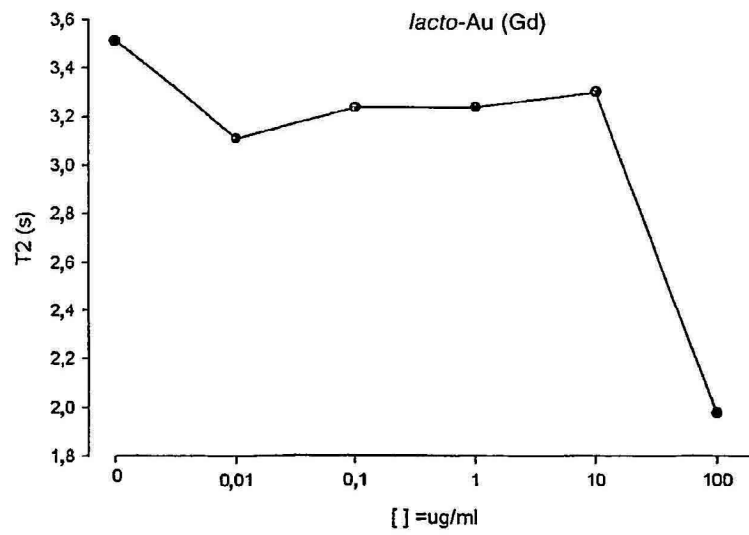


Figura 8A

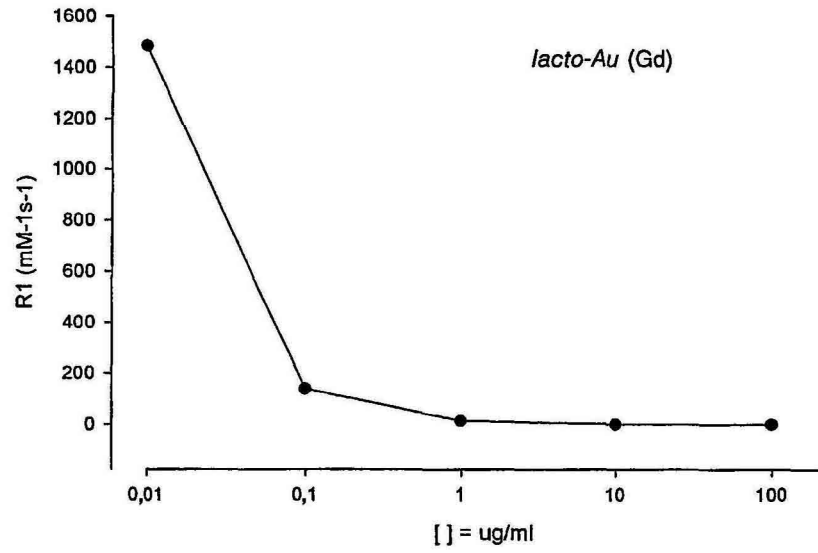


Figura 8B

