

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 520**

51 Int. Cl.:

A61B 8/14 (2006.01)
A61K 49/22 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61B 5/00 (2006.01)
G01N 21/17 (2006.01)
G01N 21/55 (2006.01)
G01N 21/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2004 E 04704839 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013 EP 1593091**

54 Título: **Procedimiento de formación de imágenes optoacústicas de contraste elevado utilizando nanopartículas no esféricas**

30 Prioridad:

25.01.2003 US 442369 P

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

26.11.2013

73 Titular/es:

**SENO MEDICAL INSTRUMENTS, INC. (100.0%)
3838 MEDICAL DRIVE SUITE 101
SAN ANTONIO, TX 78229, US**

72 Inventor/es:

**ORAEVSKY, ALEXANDER A. y
HENRICHs, PAUL M.**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 431 520 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

Procedimiento de formación de imágenes optoacústicas de contraste elevado utilizando nanopartículas no esféricas

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION.

[0001] La presente invención se refiere a la formación de imágenes opto-acústicas empleando nanopartículas para mejorar la detección de objetos en un cuerpo. La invención tiene aplicaciones que incluyen la formación de imágenes por razones médicas.

[0002] La formación de imágenes opto-acústicas debe distinguirse de la formación de imágenes ópticas. En la formación de imágenes ópticas se irradia un cuerpo. La luz transmitida o reflejada en los mismos rangos se detecta para generar imágenes. Las imágenes ópticas adolecen de la desventaja grave de que la resolución de la imagen es inherentemente baja, ya que la luz, ya sea en el espectro infrarrojo visible o cercano, se dispersa fuertemente en el cuerpo por interacción con inhomogeneidades locales.

[0003] Los procedimientos de formación de imágenes optoacústicas no solo se basan en la detección de la luz visible o infrarroja irradiada sobre un cuerpo, sino en la detección sensible de ondas ultrasónicas inducidas en el interior del cuerpo por la radiación óptica. La formación de imágenes opto-acústicas se basa fundamentalmente en las propiedades ópticas del tejido que detecta, pero se basa en la detección sensible de ondas ultrasónicas inducidas en lugar de la propia luz para la generación de la imagen. Su resolución es como la de una imagen de ultrasonido en lugar de la de una imagen óptica. La formación de imágenes opto-acústicas (Oraevsky y otros, Patente US 5,840,023) es el uso de rayos láser para generar luz en un espectro estrecho o longitudes de onda específicas para irradiar el tejido a examinar, un así llamado sistema de imagen optoacústica láser ("LOIS" de las siglas en inglés). El principio del sistema LOIS es que la absorción preferencial de pulsos de láser cortos de irradiación por tejidos que contienen un cromóforo absorbente, tales como la hemoglobina en los tumores cancerosos ricos en sangre, genera perturbaciones de presión centradas en los sitios de absorción. El rápido aumento de la presión local en los sitios de absorción conduce a la propagación de la presión de pulso a través de la mayor parte del tejido de acuerdo con las reglas de transmisión del sonido. Las formas de las ondas de presión retienen información acerca de las formas de las regiones de origen (Oraevsky, 1993; Diebold, 1994).

[0004] El término "formación de imágenes opto-acústicas" tal como se usa en este documento se aplica a cualquier procedimiento de formación de imágenes en el que la radiación electromagnética genera una onda de presión detectable o sonido a partir de la que se calcula una imagen. Imágenes optoacústica es equivalente en significado a la expresión "formación de imagen fotoacústica", utilizada por otros para hacer referencia a la misma tecnología. Sin embargo, el término "optoacústica" no es universalmente tan común, y de hecho se ha combinado con la expresión "formación de imágenes" por Unger y Wu en la Patente US N° 6,123,923 para describir una tecnología de formación de imágenes diferente (la irradiación de la luz en su procedimiento no juega ningún papel en la generación de una señal acústica detectada). Tal como se utiliza aquí, el término "formación de imágenes opto-acústicas" tal como se utiliza por Unger y Wu en la Patente US N° 6,123,923 no tiene relevancia en la formación de imágenes optoacústicas mediante irradiación con luz.

[0005] Para aquellos no iniciados en esta técnica, puede ser sorprendente que sea posible generar sonido a partir de la luz con una alta eficiencia. De hecho, la imagen optoacústica es bastante sensible como procedimiento de formación de imágenes. El aumento de la temperatura producido por la absorción de la energía de luz que es necesaria para producir la señal detectada es sólo una pequeña fracción de un grado de temperatura. Sin embargo, la presión generada por este aumento local de la temperatura genera una onda acústica fácilmente detectable. Los recientes avances en formación de imágenes opto-acústicas han permitido la visualización, la caracterización cuantitativa y supervisión en tiempo real en la profundidad del tejido humano con sensibilidad y resolución superiores a las de los procedimientos ópticos puros (Oraevsky y otros en Las patentes americanas 5,840,023, 6,405,069, y 6,498,942). Algunos de estos avances han venido a través del uso de agentes de contraste para la formación de imágenes optoacústicas, tal como se prevén Oraevsky y otros en la patente US 5,840,023 y se enseñó específicamente para agentes de contraste solubles e insolubles en Henrichs y otros en la patente americana 6,662,040 y la publicación de PCT W09857667. Posteriormente, otros inventores han enseñado el uso de clases específicas de agentes de contraste solubles para la formación de imágenes opto-acústicas (patentes americanas 6,180,085; 6,180,087; 6,183,726; 6,190,641; 6,264,920; 6,264,919; y 6,395,257; y en la solicitud de patente americana 20020044909, ahora patente US N° 6,641,798).

[0006] A diferencia de la formación de imágenes ópticas, la difusión de luz por los tejidos producidos por una fuerte dispersión de la luz no es un problema para la formación de imágenes opto-acústicas. En efecto, en realidad la difusión de luz ayuda a bañar el interior de los tejidos con radiación de manera uniforme. Por otra parte, el grado en que un componente de tejido interno, tal como un tumor canceroso, absorbe la luz se ve reforzado por la presencia de centros de dispersión dentro de ese componente. Estos centros alargan la longitud efectiva del trayecto seguido por un fotón al pasar a través del componente de tejido. Por lo tanto, se incrementa la posibilidad de que el fotón sea absorbido por constituyentes moleculares de tejidos. Es el ultrasonido producido por la absorción de la luz que proporciona la información necesaria para el cálculo de la imagen. Por lo tanto, la resolución de las imágenes

optoacústicas está más cerca a la de las imágenes de ultrasonido de lo que lo están las imágenes ópticas. Sin embargo, las imágenes optoacústicas conservan el alto contraste de la imagen óptica pura. Tiene las mejores características de formación tanto de las imágenes ópticas y como las de ultrasonido.

[0007] Los avances recientes han mejorado enormemente la capacidad de formación de imágenes ópticas, especialmente con la radiación del infrarrojo cercano, para mostrar características del corazón humano y de otros órganos. Ha habido un número de patentes que describen nuevos agentes de contraste y nuevos usos de los agentes de contraste con respecto a la formación de imágenes ópticas. Licha y otros enseñan el uso de las suspensiones coloidales de colorante para la formación de imágenes ópticas (Solicitud de patente americana 2002022004). Algunos de los inventores de agentes de contraste para la formación de imágenes ópticas han reconocido que los agentes de contraste de partículas serán útiles. Por ejemplo, Klaveness y otros enseñan el uso de agentes de contraste de partículas, que pueden o no comprender un componente absorbente de la luz, para la formación de imágenes ópticas (Patente Europea EP0808175). Los materiales en partículas son bien conocidos como agentes de contraste para la formación de imágenes de rayos X (y ultrasonido). (Las burbujas de gas encapsuladas forman la clase más importante de agentes de contraste para la formación de imágenes ultrasónicas) Hay una larga serie de patentes relacionadas con la estabilización de las nanopartículas en los medios de contraste de rayos X (Números de Patente americanas 5,472,683, 5,500,204, 5,521,218, 5,525,328, 5,543,133, 5,447,710, 5,560,932, 5,573,783, 5,580,579, 6,270,806 y Números de Patente Europea. EP0601618 y EP0602700). West y otros describen la preparación de nanocápsulas que contienen un núcleo de partículas cubierto con una envoltura metálica que tiene propiedades ópticas que pueden hacer que sean útiles como agentes de contraste para la formación de imágenes ópticas (Números de Patente americanas 6,344,272, 6,438,811, Publicación de Solicitud de patente americana N° 20020160195, ahora Patente US 6,660,381, Números de publicación de Solicitud de patente americana 20010002275 y 20020132045, y PCT WO01062 y PCT WO02059226). También describen el uso de nanocápsulas de forma arbitraria como agentes de contraste para la formación de imágenes ópticas (Publicación de Solicitud de patente americana N° 2002013517, ahora Patente US 6,530,944).

[0008] Habría un beneficio real con un sistema basado en detección la luz que pueda detectar objetos tan pequeños como 1 mm. Una resolución de formación de imágenes del orden de 1 mm es necesaria para la detección de tumores en una etapa en la que sea fácilmente tratable. La sabiduría general es que los tumores de menor tamaño son más fáciles de curar. Hay una necesidad médica significativa de procedimientos de formación de imágenes que aumenten la sensibilidad y la resolución a alrededor de 1 mm o menos. Una mayor sensibilidad permitirá la detección de los tumores más pequeños y los tumores que han reducido su contenido de sangre porque están en una etapa temprana de desarrollo o debido a intervenciones terapéuticas. Los tumores de próstata o de mama o en otros órganos en una etapa tan temprana de desarrollo pueden ser denominados "tumores incipientes". "Los tumores incipientes difieren de las lesiones precancerosas en que contienen células cancerosas identificables. Sin embargo, todavía no se han convertido en masas tumorales reconocibles. En particular, aún no han desarrollado la extensa red vascular que es característica de muchos tumores sólidos más grandes. Para la detección de tumores cancerosos nacientes, que puede no ser ya suficiente que depender de las diferencias en el contenido de sangre y el tejido normal. Es probable que el contenido de sangre de un tumor canceroso incipiente sea similar al del tejido normal. Se requiere una estrategia de detección alternativa. Actualmente, sin embargo, ni la formación de imágenes ópticas puras puede ni la formación de imágenes optoacústicas existentes pueden detectar tumores tan pequeños como 1 mm. Es poco probable que las imágenes del interior de la mama humana o cualquier otra parte gruesa del cuerpo se produzcan por formación de imágenes ópticas puras con una resolución de aproximadamente 1 mm.

[0009] La sabiduría general es que los tumores de menor tamaño son más fáciles de curar. Hay una necesidad médica significativa de procedimientos de formación de imágenes que aumenten la sensibilidad y la resolución a alrededor de 1 mm o menos. Una mayor sensibilidad permitirá la detección de los tumores más pequeños y los tumores que han reducido su contenido de sangre porque están en una etapa temprana de desarrollo o debido a intervenciones terapéuticas. Los tumores de próstata o de mama o en otros órganos en una etapa tan temprana de desarrollo pueden ser denominados "tumores incipientes". "Los tumores incipientes difieren de las lesiones precancerosas en que contienen células cancerosas identificables. Sin embargo, todavía no se han convertido en masas tumorales reconocibles. En particular, aún no han desarrollado la extensa red vascular que es característica de muchos tumores sólidos más grandes. Para la detección de tumores cancerosos nacientes, que puede no ser ya suficiente que depender de las diferencias en el contenido de sangre y el tejido normal. Es probable que el contenido de sangre de un tumor canceroso incipiente sea similar al del tejido normal. Se requiere una estrategia de detección alternativa. Actualmente, sin embargo, ni la formación de imágenes ópticas puras puede ni la formación de imágenes optoacústicas existentes pueden detectar tumores tan pequeños como 1 mm. Es poco probable que las imágenes del interior de la mama humana o cualquier otra parte gruesa del cuerpo se produzcan por formación de imágenes ópticas puras con una resolución de aproximadamente 1 mm.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0010] Oraevsky y otros [Proc. SPIE 2001; 4256: 179-187; Proc. SPIE2001; 4434: 60-69.] predijeron que diversas nanopartículas pueden mejorar el contraste de tejido en la formación de imágenes opto-acústicas, sin embargo, no se dieron a conocer los tipos específicos de nanopartículas más beneficiosos para la formación de imágenes opto-acústicas.

[0011] Ahora hemos descubierto una forma de detectar optoacústicamente la presencia de objetos tan pequeños como de 1 mm e incluso menores en un cuerpo que puede ser penetrado por la radiación electromagnética. Hemos descubierto que materias de partículas nanométrica al menos parcialmente metálicas fabricadas o manipuladas para ser no esféricas no sólo desplazarán el espectro de absorción óptica en el rango del infrarrojo cercano para una penetración más profunda en un cuerpo, sino que también reducirán la banda de absorción y aumentarán al mismo tiempo la absorbancia efectiva, en ciertos casos en aproximadamente un orden de magnitud o más, lo que aumentará en gran medida la eficacia optoacústica de la materia de partículas nanométricas, haciendo que la materia de partículas nanométricas manipuladas se conviertan en un agente de formación de imágenes opto-acústicas con contraste muy elevado. De conformidad con nuestros descubrimientos, la respuesta acústica eficaz a la radiación electromagnética se aumenta mediante la adaptación de la elección de la composición, forma no esférica y tamaño de materias de partículas nanométricas para maximizar tanto la absorbancia óptica de las partículas en la o las longitudes de onda de irradiación y la presión optoacústica producido en respuesta a la energía electromagnética absorbida..

[0012] Esta invención comprende un procedimiento de mejorar la detectabilidad para un objeto específico en un cuerpo. Una materia de partículas nanométricas se administra al cuerpo para la detección del objeto, si este está presente. La materia de partículas nanométricas es al menos parcialmente metálica, tiene una forma no esférica formada que tiene una dimensión característica mínima en el rango que va desde aproximadamente 1 a aproximadamente 3000 nanómetros, y tiene una composición formada capaz de producir presión térmica ya sea en la materia de partículas nanométricas o en el objeto mayor que el objeto podría producir en ausencia de materia de partículas nanométricas.

[0013] De acuerdo con la invención, la radiación electromagnética se dirige sobre el cuerpo. La radiación electromagnética tiene una longitud de onda o espectro de longitudes de onda específicos en el rango que va desde 3nm a 300mm seleccionados de modo que la longitud de onda o espectro de longitudes de onda es más largo en un factor de al menos 3 que la dimensión característica mínima de la materia de partículas nanométricas. La materia de partículas nanométricas absorbe la radiación electromagnética más de lo que lo harían una o más partículas formadas esféricamente no agregadas con el mismo volumen total con una composición idéntica a la materia de partículas nanométricas. La materia de partículas nanométricas por dicha absorción produce una señal opto-acústica mejorada que resulta de la absorción. A continuación la señal optoacústica puede ser recibida y convertida en una señal electrónica caracterizado por el hecho de que al menos un parámetro seleccionado de entre amplitud, frecuencia, fase, perfil temporal, tiempo de llegada, espectro de frecuencias, o una combinación de cualquiera o más de estos parámetros. La señal electrónica puede ser entonces presentada para una evaluación del al menos un parámetro por un humano o una máquina

[0014] Por el término "materia de partículas nanométricas" tal como se utilizan aquí, es genérico para una sola nanopartícula, una colección de nanopartículas, o un agregado de nanopartículas. Por lo tanto en la descripción de un materia de partículas nanométricas como al menos parcialmente metálica, como que tiene una forma no esférica formada que tiene una dimensión característica mínima en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 3000 nanómetros, y como que tiene una composición formada capaz de producir presión térmica ya sea en la materia de partículas nanométricas o en el objeto mayor que el objeto podría producir en ausencia de la materia de partículas nanométricas, se entiende (i) una sola nanopartícula puede tener tales propiedades, o (ii) que una colección de nanopartículas puede tener nanopartículas que con más probabilidad tengan tales propiedades, o (iii) que un agregado de nanopartículas tenga tales propiedades.

Forma

[0015] La forma no esférica de la materia de partículas nanométricas es una que hace que la materia de partículas nanométricas absorba radiación electromagnética de ciertos criterios más que las nanopartículas de forma esférica con el mismo volumen total y e incluso la misma composición que la materia de partículas nanométricas no esféricas. Las materias de partículas nanométricas no esféricas tendrán una forma alargada, es decir, cualquier forma geométrica en la que una dimensión es más larga que las otras dos dimensiones en el espacio tridimensional. Con la expresión "característica de dimensión mínima" se entiende una dimensión que es más larga que las otras dos dimensiones en el espacio tridimensional.

[0016] El término "forma perfilada" para caracterizar la materia de partículas nanométricas no esféricas al menos parcialmente metálica utilizado en esta invención significa que la forma está fabricados o manipulada para aumentar una dimensión más que las demás en el espacio tridimensional. Por ejemplo, la nanoparticulado puede tener forma de barra o sustancialmente elipsoidal en al menos una dimensión. Una materia de partículas nanométricas alargada utilizada en esta invención tiene adecuadamente una relación de aspecto de aproximadamente 2 a aproximadamente 10. Por la expresión " relación de aspecto " en el contexto de la forma de una materia de partículas nanométricas en esta invención se entiende la mayor dimensión de la materia de partículas nanométricas dividida por la dimensión menor de la materia de partículas nanométricas. Por ejemplo, en el caso de una forma de barra, la relación de aspecto es la longitud sobre la anchura. Ventajosamente, la mayor dimensión de la materia de

partículas nanométricas alargada está en el rango que va desde aproximadamente 2 nanómetros a aproximadamente 200 nanómetros.

[0017] La forma perfilada puede ser fractal o no fractal. Las estructuras fractales pueden ser regulares o irregulares. Así, la estructura puede ser cualquiera de varias curvas o formas extremadamente irregulares para las cuales cualquier parte adecuadamente elegida sea similar en forma a una determinada parte más grande o más pequeña cuando se aumenta o se reduce al mismo tamaño. Unas estructuras fractales adecuadas son estrellas de dos dimensiones con un número par de puntos. (Una estrella de dos dimensiones es una estrella de tres dimensiones en la que el eje "z" tiene una longitud lo suficientemente pequeña para ser ignorado, es decir, que la estrella es "plana". En este caso, la dimensión mínima característica es la longitud entre puntos opuestos de la estrella incluso si esos puntos pertenecen a un círculo circunscrito en la estrella.) Se prefieren las estrellas tridimensionales con un número par de puntos. Un número par de puntos produce una mayor absorción debida al hecho de que dos puntos producen una estructura similar a un elipsoide (dipolo).

[0018] En formas más euclidianas, las formas para las nanopartículas incluyen cilindros (barras), conos, poliedros, elipsoides y otras formas que no son esféricas.

[0019] La forma está diseñada para una longitud más larga en una dimensión con el fin de proporcionar suficiente desplazamiento de un máximo de absorción electromagnética hacia longitudes de onda más largas en comparación con las nanopartículas esféricas (o totalmente simétricas), para producir la absorción deseable a una longitud de onda seleccionada o rango de longitudes de onda seleccionadas que son capaces de penetrar en el cuerpo.

[0020] Unas formas preferidas de las nanopartículas utilizadas en la práctica de la invención son barras cilíndricas y elipsoides alargados. Por lo tanto, la invención abarca el uso de agentes de contraste para la formación de imágenes optoacústicas, que comprende partículas metálicas en forma de barra, agregados de partículas en forma de barra de metal, elipsoides alargados, o agregados de elipsoides alargados.

[0021] Para las barras de metal, la relación de aspecto, que es la relación entre la longitud de una barra y su diámetro, es el parámetro crítico de control de la coincidencia con la longitud de onda de irradiación. Para elipsoides alargados, la relación de aspecto es la relación entre el diámetro de la sección transversal más larga con el diámetro de la sección transversal más pequeña. Como es el caso para los pesos de partículas, habrá generalmente una gama de relaciones de aspecto de las barras de metal.

[0022] Como se ha mencionado, la materia de partículas nanométricas parcialmente metálica puede ser una colección de nanopartículas. Según una realización una colección de nanopartículas tiene una relación de aspecto más probable desde aproximadamente 2 a aproximadamente 10. La relación de aspecto "más probable" es la relación de aspecto que con más probabilidad se encuentra cuando se selecciona una partícula individual de entre la mezcla.

[0023] Para la irradiación a 757 nm, la relación de aspecto más probable de partículas cilíndricas de oro utilizadas en la práctica de la invención será preferentemente de entre 3,0 y 4,5. Más preferentemente, la relación de aspecto más probable será 3,4 y 4,1. Por lo tanto, la invención abarca el uso de agentes de contraste para la formación de imágenes optoacústicas a 757 nm que comprenden partículas de oro en forma de barra con relaciones de aspecto más probables de preferentemente entre 3,4 y 4,1.

[0024] Para la irradiación a 1100 nm, la relación de aspecto más probable de partículas cilíndricas de oro utilizadas en la práctica de la invención será preferentemente de entre 6,0 y 10,0. Más preferentemente, la relación de aspecto más probable será 7,0 y 9,0. Por lo tanto, la invención abarca el uso de agentes de contraste para la formación de imágenes optoacústicas a 757 nm que comprenden partículas de oro en forma de barra con relaciones de aspecto más probables de preferentemente entre 7,0 y 9,0.

[0025] En analogía con las definiciones de promedios de números y de promedios de pesos de partículas, es posible definir relaciones de aspecto de promedio en número y de promedio en peso $NR = \Sigma(n_i R_i) / \Sigma(n_i)$ y $WR = \Sigma(n_i R_i^2) / \Sigma(n_i R_i)$ respectivamente, donde R_i es la relación de aspecto de una partícula individual seleccionada de la mezcla de partículas. La ratio de relaciones de aspecto promedio en peso a promedio en número es una medida útil de la anchura de la distribución de relaciones de aspecto. La invención abarca cualquier uso de agentes de contraste para la formación de imágenes optoacústicas que comprenden barras de metal o agregados de barras de metal para los que la relación entre de las relaciones de aspecto de promedio en peso de partícula con respecto a las relaciones de aspecto de promedio en número de partículas es preferentemente menor que 10, más preferentemente menor que 5, y aún más preferentemente menor que 1.5.

[0026] Una colección de nanopartícula utilizada en esta invención puede ser combinaciones de nanopartículas con una forma y con nanopartículas con otra forma para formar geometrías de materia de partículas nanométricas capaces de absorber una longitud de onda específica o rango de longitudes de onda seleccionados. Cuando las nanopartículas alargadas están en una colección de nanopartículas, la colección tiene adecuadamente una relación de aspecto más probable que va desde aproximadamente 2 a aproximadamente 10.

[0027] La invención prevé el uso de agentes de contraste sensibles a dos longitudes de onda de irradiación diferentes. En este caso, el agente de contraste comprenderá partículas con dos relaciones de aspecto promedio diferentes.

[0028] Una materia de partículas nanométricas no esféricas que comprende un agregado de nanopartículas no requiere que las nanopartículas del agregado sean no esféricas. Las nanopartículas del agregado pueden comprender nanopartículas esféricas ordenadas en una estructura para que tenga las propiedades de la materia de partículas nanométricas de esta invención. Según una realización, un agregado de materia de partículas nanométricas está ordenado de tal modo y las nanopartículas están al menos parcialmente recubiertas con material orgánico, de modo que material orgánico adecuadamente que comprende material genético para obtener este orden.

Dimensión

[0029] En la práctica de la invención, la forma de nanopartículas individuales o de una colección de nanopartículas es más importante que la dimensión o el tamaño de las nanopartículas. Sin embargo, para aplicaciones médicas o biológicas, la dimensión de las nanopartículas es crucial en el control de las propiedades biológicas de las nanopartículas, en particular la tasa de aclaramiento de la sangre y los tejidos. Por lo tanto, para aplicaciones médicas o biológicas los detalles de tanto la dimensión como de la forma son importantes para la práctica de la invención, tal como se describirá en más detalle a continuación.

[0030] Debe tenerse en cuenta la distribución de las formas y dimensiones o tamaños de las nanopartículas que se producen en cualquier colección real de nanopartículas utilizadas en la práctica de la invención. En una colección de nanopartículas el tamaño "más probable" es el tamaño más probable que se encuentra cuando se selecciona una nanopartícula individual de la mezcla de nanopartículas. Para que una partícula de metal tenga absorción debido a la resonancia de plasmones, el tamaño de partículas tiene que ser mayor que 1 nm y poseer suficientes electrones para la absorción de resonancia colectiva (plasmón). Por otro lado, preferentemente, el tamaño más probable de las partículas de los agentes de contraste será menor que 3000 nm. Esta limitación viene de la necesidad de que la partícula sea administrada y se propague a través del tejido biológico, tal como los vasos sanguíneos microscópicos y / o el espacio intercelular. Más preferentemente, el tamaño más probable de las partículas será de menos de 1000 nm. Aún más preferentemente para ciertas aplicaciones que implican dianas moleculares, el tamaño más probable de las partículas será inferior a 100 nm. Por lo tanto, la invención abarca cualquier uso de agentes de contraste para la formación de imágenes optoacústicas que comprende partículas metálicas o agregados de partículas metálicas cuya forma se corresponde con la longitud de onda de la irradiación para la formación de imágenes y cuyo tamaño es menor que 1000 nm, preferentemente menor que 250 nm, y lo más preferentemente menor que 100 nm, pero mayor que 1 nm, y cuya composición está hecha para mejorar la respuesta acústica de la irradiación óptica pulsada.

[0031] En una forma de realización, la dimensión más larga de las nanopartículas más probables en una colección de nanopartículas está en el intervalo de aproximadamente 2 nanómetros a aproximadamente 200 nanómetros. Una colección de nanopartículas puede tener una pluralidad de modos de distribución de tamaño. Los términos "nanopartículas" y "materia de partículas nanométricas" tal como se utilizan aquí no se limitan a partículas que tienen dimensiones de 100 o menos, sino que se extiende a toda la gama de 1 nm a 3000 nm tal como se indica. En la práctica de la invención, la dimensión más grande de las partículas no esféricas será lo más preferentemente inferior a 100 nm, dentro de la clasificación más general de "nanopartículas".

[0032] Una colección de las partículas tiene tanto un peso promedio en número como un peso promedio en peso. El peso promedio en número es $NW = \sum(n_i w_i) / \sum(n_i)$, donde en cualquier muestra dada, n_i es el número de partículas que tienen un peso de partículas w_i . El promedio en peso es $WW = \sum(n_i w_i^2) / \sum(n_i w_i)$. Cuando todas las partículas tienen el mismo peso, NN y WW son iguales. Cuando hay una distribución de pesos, NN es más grande que WW. La relación de la media de peso con el promedio en número es una medida útil de la gama de pesos de partículas y puede ser definido como el índice de polidispersidad (PDI). Para un sistema ideal, el PDI será 1. La invención abarca cualquier uso de agentes de contraste para la formación de imágenes optoacústicas que comprenden partículas metálicas o agregados de partículas metálicas cuya forma se corresponde con la longitud de onda de la irradiación de formación de imágenes y para las que la relación de la media de peso de los pesos de partículas y el número promedio en pesos de partículas es preferentemente menor que 5, más preferentemente menor que 2, y lo más preferentemente menor que 1,2.

[0033] La espectroscopia de correlación de fotones se utiliza comúnmente para determinar el tamaño medio de partícula y la distribución de tamaño de partículas coloidales esféricas con diámetros entre 5 nm y 3 micras, y se puede utilizar para una determinación de las nanopartículas no esféricas de esta invención. Sin embargo, el índice de polidispersidad medida por espectroscopia de correlación de fotones (PI) es una definición funcional basada en las propiedades de desintegración de la función de autocorrelación de la intensidad de dispersión de la luz. El índice varía de 0 a 1 y es diferente del PDI que se ha definido anteriormente. En la práctica de la invención, el PI medido por espectroscopia de correlación de fotones de las partículas metálicas será preferentemente menor que 0,5, más preferentemente menor que 0,25, y lo más preferentemente menor que 0,1. La invención abarca cualquier uso de

agentes de contraste para la formación de imágenes optoacústicas que comprende partículas metálicas o agregados de partículas metálicas cuya forma está adaptada a la longitud de onda de irradiación para la formación de imágenes y para los cuales el índice de polidispersidad medido por espectroscopia de correlación de fotones es menor que 0,5, más preferentemente menor que 0,25, y lo más preferentemente menor que 0,1.

Composición

Partículas metálicas

[0034] El término "metálica," como se usa para caracterizar las materias de partículas nanométricas utilizadas en esta invención, significa un material eléctricamente conductor capaz de absorción de radiación electromagnética derivada de plasmones. Dicho material tiene un valor negativo de la parte real de la permeabilidad dieléctrica compleja. Por lo tanto, un material "metálico" incluye no sólo los metales verdaderos sino también de carbono y otros elementos que tienen un valor negativo de la parte real de la permeabilidad dieléctrica compleja. Adecuadamente el metal de una colección de nanopartículas al menos parcialmente metálicas se selecciona de entre oro, plata, platino, una forma de carbono que tiene propiedades metálicas, una mezcla de al menos dos de dichos metales, o una aleación de al menos dos de dichos metales.

[0035] La materia de partículas nanométricas o materias de partículas nanométricas "al menos parcialmente metálicas" utilizadas en esta invención pueden ser sólidas (es decir, compuestos por un material único que tiene un valor negativo de la parte real de la permeabilidad dieléctrica compleja o un compuesto o aleación de tales sustancias) o pueden comprender una envoltura. Para una estructura de envoltura, el núcleo puede ser metálico y la carcasa puede estar compuesta por un material dieléctrico. Como alternativa, las envolturas pueden ser metálicas y el núcleo pueden ser una sustancia dieléctrica o puede ser una sustancia de núcleo que tiene un coeficiente de expansión térmica en el intervalo de $9 \times 10^{-2} \text{ mm}^3/\text{joule}$ a $2 \times 10^3 \text{ mm}^3/\text{joule}$. Adecuadamente esta sustancia se selecciona de entre el grupo que consiste en agua, geles acuosos, hidrogeles, gases, lípidos y otras sustancias orgánicas.

[0036] Así, la invención abarca el uso de agentes de contraste de materia de partículas nanométricas que comprenden cualquier metal, aleación de metal, o combinaciones de metales y no metales. Las nanopartículas pueden comprender un solo metal, tal como el oro, o pueden ser estructuras en capas, tales como las formas de sílice cubiertas con envolturas de oro. Cuando las nanopartículas comprenden un solo metal son preferidos el oro, la plata, el paladio, y el platino. Los más preferidos son el oro y la plata. Especialmente preferido es el oro, para el que la resonancia de plasmón se produce en longitudes de onda excepcionalmente largas en comparación con la mayoría de los otros metales.

Partículas metálicas recubiertas

[0037] La invención abarca el uso de partículas que tienen un recubrimiento para optimizar las propiedades biológicas y químicas de las partículas y para maximizar la señal opto-acústica. La invención abarca el uso de partículas recubiertas de metal o agregados de partículas metálicas como agentes de contraste para la formación de imágenes opto-acústicas.

[0038] La invención abarca el uso de agentes de contraste que comprende tanto recubrimientos que están enlazados covalentemente a la superficie de las partículas y recubrimientos que se adhieren físicamente a la superficie de la partícula. Se preferirá en general este último procedimiento de unión. El material de recubrimiento puede comprender cualquiera de los elementos. Sin embargo, se prefieren los recubrimientos que comprenden carbono, oxígeno, nitrógeno, hidrógeno, azufre y fósforo.

[0039] Las superficies desnudas de las partículas metálicas son hidrófobas. Un recubrimiento diseñado para estabilizar una suspensión de partículas en una solución acuosa debe ser ambifílica, es decir, debe tener partes tanto hidrófobas como hidrófilas. Los tensioactivos son un ejemplo de sustancias ambifílicas. La invención abarca el uso de tensioactivos poliméricos o no poliméricos para estabilizar las partículas metálicas o agregados de partículas metálicas de la invención. Los tensioactivos particularmente deseables son copolímeros de bloques, especialmente copolímeros de bloque en el que un bloque es poli (etilenglicol) (PEG).

[0040] La invención abarca el uso de proteínas u otras moléculas biológicas como tensioactivos. La invención abarca además el uso de proteínas modificadas químicamente u otras moléculas biológicas como tensioactivos.

[0041] Uno de los propósitos de los agentes tensioactivos u otras sustancias utilizadas para recubrir las partículas es evitar la agregación de partículas. La agregación de partículas individuales daría lugar a crecimiento de partículas y a la precipitación de las partículas de la suspensión lo cual podría acortar la vida útil de cualquier formulación de agentes de contraste. La invención abarca el uso de agentes de contraste para la formación de imágenes optoacústicas que comprenden partículas metálicas o agregados de partículas metálicas que se estabilizan frente a la agregación y precipitación de partículas a través del uso de tensioactivos u otros recubrimientos de partículas.

[0042] Otro propósito de los agentes tensioactivos u otros revestimientos es modificar la vida en la sangre de las partículas. Por regla general, la materia en partículas es recogida por los macrófagos en el cuerpo y entonces es aclarada por el RES. El uso de derivados de poli (etilenglicol) (PEG) para alargar la vida útil de las formulaciones de fármacos en partículas es bien conocido (Kumar, 2000). Los liposomas ocultos ("stealth") son ejemplos de materiales en partículas en la que el PEG o un derivado del PEG sirve para inhibir la absorción de las partículas por el RES. La invención también abarca el uso de agentes de contraste para la formación de imágenes optoacústicas que comprenden partículas metálicas o agregados de partículas metálicas que se estabilizan contra la captación por el RES mediante agentes tensioactivos apropiados u otros recubrimientos de partículas.

[0043] Opcionalmente, el tensioactivo puede servir como una plataforma para la unión de otras especies químicas con propiedades biológicas o químicas deseables. Para este propósito, es deseable un agente tensioactivo u otro agente de superficie activa con grupos funcionales reactivos. Los tipos de grupos funcionales reactivos que son posibles para la práctica de esta invención incluyen, pero no se limitan a, grupos hidroxilo, grupos tiol, grupos amino, hidroxilos, halógenos, grupos ciano, grupos sulfhidrilo, carboxilo, y carbonilo, así como grupos con carbohidratos, dioles vicinales, tioéteres, 2-aminoalcoholes, 2-aminotioles, guanidinilo, imidazolilo y grupos fenólicos. La invención abarca el uso de agentes de contraste para la formación de imágenes opto-acústicas que comprende partículas metálicas o agregados de partículas metálicas que están estabilizadas frente a la captura por tensioactivos RES con cualquier grupo funcional reactivo adecuado para la fijación de vectores diana u otros grupos que modifican las propiedades físicas o químicas de las partículas de metal.

[0044] Opcionalmente, los tensioactivos u otros recubrimientos sobre las nanopartículas pueden ser infundidos con una sustancia que sufra un cambio de fase a una temperatura de entre 35 ° C y 100 ° C. Son deseables sustancias que son insolubles en agua a temperaturas inferiores a 100 ° C. Especialmente deseables lo son las sustancias que son insolubles en agua y que se someten a una transición de un líquido o sólido a un gas cuando la temperatura sube por encima de la temperatura corporal a medida que la energía se libera a través de la absorción de fotones por la partícula. Ejemplos de sustancias adecuadas para la infusión en el recubrimiento de las partículas son los hidrocarburos de bajo peso molecular, tales como el hexano y el pentano, los alcoholes tales como el 1-pentanol y el 1-hexanol, las cetonas tales como la dipropilcetona, y otros compuestos orgánicos. La invención abarca el uso de agentes de contraste con nanopartículas para la formación de imágenes optoacústicas que comprenden tensioactivos infundidos con cualquier compuesto que sufre una transición de fase entre 35 C y 100 ° C.

[0045] El patrón estructural general para la fijación de las especies químicas adicionales (aquí llamados MODIFICADORES) para los tensioactivos es: TENSIOACTIVO-ENLAZADOR-ESPACIADOR-ENLAZADOR-MODIFICADOR

[0046] Como resultado, tanto el tensioactivo como la fijación deberían tener grupos funcionales reactivos. El espaciador, que es opcional, deberían tener un par de grupos funcionales reactivos. La invención también abarca el uso de agentes de contraste para la formación de imágenes opto-acústicas que comprenden partículas metálicas o agregados de partículas metálicas que están estabilizadas frente a la captura por el RES mediante tensioactivos u otros recubrimientos de partículas apropiados a lo cuales los modificadores se unen mediante uno o más enlazadores y un espaciador opcional.

[0047] Los espaciadores pueden contener enlaces que son escindibles bajo la acción de las enzimas, ácidos, bases y otras entidades biológicas o químicas. Con estos espaciadores escindibles, le será posible al agente de contraste tener propiedades variables con el tiempo. Por ejemplo, antes de la escisión del espaciador, el agente de contraste puede tener una fuerte afinidad por ciertas células, órganos, o lesiones de la enfermedad. Después de la escisión, se elimina rápidamente del cuerpo. La invención abarca el uso de agentes de contraste con nanopartículas para la formación de imágenes optoacústicas que comprende tensioactivos con modificadores unidos directamente o por medio de enlazadores y espaciadores que son escindibles bajo la acción de enzimas, ácidos, bases, u otras entidades químicas.

[0048] Un modificador particularmente deseable en la práctica de la invención es un "vector de reconocimiento". Un vector de reconocimiento es cualquier grupo químico o ligando que se une a un "receptor de reconocimiento" asociado con el órgano o lesión de interés. El vector de reconocimiento se puede obtener a partir de cualquier especie química sintética, semi-sintética, o de origen natural. Los materiales o sustancias que pueden servir como vectores de reconocimiento incluyen aminoácidos, péptidos, oligopéptidos, polipéptidos, proteínas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, hormonas, análogos de la hormona, glicoproteínas, lectinas, azúcares, sacáridos, incluyendo monosacáridos y polisacáridos, carbohidratos, vitaminas, esteroides, análogos de esteroides, hormonas, cofactores, y material genético, incluyendo nucleósidos, nucleótidos, construcciones de nucleótidos y polinucleótidos y derivados de estos materiales. El vector de reconocimiento puede ser o bien una molécula independiente o un fragmento molecular. La invención abarca el uso de agentes de contraste para la formación de imágenes opto-acústicas que comprenden partículas metálicas o agregados de partículas metálicas a los cuales se unen uno o más vectores de reconocimiento, ya sea a través de un enlace químico o mediante la interacción directa con la superficie de la partícula.

[0049] Independientemente de si los vectores de reconocimiento se adhieren directamente a la superficie de la partícula de metal o se unen indirectamente a través del tensioactivo, los receptores para los que los vectores de reconocimiento tienen una afinidad especial pueden ser grupos químicos, proteínas, u otras especies que se sobreexpresan mediante tejido o células cancerosas. En general, el término "receptores" puede ser cualquier característica química del tipo de órgano o tejido a explorar. Los receptores también pueden ser entidades químicas independientes en la sangre u otros fluidos corporales. Algunos ejemplos de estos receptores son fármacos administrados externamente, componentes de fármacos, o metabolitos de fármacos. La invención abarca el uso de agentes de contraste para la formación de imágenes opto-acústicas que comprende partículas metálicas o agregados de partículas metálicas que están modificados específicamente para interactuar con los sitios receptores que son característicos de las células cancerosas, tumores cancerosos, sistemas vasculares, sitios de infección, o sitios de inflamación. Ejemplos de receptores relacionados con los genes celulares de cáncer incluyen, pero no se limitan a, factor de crecimiento endotelial vascular, receptor del factor de crecimiento epidérmico, el receptor HER2/neu, el receptor de folato, la proteína de grasa de la leche humana, la anexina-5, el antígeno nuclear celular de proliferación etc

[0050] En una realización de la invención, las nanopartículas al menos parcialmente metálicas en una colección de nanopartículas están al menos parcialmente recubiertas con un material dieléctrico inorgánico.

Radiación electromagnética

[0051] De acuerdo con la invención, una longitud de onda o espectro de longitudes de onda de radiación electromagnética se escoge para coincidir con la máxima absorción para nanopartículas no esféricas al menos parcialmente metálicas que pueden estar al menos parcialmente recubiertas con material dieléctrico orgánico o inorgánico o conjugadas con moléculas biológicas.

[0052] El procedimiento de formación de imágenes abarcado por la invención se puede realizar mediante irradiación con irradiación electromagnética de cualquier frecuencia o longitud de onda para generar ondas acústicas o de presión en el cuerpo. Se prefieren longitudes de onda en la gama visible o infrarroja desde alrededor de 200 a alrededor de 3000 nm. La más preferida es la irradiación en el rango de longitud de onda en el infrarrojo cercano desde 650 hasta 1.200 nm. La irradiación puede ser generada con un láser, aunque la invención abarca el uso de cualquier fuente de radiación, independientemente de si se le puede llamar láser. Algunos ejemplos de fuentes de radiación alternativas incluyen lámparas de destello, las fuentes incandescentes, klistrones, sustancias radiactivas, etc. La invención abarca el uso de agentes de contraste para la formación de imágenes optoacústicas que comprenden partículas de metal o agregados de metal con irradiación electromagnética de cualquier longitud de onda, preferentemente una longitud de onda entre 200 y 3000 nm, más preferentemente una longitud de onda entre 650 y 1200 nm.

[0053] La longitud de onda seleccionada o rango seleccionado de longitudes de onda de radiación electromagnética utilizado junto con nanopartículas al menos parcialmente metálicas de forma perfilada para esta invención se selecciona de entre el espectro de longitudes de onda en el rango que va desde 3 nanómetros a 300 milímetros. Según una realización las longitudes de onda están en el espectro visible e infrarrojo cercano. Adecuadamente el espectro está en rango de longitudes de onda que va desde 650 nanómetros a 1150 nanómetros. Ventajosamente, las nanopartículas comprenden oro y la longitud de onda de irradiación va desde aproximadamente 520 nanómetros a aproximadamente 1120 nanómetros.

[0054] En una realización, la longitud de onda para irradiación va desde aproximadamente 520 nanómetros a aproximadamente 1120 nanómetros, y las nanopartículas en una colección son al menos parcialmente oro, son alargadas en al menos una dimensión, y tienen una relación de aspecto más probable de al menos 2.0. Según otra realización, la longitud de onda para irradiación va desde aproximadamente 520 nanómetros a aproximadamente 1120 nanómetros, las nanopartículas en una colección son al menos parcialmente oro, son alargadas, y tienen una distribución bimodal de relaciones de aspecto. En una realización particular de la última realización, un máximo local en la distribución de relaciones de aspecto es de aproximadamente 4 y el otro máximo local en la distribución de relaciones de aspecto es de aproximadamente 8. En una distribución multimodal de relaciones de aspecto, la radiación electromagnética comprende dos o más rangos de longitud de onda. En un ejemplo de distribución bimodal de relaciones de aspecto de nanopartículas alargadas al menos parcialmente de oro, una banda de longitud de onda va desde aproximadamente 690 nanómetros a aproximadamente 800 nanómetros y otra banda de longitud de onda va desde aproximadamente 800 nanómetros a aproximadamente 1150 nanómetros.

[0055] La señal opto-acústica se produce mediante absorción de resonancia por plasmones por electrones conductores en las nanopartículas utilizadas en la invención. Adecuadamente, la radiación electromagnética utilizada es por pulsos y se emite desde un láser por pulsos. Como alternativa, la radiación electromagnética es una onda continua modulada.

[0056] En una realización de la invención, la interacción de nanopartículas con el objeto que se está detectando produce un desplazamiento de la absorción máxima por las nanopartículas para la longitud de onda o rango de longitudes de onda seleccionados.

El cuerpo para Administración de Materias de partículas nanométricas

[0057] El cuerpo en el que se detecta un objeto específico de acuerdo con el procedimiento de detección de esta invención puede estar vivo o muerto, y el objeto específico puede estar vivo o muerto. Por lo tanto, sin limitación, en términos de importancia médica, por ejemplo, el cuerpo puede ser una muestra in vivo o in vitro, y el objeto puede ser una molécula o un virus o una bacteria. El cuerpo vivo puede ser un ser vivo humano o no humano, y el objeto puede ser biológico y comprender un tejido específico, células, microorganismos o moléculas. Por ejemplo, el objeto detectado puede ser un tumor en un ser humano vivo o una molécula fisiológicamente operativa tal como la glucosa, una enzima, un receptor de la proteína o un ácido nucleico.

[0058] La invención será especialmente útil con respecto a la formación de imágenes médicas de cuerpos humanos o no-humanos. Sin embargo, también se prevén varios otros usos para la invención. Por ejemplo, el procedimiento será útil para la detección sensible de patógenos ambientales, tales como las bacterias dañinas, esporas de agentes biológicos nocivos, o virus. Cuando se examina a un patógeno sospechoso, por lo general será suficiente que la muestra de ensayo simplemente sea bañada en la formulación que contiene el agente de contraste.

Administración

[0059] Para la formación de imágenes de un cuerpo humano o no-humano, son posibles muchos modos de aplicación, dependiendo de los requisitos de formación de imágenes. La administración del agente de contraste puede ser sistémica o local. La administración puede realizarse por vía intravenosa, por vía oral, por vía tópica o por medio de la aplicación directa del agente a los tejidos o células humanos o no humanos.

[0060] En una forma de realización de la invención, las partículas de metal o agregados de partículas de metal se atrapan en vesículas lipídicas o liposomas. Como se conoce en la técnica, los liposomas son vesículas hechas a partir de fosfolípidos que definen una fase lipídica que encapsula a una fase acuosa. Los liposomas se pueden preparar a partir de un fosfolípido, tal como, por ejemplo, dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) y dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). La pared de lípidos se puede reforzar cuando sea necesario mediante el uso de colesterol en la fase lipídica para evitar la fuga por la pared de lípidos. Los fosfolípidos utilizados para encapsular el colorante pueden tener una temperatura de transición por debajo de 37 °C, como por ejemplo el fosfatidil colina. Los liposomas pueden a su vez comprender uno o más vectores de reconocimiento. Por lo tanto, la invención abarca la formación de imágenes opto-acústicas con agentes de contraste que comprenden partículas metálicas o agregados de partículas metálicas cuya forma se sintoniza con la longitud de onda de la radiación para la formación de imágenes y que están encerradas en las vesículas de liposomas u otras estructuras vesiculares cerradas.

[0061] Opcionalmente, la pared lipídica de los liposomas usados en la práctica puede ser infundida con una sustancia que sufre un cambio de fase a una temperatura entre 35 °C y 100 °C. Son deseables las sustancias que son insolubles en agua a temperaturas inferiores a 100 °C. Especialmente deseables lo son las sustancias que son insolubles en agua y se someten a una transición de un líquido o sólido a un gas a medida que la temperatura se eleva por encima de la temperatura corporal a medida que la energía se libera a través de la absorción de fotones por las partículas. Algunos ejemplos de sustancias adecuadas para la infusión en la bicapa lipídica son los hidrocarburos de bajo peso molecular, tales como el hexano y el pentano, alcoholes tales como el 1-pentanol y el 1-hexanol, las cetonas tales como la dipropilcetona, y otros compuestos orgánicos. La invención abarca el uso de partículas de metal o agregados de partículas de metal atrapados en vesículas lipídicas o liposomas infundidos con cualquier compuesto que sufre una transición de fase entre 35°C y 100°C para la formación de imágenes opto-acústicas.

[0062] En general, la porción de partículas del agente de contraste se dispersa en un vehículo líquido estéril, que puede ser agua, una solución acuosa tal como solución salina, un líquido orgánico, o un aceite, incluyendo los aceites de origen animal, mineral o sintético. Además, las formulaciones utilizadas para la práctica de la invención pueden incluir una variedad de excipientes tales como uno o más lípidos neutros, lípidos cargados, gases, precursores gaseosos, líquidos, aceites, agentes de diagnóstico, ligandos de orientación y / o agentes bioactivos. La formulación también puede comprender estabilizadores para retardar la degradación química de los componentes.

[0063] En una forma de realización de la invención, los agentes de contraste se administran en conjunción con el uso de hipertermia, es decir, la elevación artificial de la temperatura local de un órgano u otra parte del cuerpo. Kong, y otros (2000 y 2001) enseñan que la hipertermia acelera el paso de nanopartículas a través de los capilares del sistema vascular de los tumores en crecimiento. La hipertermia también mejorará la captación del agente de contraste de otros tipos de tejido enfermo, los sitios de inflamación causados por la infección o trauma.

[0064] La presente invención prevé además el uso de un agente de contraste para la formación de imágenes optoacústicas en conjunción con la terapia. Por lo tanto, la composición puede contener fármacos adsorbidos, pro-fármacos, u otros agentes terapéuticos tales como compuestos que absorben la luz útiles en la terapia fotodinámica.

[0065] En una aplicación particular de la invención, el procedimiento incluye generar una imagen de un objeto en un cuerpo vivo humano o no-humano animal o de una parte de este y comprende: (a) administrar al cuerpo vivo un agente de contraste fisiológicamente tolerable que comprende una colección de nanopartículas al menos parcialmente metálicas que tienen (i) un tamaño más probable no menor que aproximadamente 1 nanómetro y no mayores que aproximadamente 1000 nanómetro y (ii) una forma perfilada capaces de absorber longitudes de onda de radiación electromagnética seleccionadas específicas, (b) exponer el cuerpo vivo o una parte de este a radiación electromagnética en el rango infrarrojo cercano de espectro de longitudes de onda que tiene una longitud de onda o rango de longitudes de onda seleccionados mayores en un factor de al menos 3 con respecto al tamaño mínimo de dichas nanopartículas, (c) detectar a señal opto-acústica generada en dicho cuerpo como resultado de calentar dicha colección de nanopartículas al menos parcialmente metálicas, y (d) generar una imagen a partir de dicha señal detectada. Adecuadamente la señal opto-acústica se convierte en una señal electrónica empleando un detector seleccionado de entre detectores térmico, acústico, óptico o infrarrojo o una combinación de uno o más de estos detectores que se usan para generar la imagen. Las nanopartículas recogidas en el objeto, y la imagen proporcionan información visual acerca del objeto detectado.

[0066] Según otro aspecto de la invención, el agente de contraste se utiliza en un procedimiento de detección y tratamiento de un tumor, en el que dicho tumor de un cuerpo vivo humano o no-humano animal o de una parte de este se detecta y trata de manera no invasiva para destruir la viabilidad del tumor. Dicho procedimiento de tratamiento de un tumor, comprende (a) administrar al cuerpo o a una parte de este de manera a posicionarlo donde se desea examinar la presencia de un tumor un agente de contraste fisiológicamente tolerable que comprende una colección de nanopartículas al menos parcialmente metálicas que tiene un tamaño más probable no menor que aproximadamente 1 nanómetros y no mayores que aproximadamente 1000 nanómetros y una forma perfilada capaces de absorber longitudes de onda de radiación electromagnética seleccionadas específicas, (b) exponer el cuerpo o una parte de este a radiación electromagnética en el rango infrarrojo cercano de espectro de longitudes de onda que tiene longitud de onda o rango de longitudes de onda seleccionados mayores en un factor de al menos 3 con respecto al tamaño mínimo de las nanopartículas, (c) detectar una señal opto-acústica generada en el cuerpo con el resultado de calentar la colección de nanopartículas al menos parcialmente metálicas, (d) convertir la señal opto-acústica en una señal electrónica caracterizado por el hecho de que al menos un parámetro seleccionado de entre amplitud, frecuencia, fase, perfil temporal, tiempo de llegada, espectro de frecuencias, o una combinación de cualquiera o más de estos, (e) presentar la señal para una evaluación de el al menos un parámetro por un humano o una máquina para detectar si un tumor está presente en el cuerpo, y (f) dirigir sobre las nanopartículas una longitud de onda o rango de longitudes de onda seleccionados no absorbidas por agua para calentar las nanopartículas en el tumor y aumentar la temperatura del tumor suficientemente como para destruir la viabilidad del tumor.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0067] Figura 1. Sección transversal de absorción óptica de las nanopartículas de oro con igual volumen de 33.493 Nm³. Las nanopartículas alargadas poseen mayor coeficiente de absorción en comparación con las nanopartículas esféricas y su pico de absorción es más estrecho

Figura 2. Coeficiente de extinción molar en [cm⁻¹] para nanobarras de oro y elipsoides de revolución como una función de la longitud de onda de irradiación óptica [μm]. Las curvas coinciden casi totalmente con la mínima desviación entre sí.

Figura 3. Geometría y definiciones de una nanopartícula esférica alargada.

Figura 4. Dependencias de λ_{res} en p_i para un nanoelipsoide de oro de volumen 104 nm³ con una envoltura de proteína, colocada en agua y orientada de forma paralela al campo eléctrico incidente para diferentes q .

Figura 5. Dependencias de sobre p_i para nanoelipsoides de oro con una envoltura de proteína en agua orientada de forma paralela al campo eléctrico incidente para diferentes q .

Figura 6. Espectro de absorción óptica del colorante de verde indocianina. El máximo coeficiente de extinción de una solución 1-molar de ICG es de aproximadamente 110,000 cm⁻¹.

Figura 7A. Señal opto-acústica detectada en solución clorante frente a una suspensión de nanoesfera de igual absorción. La amplitud optoacústica en caso de nanopartículas excede la de la solución de colorante en aproximadamente 8 veces.

Figura 7B. Imagen optoacústica del maniquí de gel con nanobarras de oro incrustadas con relación de aspecto 8 y solución acuosa de CuSO₄ de absorbancia similar en la longitud de onda de 1064-nm. La imagen de nanobarras es aproximadamente 2 veces más brillante.

Figura 8A. Amplitud de señal opto-acústica como función de la fluencia óptica en agua suspensión de nanotubos de carbono (línea continuo) y en una solución de CuSO₄ (línea a trazos).

Figura 8B. Imágenes optoacústicas bidimensionales de tres pasadores hechos de un polímero lleno de nanotubos de carbono de pared simple incrustados a una profundidad de 5 cm dentro del maniquí de gel que simulan el tejido normal. El panel izquierdo es una imagen sin tratar y el panel de la derecha es la misma imagen con fondo eliminado.

Figura 9A. Diagrama esquemático del nanobiosensor optoacústico.

Figura 9B. Señal optoacústica de nanopartículas como una función de fluencia de la irradiación.

Figura 10A. Espectros de absorción de nanopartículas de oro (esfera de radio de 20 nm, elipsoide de rotación con excentricidad de 4, cable corto con una relación de aspecto de 8).

Figura 10B. Sección transversal de absorción como una función del radio de la esfera para 2 longitudes de onda (532 nm, 1064 nm).

Figura 10C. Radio de la burbuja de vapor como una función del tiempo tras la irradiación con láser pulsado con longitud de onda de 532-nm y fluencia de 10 mJ/cm².

Figura 11A. Diagrama esquemático

Figure 11B. Señales optoacústica detectadas a partir de un maniquí de gel con tumores modelo llenos de nanoesferas de diversas concentraciones de 10¹⁰ to 10⁸ NP/cm³.

Figura 11C. Amplitudes de las mismas señales que en la Figura 11B representadas como una función de la concentración de nanopartículas.

Las figuras 11B-11C demuestran la alta sensibilidad de la detección optoacústica (una concentración de aproximadamente 1 picomol por litro se detectó con una relación de señal-a-ruido de 2).

Figuras 12A y 12B. Fotografía de un fantasma de gel y una imagen optoacústica del mismo fantasma, respectivamente. e incorporaron tres tubos de plástico transparente delgados en el gel y se visualizaron por LOIS. Estos tubos se llenaron con tres medios: el mismo gel empleado en el espectro (izquierda), nanopartículas de oro

esféricas de 40 nm con concentración de 10⁹ NP/cm³ (centro) y células de cáncer de mama SK-BR3 direccionadas con nanopartículas de oro (a la derecha).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0068] La invención es un procedimiento para la formación de imágenes opto-acústicas con la ayuda de agentes de contraste que comprende materias de partículas nanométricas de metal no esféricas. Las propiedades ópticas de las nanopartículas de metal están "sintonizadas" para maximizar la absorción de luz y generar la señal optoacústica en la longitud de onda de irradiación utilizada para la formación de imágenes a través del control de la forma, composición y dimensiones de las materias de partículas nanométricas.

[0069] La invención abarca el uso de agentes de contraste para la formación de imágenes opto-acústicas que comprenden materias de partículas nanométricas metálicas en el que la forma, composición, y dimensiones de las partículas se eligen para la máxima absorción de la radiación utilizada para la formación de imágenes opto-acústicas. Preferentemente, la elección de la forma, composición, y dimensiones de las partículas situarán la absorción máxima de las partículas cerca de la longitud de onda de irradiación. Más preferentemente, la elección de la forma, composición, y dimensiones de las partículas situarán la absorción máxima de las partículas cerca de la longitud de onda de irradiación y maximizarán la absorción de luz a esa longitud de onda.

[0070] En esta invención, la sensibilidad y el contraste de una imagen optoacústica se han mejorado mediante el uso de agentes de contraste que comprenden partículas de metal cuyas propiedades ópticas están "sintonizadas" con la longitud de onda de la radiación de excitación para la formación de imágenes opto-acústicas mediante la forma, composición, y dimensiones de las partículas metálicas. En la práctica de la invención, la forma, composición, y dimensiones de las partículas metálicas pueden, además, optimizar la respuesta acústica de las partículas metálicas a la radiación electromagnética pulsada. Los agentes de contraste pueden comprender agentes tensioactivos o tensioactivos en las superficies de las partículas metálicas, así como sustancias para modificar las propiedades químicas y físicas de las partículas metálicas ("modificadores"), que pueden a su vez ser tensioactivos e interactuar directamente con las partículas metálicas o se pueden unir a o interactuar con los agentes tensioactivos o tensioactivos. Los modificadores pueden ser "vectores de reconocimiento" para mejorar la afinidad de los agentes de contraste para ciertos sitios receptores específicos en los órganos, tejidos, o lesiones de la enfermedad de interés o para las sustancias químicas contenidas en los fluidos de los órganos, tejidos, o lesiones de la enfermedad. Los modificadores también pueden servir para retardar la depuración en el cuerpo de las partículas metálicas. La invención prevé el uso de los agentes de contraste como parte de una formulación que puede comprender varios otros excipientes y estabilizadores de fármacos.

Partículas

[0071] En el caso general, las partículas metálicas estarán representadas por tres clases. La primera clase de formas de partículas comprenden partículas alargadas sólidas tales como elipsoides alargados; sólidos achatados, y barras, incluyendo barras cilíndricas y barras no cilíndricas (partículas redondas con simetría axial) y paralelepípedos y pirámides (poliedros, partículas que tienen un número de superficies planas y esquinas). Las barras cilíndricas son barras para las que todas las secciones transversales a lo largo de uno de los ejes en el espacio de tres dimensiones son círculos. Las barras no cilíndricas son formas alargadas para las que todas las secciones transversales a lo largo de uno de los ejes en el espacio tridimensional son no-círculos equivalentes. En general, las partículas de metal tendrán una forma alargada, es decir, cualquier forma geométrica en la que una dimensión es más larga que las otras dos dimensiones en el espacio tridimensional. La segunda clase de formas de partículas que pueden ser útiles en aplicaciones optoacústica es una clase de envolturas de poliedros. Las envolturas pueden ser cubos, de metal hueco o de metal lleno de dieléctrico o de metal cubierto con dieléctrico. Se pueden usar las partículas con esquinas, tales como paralelepípedos sólidos y cajas huecas, pirámides, conos, etc. La nueva aplicación de estas partículas está en la detección y la formación de imágenes optoacústicas.

[0072] La invención abarca el uso de agentes de contraste en forma de partículas que comprenden cualquier metal, aleación de metal, o combinaciones de metales y no metales. Las nanopartículas pueden comprender un solo metal, tal como el oro, o pueden ser estructuras en capas, tales como barras de sílice cubiertas de envolturas de oro. Cuando las partículas comprenden un solo metal, se prefieren el oro y la plata. Incluso se prefiere aún más el oro, especialmente para aplicaciones relacionadas con la detección de la profundidad del medio ópticamente turbio, tal como el tejido. Para el oro, la resonancia de plasmones se produce excepcionalmente en longitudes de onda larga en el rango espectral visible en comparación con la mayoría de los otros metales.

[0073] La invención también puede abarcar el uso de nanopartículas hechas de nanotubos de carbono con propiedades metálicas. Sorprendentemente, se encontró que los nanotubos de carbono poseen excepcionalmente una fuerte respuesta ultrasónica (presión) a la irradiación de láser pulsado en el rango espectral del infrarrojo cercano. Los pulsos de presión inducidos por láser en una mezcla de nanotubos de carbono fue significativamente más fuerte que la de una solución de colorante con absorción óptica similar. A partir de los estudios preliminares, creemos que los nanotubos de carbono de pared única con propiedades metálicas serán los más preferidos como agente de contraste optoacústico (optoacústico). Sin embargo, a partir de nuestro hallazgo, no sería sorprendente para un experto en la técnica que los nanotubos de carbono de paredes múltiples con diversas estructuras también puedan poseer una fuerte respuesta de presión a la radiación electromagnética pulsada y por lo tanto, puedan ser utilizados como agentes de mejora de la señal en los sistemas optoacústicos (optoacústica).

[0074] Las partículas usadas en la práctica de la invención pueden ser o bien sólidas, es decir, que pueden estar compuestas de un solo metal, o pueden ser envolturas de metal llenas de otra sustancia. Las sustancias preferidas tendrán excepcionalmente grandes coeficientes térmicos de expansión. Algunos ejemplos de sustancias que pueden estar contenidas en las envolturas de metal para la práctica de la invención son el agua, los gases tales como nitrógeno, argón, y neón, geles acuosos, tales como geles de poliacrilamida y geles que contienen gelatina, y sustancias orgánicas tales como el etanol. Los rellenos preferidos para las envolturas de metal son los lípidos, ácidos grasos de cadena larga, hidrocarburos orgánicos, y otros compuestos orgánicos que comprenden cadenas de hidrocarburos de cadena lineal con 14 o más átomos de carbono. Los expertos en la técnica reconocerán muchas otras sustancias que se pueden utilizar como rellenos en la práctica de la invención.

[0075] La forma de las partículas es más crítica en el ajuste a la longitud de onda de irradiación de lo que los es el tamaño de las partículas. Sin embargo, las partículas deben ser más pequeñas que la longitud de onda de la radiación. Por otra parte, el tamaño de las partículas es crucial en el control de las propiedades biológicas de las partículas, especialmente la bio-distribución y la tasa de depuración de la sangre. Por razones biológicas, se favorecerán las partículas más pequeñas por lo general frente a partículas más grandes. Sin embargo, los tamaños de partícula lo suficientemente grandes para dispersar la luz serán de utilidad para la distribución de la radiación internamente en el tejido. En última instancia, habrá un compromiso entre los posibles tamaños de partícula.

[0076] Hay dos razones principales por las que esta invención enseña que las nanopartículas sólidas alargadas, envolturas y envolturas alargadas serán las más útiles como agentes de contraste optoacústico. En primer lugar, estas partículas absorben la radiación electromagnética con un máximo de absorción a una longitud de onda significativamente desplazada hacia longitudes de onda más largas en comparación con el rango de longitud de onda de las partículas de forma esférica del mismo volumen total, composición y en otros aspectos idénticas a dichas partículas no esféricas. En segundo lugar, dichas partículas absorben la radiación electromagnética más fuertemente que las partículas de forma esférica del mismo volumen total y en otros aspectos idénticas a las partículas no esféricas ya conocidas.

[0077] En una típica formulación del agente de contraste utilizado para la práctica de la invención, habrá una distribución de tamaños de partículas. El tamaño "más probable" es el tamaño más probable que se encuentra cuando se selecciona una partícula individual de la mezcla, lo cual ya se discutió anteriormente en el resumen de la invención en relación con el peso promedio, pesos moleculares promedio en número y en peso. En la práctica de esta invención, la relación entre el promedio en peso de los pesos de partículas y el promedio en número de los pesos de partículas será preferentemente menor que 10, con independencia del procedimiento de medición de los pesos de las partículas. Más preferentemente, será menor que 5, independientemente del procedimiento de medición de los pesos de partículas. Aún más preferentemente, será menor que 1,2. Experimentalmente, puede que no siempre sea posible determinar directamente, ya sea el promedio en número o el promedio en peso de los pesos de partículas. Los procedimientos tales como la cromatografía de permeación en gel o de exclusión por tamaño separan las partículas por tamaño en lugar de peso. Con la calibración correcta de los resultados, es posible relacionar el tamaño de partícula de la partícula de peso, pero el análisis se complica cuando las partículas tienen una forma no esférica. Muchos procedimientos de caracterización proporcionan un solo momento de la distribución completa de pesos. El uso de la espectroscopia de fotones para determinar el tamaño medio de partícula y la distribución de tamaño también se ha descrito anteriormente en el resumen de la invención. En la práctica de la invención, el PI medido por espectroscopia de correlación de fotones de las partículas metálicas será preferentemente menor que 0,5, más preferentemente menor que 0,25, y aún más preferentemente menor que 0,1.

[0078] Una forma preferida es una barra cilíndrica. Para las barras metálicas, la relación de aspecto, que es la relación entre la longitud de una barra y su diámetro, es el parámetro crítico que controla la adecuación a la longitud

de onda de irradiación. Para las barras de oro, los datos publicados por Link y El-Sayed, 1999 permiten la determinación de la relación de aspecto óptima. Para la irradiación a 600 nm, la relación óptima es 2,0; para 650 nm, es 2,5, para 700 nm, es 3,0, para 750 nm, es 3,5, y para 800 nm, es de 4,0. Los expertos en la materia reconocerán inmediatamente que esta información se extrapola e interpola fácilmente a otras longitudes de onda.

[0079] Como es el caso de los pesos de partículas, generalmente habrá una gama de relaciones de aspecto de las barras de metal. La relación de aspecto "más probable" es la relación de aspecto más probable que se encuentra cuando se selecciona una partícula individual de la mezcla. La utilidad de la relación de las relaciones de los aspectos del promedio en peso con respecto al promedio en número para la medición de la anchura de la distribución de relaciones de aspectos se describió anteriormente en el resumen de la Invención. Para la irradiación a 760 nm, la relación de aspecto más probable de partículas cilíndricas de oro utilizadas en la práctica de la invención será preferentemente de entre 3,5 y 4,0. Más preferentemente, la relación de aspecto más probable será 3,5 y 3,7.

[0080] Un procedimiento eficaz para medir las relaciones de aspecto número-promedio y promedio en peso es el análisis detallado de una imagen a partir de la microscopía electrónica de transmisión y barrido. Para el análisis, se elimina el disolvente de las partículas de modo que se depositan sobre una superficie sin cambios (procedimiento de gota seca). A continuación, se tabulan las formas y los tamaños de las partículas en una región representativa de la superficie, y se calculan el promedio en número y el promedio en peso de los tamaños de partícula y de las relaciones de aspecto. La invención prevé que estarán disponibles procedimientos alternativos para medir las relaciones de aspecto promedio.

[0081] Un procedimiento alternativo útil de la determinación de la forma de las partículas se basa en el espectro óptico. En cada caso, el espectro de una colección ideal de partículas con forma, composición y dimensiones uniformes puede ser fácilmente calculado a partir de la teoría conocida de Mie-Gans. Como se mencionó anteriormente, para una composición dada la forma de las partículas afecta al espectro de absorción mucho más fuertemente de que lo hace el tamaño de partícula. Por lo tanto, el ajuste por ordenador de los espectros experimentales para las colecciones reales de partículas metálicas en términos de los espectros de partículas de metal de una gama de formas proporciona entonces la distribución de las formas de las partículas. A partir de la distribución calculada de las formas de las partículas, puede determinarse entonces el promedio en número y peso promedio de los tamaños de partícula.

[0082] La invención prevé el uso de agentes de contraste sensibles a dos longitudes de onda de irradiación diferentes. En este caso, el agente de contraste comprenderá partículas con dos relaciones de aspecto diferentes. Por ejemplo, la forma, la composición y dimensiones de un tipo de nanopartículas en la mezcla serán elegidos para que coincidan con la longitud de onda de 757 nm. Esta longitud de onda es emitida por un láser de alejandrita y es especialmente útil para la detección de tumores vasculares rico en sangre hipóxica. La forma, composición, y dimensiones del segundo tipo de nanopartículas en la mezcla serán elegidos para que coincida con la longitud de onda de 1100 nm. Esta longitud de onda es altamente penetrante y es especialmente sensible a los tumores y otros tejidos que contienen sangre desoxigenada. La comparación de las imágenes obtenidas con un agente de contraste que contiene una mezcla de tamaños de partículas será un procedimiento poderoso para la diferenciación entre el tejido enfermo y el tejido inofensivo ya sea normal o anormal.

[0083] Los procedimientos para la preparación de suspensiones coloidales de nanopartículas de oro son bien conocidos. Se ha descrito el uso de partículas esféricas en los agregados de nanopartículas no esféricas de esta invención. Las partículas esféricas se pueden preparar fácilmente por reducción química del ácido tetracloroáurico (Beesley, 1989). Varios agentes químicos y moléculas biológicas se adhieren fácilmente a la superficie de estas esferas (Beesley, 1989, Hayat, 19889).

[0084] Las suspensiones coloidales de partículas de oro esféricas con anticuerpos adsorbidos fueron descritos por Hainfeld, 1995 y por otros (Beesley, 1989, Hayat, 1989). Las nanopartículas esféricas de oro pueden ser producidas por un procedimiento según Hayat. Una mezcla de 1 ml de una solución de 1 mg de ácido tetrahidrocloaurico (AuCl_3) en 100 ml de agua destilada y 50 ml de agua se llevó a ebullición con agitación constante. A esto se añaden 0,5-5,0 ml de una solución de 1 mg de citrato trisódico en 100 ml de agua destilada. La ebullición se continuó durante 5 min, tiempo durante el cual (después de 20-30 segundos) la solución se vuelve púrpura debido a la formación del oro coloidal. Al final del periodo de reacción, el líquido se enfría con agua corriente. El pH debe ser de aproximadamente 5,0. Los diferentes tamaños pueden ser producidos a través de la variación en la cantidad de ácido cítrico utilizado. Cuando la preparación se lleva a cabo con 1 ml de solución de ácido cítrico, el tamaño de partícula será de alrededor de 36 nm, y el índice de polidispersidad (PI), medido por espectroscopia de correlación de fotones será de aproximadamente 0,35. La estabilización opcional de la suspensión coloidal de partículas frente a la agregación y la precipitación se lleva a cabo mediante la adición de 4 g/l de Poloxamer 188 a la solución final. Unas cantidades comparables de otros tensioactivos poliméricos también serán suficientes para la estabilización.

[0085] También se han descrito varios procedimientos para la preparación de partículas de oro no esféricas. La preparación de nanobarras en una matriz produce partículas con una distribución estrecha de tamaños y formas

(Sandrock y otros, 1999). Se puede disolver el óxido de aluminio para liberar las partículas de oro a través de tratamiento con una base (van der Zande y otros, 1997).

[0086] Un procedimiento para la deposición de oro en una membrana de óxido de aluminio poroso, seguido de la liberación de las partículas de la matriz se hace según van der Zande y otros y Sandrock et al., tal como se describe a continuación.

[0087] Se colocan unas bobinas de acero inoxidable conectadas con un baño de circulación de refrigeración externa manteniendo una mezcla 1: 1 de etilenglicol y agua a 0°C en una celda de anodización de dos electrodos. Una lámina de plomo (6,5 x 14 x 0,2 cm) sirve como cátodo y una placa pulida de aluminio (10 x 10 cm) como ánodo. El electrolito es ácido sulfúrico 6%. Una película de óxido de aluminio con un tamaño de poro de 32 nm y un espesor de 40 a 60 micras se desarrolla después de 14 h con la aplicación de un potencial de pila de 20 V. El potencial se reduce gradualmente desde 20 V a 2 V durante un período de 1,5 horas. En cada etapa de reducción del potencial se dejó subir a 85% del valor anterior antes de que se reduzca aún más. Entonces se libera la película de la placa de aluminio por inmersión de la placa en una solución al 25% de ácido sulfúrico durante aproximadamente 3 horas. Luego las películas se enjuagaron con agua desionizada, etanol, y acetona y se secó al aire. Si se desea, las películas se pueden tratar brevemente con 1,25 M de NaOH para ampliar el tamaño de poro. El lado de la película de barrera se pulveriza con aproximadamente 45 nm de plata con un dispositivo de deposición de plasma. La película recubierta de plata se une después a una celda de tres electrodos equipada con un electrodo de referencia de Ag / AgCl y un contraelectrodo de malla de platino. Una base de 0,80 a 1,27 C/cm² se deposita a partir de una solución de chapado de tiocianato de plata con la aplicación de 0,6 V frente a un electrodo de Ag / AgCl. Después la película se enjuaga con agua desionizada, y las nanopartículas de oro se depositan en los poros de la solución de chapado en oro (Technic Inc.) con la aplicación de un potencial de -0,9 V vs frente a Ag / AgCl. La longitud de tiempo para la deposición determina la longitud de las partículas.

[0088] La película de óxido de oro encapsulada en los poros se sumerge a continuación en ácido nítrico para disolver la plata en la superficie de la película y en los poros. Las películas que contienen solo oro se enjuagan con agua, etanol y acetona y se dejan secar en el aire. La matriz de óxido de aluminio se disuelve a continuación en 1,25 M de NaOH que contiene 4 g/l de Poloxámero 188. El pH de la solución se llevó a pH neutro a través de valoración con HCl 3N.

[0089] Un procedimiento para la preparación de nanobarras de oro por deposición de oro en una matriz de policarbonato se realiza según van der Zande-1997. El cobre se deposita en un lado del policarbonato a partir de una solución de sulfato de cobre (II) a 0.01 M mediante la aplicación de un voltaje constante de -0.05 V frente a un electrodo de calomelanos estándar durante 100 s. Después del lavado de la película con agua ultra pura, cualesquiera iones de cobre restantes se eliminan mediante una segunda etapa de electrodeposición con una solución de 0,01 M de H₂SO₄ y la aplicación de un potencial de -0,2 V frente a un electrodo de calomelanos estándar durante 100 s. El oro se deposita a partir de una solución de oro (1) de cianuro al 0,32 M que contiene ácido cítrico a 0,26 M y KOH a 0,65 M bajo una tensión constante de -1,00 V hasta que el pH final está entre 5 y 6. El cobre se disuelve selectivamente por tratamiento de la membrana durante 30 min con una solución de grabado de cobre a partir de 25 ml/l de ácido sulfúrico al 98%, 75 ml/l de peróxido de hidrógeno y unas pocas gotas de ácido fosfórico al 85%, diluido después 100 veces. A continuación se disuelve el policarbonato con una solución de 0,026 g/ml de Poloxámero 188 en cloruro de metileno, para dejar las partículas estabilizadas como una suspensión de cloruro de metileno. La extracción en agua deja una suspensión acuosa las partículas.

[0090] Wang y sus colegas, seguido por El-Sayed y sus colegas, han descubierto que la producción electroquímica de partículas de oro en un reactivo "inductor de forma" da como resultado barras de oro de forma y tamaño uniforme (Yu y otros, 1997, Mohammed, 1998). Un procedimiento para la preparación de nanobarras de oro mediante electroquímica se realiza según indican Yu y otros y Mohamed y otros. Una célula electroquímica simple de dos electrodos se configura con una placa de oro (3 x 1 x 10,5 cm) como ánodo y una placa de platino (3 x 1 x 10. 5 cm) como cátodo. Ambos electrodos se sumergen en una solución acuosa de bromuro de hexadeciltrimetilamonio y bromuro de tetraoctilamonio. Se añaden pequeñas cantidades de acetona y nitrato de plata para facilitar la formación de las barras. La transferencia de oro desde la placa de oro a las nanopartículas ocurre tras la aplicación de una corriente controlada de 3-5 mA durante 30-45 min con ultrasonidos a 38 °C. Las sales de amonio utilizadas en la preparación ya estabilizan las barras producidas por este procedimiento. Puede llevarse a cabo una estabilización adicional mediante la adición de un agente tensioactivo polimérico tal como el Poloxámero 188. La concentración apropiada de Poloxámero 188 se puede determinar mediante experimentación. A partir de la suspensión de partículas de oro desnudas, se eliminan 10 partes alícuotas de 0,5 ml. Para cada una de estas se añade una parte alícuota con una concentración diferente de la solución de poloxámero. Después de asentarse las soluciones de la Poloxámero y las partículas de oro durante 1 min, se añadieron 0,1 ml de solución de NaCl al 10% a cada una en condiciones de agitación. Se seleccionó la solución con la menor cantidad de Poloxámero que no cambiaba de color de rojo a azul. La concentración de Poloxámero de esta solución es la menor suficiente para la estabilización de partículas. Un procedimiento similar será apropiado para la elección de la concentración apropiada de otros estabilizadores.

[0091] Kameo y otros enseñan que la reducción fotoquímica de soluciones de oro en presencia de cloruros de alquiltrimetilamonio de diferentes longitudes de cadena llevan a fibras de oro de longitud determinada por la longitud de la cadena alquilo. Un procedimiento para la preparación de nanobarras de oro utilizando fotoquímica y según indica Kim-2002 es tal como se describe a continuación. A una solución acuosa de 3 mL de bromuro de hexadeciltrimetilamonio 0,08 M y bromuro de tetradecilamonio 0,42 mg/ml. se le añaden 0,25 ml de 0,25 ml de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,024 M, 0,065 ml de acetona, 0,045 ml de ciclohexano, y 31,5 ml de solución de nitrato de plata 0,01 M. La solución combinada se irradia con una longitud de onda de 254 nm (420 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) durante unas 30 h. El producto se centrifuga a 3000 rpm durante aproximadamente 10 min. Se recoge el sobrenadante y se centrifuga a 10.000 rpm durante 10 min. Los precipitados de ambas centrifugaciones se recogieron, se combinaron, y se volvieron a dispersar en agua desionizada. La relación de aspecto media de las nanopartículas de oro dispersas será de aproximadamente 4,8. La estabilización adicional de las nanopartículas de oro producido por este procedimiento puede llevarse a cabo mediante la adición de un agente tensioactivo polimérico tal como Poloxámero 188 a la suspensión final tal como se describe en el Ejemplo V.

[0092] Recientemente, Xia ha informado acerca de la fabricación de nanopartículas de plata y oro en forma de cubo con un proceso de reducción química húmeda simple. Con la ayuda de los nanocubos de plata, se podían producir nanocajas de oro (Sun Y, Xia Y. "Shapecontrolled synthesis de oro y plata nanopartículas", Science, 2002; 298(5601): 2176-2179).

[0093] La invención prevé que habrá disponibles muchos otros procedimientos para la preparación de partículas metálicas no esféricas, en especial partículas de oro. Estos incluyen la producción de partículas en campos eléctricos y / o magnéticos, cristales líquidos, y otros entornos de ordenación y orientación. La invención abarca el uso de partículas no esféricas como agentes de contraste para la formación de imágenes optoacústicas independientemente del procedimiento de preparación.

[0094] Se conocen procedimientos para la organización de nanopartículas de metal en agregados estabilizados. Storhof y otros, 2000 enseñan que cubrir la superficie de diferentes partículas de oro con cadenas complementarias de ADN favorece el auto-ensamblaje de las partículas en agregados ordenados. La formación de agregados da como resultado la interacción favorable entre las cadenas complementarias de ADN. La invención abarca además el uso de agentes de contraste para la formación de imágenes optoacústicas que comprenden agregados de partículas metálicas esféricas o no esféricas.

[0095] La estructura química generalizada de los tensioactivos de la invención más un modificador es: TENSIOACTIVO-ENLAZADORESPACIADOR- ENLAZADOR-MODIFICADOR

[0096] Si los enlazadores pueden ellos mismos ser un grupo funcional químico en el agente tensioactivo o pueden ser entidades químicas individuales y donde tanto los enlazadores y los separadores son opcionales. La estructura anterior es representativa de la naturaleza general que puede tomar un enlace químico entre el modificador y el agente tensioactivo. También debe reconocerse que cada molécula de tensioactivo puede tener unida más de una molécula de un modificador, y que cada molécula de tensioactivo puede tener unida más de un tipo de modificador. En una forma de realización de los agentes de contraste de la invención, las moléculas modificadoras interactúan con los tensioactivos sin la formación de enlaces químicos covalentes.

[0097] La naturaleza de las partículas se describió anteriormente y en los ejemplos siguientes. Los siguientes párrafos describen en detalle la naturaleza de los agentes de superficie o tensioactivos, los enlazadores o grupos de unión, los espaciadores y los modificadores.

Tensioactivos

[0098] La invención abarca partículas metálicas o agregados de partículas metálicas que tienen un recubrimiento para modificar las propiedades biológicas y químicas de las partículas.

[0099] Las partículas metálicas recubiertas con materiales dieléctricos, tales como proteínas, también pueden cambiar las propiedades ópticas. Tal como se muestra en el Ejemplo XIV, una envoltura de proteína (dieléctrica) en la superficie de una nanopartícula de oro (metálica) desplaza el máximo de absorción óptica significativamente al rango espectral del infrarrojo cercano. Este cambio es más pronunciado en las capas dieléctricas delgadas (envolturas) y se satura con un aumento del grosor. Este comportamiento hace que este efecto sea verdaderamente práctico: si unas partículas metálicas están cubiertas solamente por una capa delgada de proteína, el efecto del desplazamiento hacia el rojo será sustancial (medible).

[0100] La estabilización de suspensiones coloidales de partículas metálicas requerirá generalmente que las partículas sean tratadas con un agente de superficie activa o agente tensioactivo. La superficie de una partícula de oro es hidrófoba. La estabilización de las partículas en solución acuosa requerirá generalmente recubrir las partículas con una molécula anfifílica, una molécula tanto con partes hidrófobas como hidrófilas. Los tensioactivos son un ejemplo de sustancias anfifílicas. Sin embargo, la invención abarca la estabilización de las partículas con cualquier tipo de especies químicas que se adhieren a las partículas metálicas e interactúan positivamente con

agua, ya se considera o no tal sustancia generalmente un agente tensioactivo. Unos agentes de superficie activa adecuados son también conocidos como agentes humectantes, agentes solubilizantes, o agentes emulsionantes. El material de recubrimiento puede comprender cualquiera de los elementos. Sin embargo, se prefiere el revestimiento que comprende carbono, oxígeno, nitrógeno, hidrógeno, azufre y fósforo. En una forma de realización de la invención, el agente de superficie activa es una proteína u otra molécula biológica o una proteína modificada químicamente u otra molécula biológica.

[0101] Opcionalmente los tensioactivos contendrán grupos funcionales que forman enlaces coordinados con los átomos de oro en las superficies de las partículas. Algunos ejemplos de grupos funcionales que pueden formar enlaces coordinados con átomos de metal son dobles enlaces carbono-carbono, enlaces triples carbono-carbono, grupos ciano, grupos amino y otros grupos funcionales que contienen nitrógeno, grupos fosfina y otros grupos con fósforo que contienen fósforo, hidroxilo y otros grupos funcionales que contienen oxígeno, y grupos mercapto y otros grupos funcionales que contienen azufre.

[0102] Los copolímeros de bloque en el que una o más secciones son cadenas de poli (etilenglicoles) (PEG) son especialmente deseables como tensioactivos para la práctica de la invención. Los PEG son poliéteres sencillos, neutros, a cuyas propiedades se ha prestado mucha atención en aplicaciones biotécnicas y biomédicas (véase, por ejemplo, J. Harris, 1992, Kumar, 2000). Son solubles en disolventes orgánicos y se hidratan altamente en medios acuosos, con dos o tres moléculas de agua unidas a cada segmento de etilenglicol.

[0103] Los PEG son conocidos por ser no tóxicos e inofensivos para las proteínas o células. Se modifican fácilmente y se unen de forma covalente a otras moléculas, con sólo poco efecto en su química. Se sabe que las cadenas de PEG unidas covalentemente a otras moléculas o a otras cadenas poliméricas son no inmunogénicas y no antigénicas. La invención prevé el uso de los sistemas de PEG con vectores de reconocimiento adjuntos y otros modificadores como tensioactivos.

[0104] El alto grado de acuación de las cadenas de PEG tiene el efecto de inhibir la adsorción de otros polímeros y proteínas sobre una superficie modificada con PEG. Los liposomas ocultos son ejemplos de materiales particulados en los que PEG, o un derivado de PEG sirve para inhibir la renovación de las partículas por el RES.

[0105] Retardar la depuración de materiales en partículas administrados por inyección intravascular es esencial cuando estos materiales son dirigidos (activa o pasivamente) a tipos específicos de órganos o lesiones tales como tumores cancerosos. La rápida depuración del agente de la sangre impide la unión del agente a los sitios receptores mediante la eliminación del agente antes de que llegue a esos sitios. Por supuesto, lo que frena la depuración de la sangre a corto plazo del agente tiene que equilibrarse con la propiedad preferible que el agente haya desaparecido por completo del cuerpo al largo plazo. Para la mayoría de tipos de agentes de contraste, la depuración de los agentes de contraste de los tejidos normales tales como el hígado, el riñón y el cerebro dentro de un período razonable de tiempo es esencial para la minimización de la toxicidad del agente a largo plazo.

[0106] El mecanismo principal para la captación de partículas por el sistema reticuloendotelial (RES) es la opsonización por proteínas de plasma en la sangre. Las propiedades biológicas de los elementos espaciadores de PEG usados de acuerdo con la invención pueden servir para aumentar tiempo de circulación del agente de contraste de una manera similar a la observada para liposomas PEGilados (Klibanov 1990, Blume y otros 1990).

[0107] La invención abarca la síntesis de tensioactivos con modificadores adjuntos para el revestimiento de las partículas metálicas. Estos modificadores controlarán las propiedades químicas y biológicas de las partículas.

[0108] La fijación de los modificadores se producirá a través de grupos funcionales reactivos en los tensioactivos. En esta situación, las moléculas reactivas a las que los modificadores deben unirse pueden ser considerados "tensioactivos precursores". "La invención prevé la posibilidad de que los agentes tensioactivos precursores en realidad no puedan actuar como agentes tensioactivos, sino que requerirán la fijación de los modificadores con el fin de convertirse en activos.

[0109] Los grupos reactivos pueden estar situados en cualquier lugar de la molécula del tensioactivo precursor. Sin embargo, para los tensioactivos lineales poliméricos, los grupos reactivos estarán más ventajosamente situados en los extremos de las cadenas. En caso de tensioactivo polimérico ramificado, los grupos reactivos estarán más ventajosamente ubicados en los extremos de las ramificaciones de cadena.

[0110] Los tipos de grupos reactivos que son posibles para la práctica de esta invención incluyen, pero no se limitan a, hidroxilo, tiol, amina, halogeno, ciano, grupos sulfhidrilo, carboxilo, y carbonilo, así como grupos funcionales que contienen dos o más sitios reactivos, tales como grupos carbohidrato, dioles vecinales, tioéteres, 2-aminoalcoholes, 2-aminotioles, guanidinilo, imidazolilo y grupos fenólicos. Los expertos en la materia reconocerán que una amplia variedad de otros grupos reactivos son posibles, de los que se dan muchos ejemplos en las patentes americanas 6123, 923; 6264, 914 y 6331, 289.

[0111] Hay disponibles varios agentes tensioactivos que son GRAS (siglas de la expresión en inglés Generalmente Aceptados Como Seguros). Para las sustancias a administrar por inyección intravascular, estos incluyen la lecitina, el Tween 80, el poloxámero 188 y el glicolato de sodio. Es muy probable que en el futuro habrá muchos otros materiales GRAS disponibles.

[0112] Tween 80 tiene la fórmula química monolaurato de polioxietileno sorbitán. Los poloxámeros están disponibles en BASF bajo el nombre comercial Pluronic®. Son copolímeros de bloque sintéticos de óxido de etileno y óxido de propileno con la fórmula general $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_b(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a\text{H}$.

[0113] Es significativo que el grupo terminal hidroxilo en el extremo de la cadena Pluronic® es un grupo reactivo del tipo descrito anteriormente. Se puede utilizar un enlazador reactivo que forma un éster con el grupo hidroxilo para la fijación de un modificador al tensioactivo. Por otra parte, el hidroxilo se puede convertir en otros grupos reactivos para la reacción con otros tipos de enlazadores. Algunos ejemplos de grupos reactivos alternativos en los que los grupos hidroxilo pueden ser fácilmente transformados por procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica son los haluros y los grupos amino. Los copolímeros de poli (oxietileno) y poli (oxipropileno) con extremos de cadena amina están disponibles comercialmente y se han utilizado para estabilizar las partículas de oro coloidales (Gregoriadis y McCormack, 1998).

[0114] Es posible obtener moléculas que se unen específicamente a la superficie de las partículas metálicas por detección directa de bibliotecas moleculares para la unión al metal de moléculas. Por ejemplo, las bibliotecas de fagos que presentan péptidos pequeños podrían ser utilizadas para esta selección. La selección puede hacerse por simple mezcla de las partículas metálicas y la biblioteca de representación de fagos y eluyendo los fagos que se unen a las microesferas flotantes. Si se desea, la selección se puede hacer bajo "condiciones fisiológicas" (por ejemplo, en la sangre) para eliminar péptidos que reaccionan de forma cruzada con componentes de la sangre. Los restos de unión identificados de esta manera pueden ser acoplados (químicamente a través de la síntesis de péptidos, o al nivel de ADN con vectores recombinantes) a una molécula vector, que constituye una herramienta general para unir cualquier molécula vector a las microesferas.

[0115] Los expertos en la materia reconocerán que los agentes de superficie activos de la presente invención también pueden tener otras propiedades biológicas o químicas deseables. Especialmente deseables son los agentes de superficie activos que actúan también como "vectores de reconocimiento", es decir, que tienen una afinidad especial para la interacción química o física con los sitios receptores característicos a los órganos o lesiones de la enfermedad de interés.

[0116] Un contraste optoacústico inusualmente alto se logrará con el uso de nanopartículas recubiertas con agentes tensioactivos que se calentarán suficientemente cuando las nanopartículas absorban la radiación para someterse a una transición de fase a la fase gaseosa en la superficie de la nanopartícula. Opcionalmente, los tensioactivos u otros recubrimientos sobre las nanopartículas pueden ser infundidos con una sustancia que sufra un cambio de fase a una temperatura entre de 35°C y 100°C. Son deseables las sustancias que son insolubles en agua a temperaturas inferiores a 100°C. Especialmente deseables lo son las sustancias que son insolubles en agua y se someten a una transición de líquido o sólido a gas cuando la temperatura se eleva de la temperatura corporal a medida que la energía se libera a través de la absorción de fotones por la partícula. Algunos ejemplos de sustancias adecuadas para la infusión en el recubrimiento de la partícula son los hidrocarburos de bajo peso molecular, tales como hexano y pentano, alcoholes tales como 1-pentanol y 1-hexanol, cetonas tales como dipropilcetona, y otros compuestos orgánicos.

Enlazadores

[0117] Más comúnmente, los enlazadores (también llamados agentes de enlace) comprenderán dos o más grupos funcionales reactivos, opcionalmente conectados por un elemento espaciador. Los enlazadores bifuncionales o polifuncionales van a reaccionar con grupos funcionales específicos dentro de una molécula o entre dos moléculas diferentes, dando como resultado un enlace entre dos partes de una molécula o un enlace entre dos fragmentos moleculares diferentes.

[0118] En el contexto de la presente invención, los enlazadores serán especialmente útiles para la unión de vectores de reconocimiento a "tensioactivos precursores". Como alternativa, o además, los enlaces pueden servir para unir otros tipos de modificadores a los tensioactivos. Los agentes tensioactivos son moléculas precursoras que pueden o no ser agentes tensioactivos, es decir que pueden o no interactuar con la superficie de una partícula metálica antes de la fijación de los modificadores, pero que no interactúan con la superficie de una partícula metálica después de la fijación de los modificadores. En la práctica de esta invención, los tensioactivos con los modificadores adjuntos estabilizarán las partículas frente a la precipitación y/o la agregación. La fijación de los modificadores a los tensioactivos precursores para formar el agente tensioactivo realmente utilizado para estabilizar las partículas metálicas sirve efectivamente como un mecanismo para la fijación de los modificadores a las partículas metálicas.

[0119] Los grupos funcionales reactivos en un enlazador bifuncional o polifuncional o agente de enlace pueden ser los mismos (agentes homofuncionales) o diferentes (agentes heterofuncionales). Por lo tanto, hay una diversidad de

reactivos potenciales que se pueden utilizar para llevar a cabo la unión covalente de especies químicas, ya sea intramolecular o intermolecular.

[0120] Los expertos en la materia reconocerán que se puede incorporar una gran variedad de grupos funcionales reactivos en un enlazador. En general, la identidad del enlazador será determinada en parte por la identidad de los grupos funcionales reactivos a los que el enlazador se fijará.

[0121] Unos enlazadores o agentes de enlace adecuados para ligar especies químicas con una amplia variedad de grupos reactivos son bien conocidos por los expertos en la materia y se describen en detalle en las patentes americanas N° 6,123,923; 6,264,914 y 6,331,289. A continuación se describen ejemplos representativos de grupo enlazador. Los expertos en la materia reconocerán muchas otras posibilidades.

[0122] Algunos ejemplos de grupos funcionales reactivos que harán que un enlazador sea capaz de reaccionar con grupos sulfhidrilo incluyen compuestos de α -haloacetilo del tipo $X-CH_2 CO-$ (donde $X=Br, Cl$ o I). Estos grupos sulfhidrilo también reaccionarán con imidazolilo, tioéter, fenol y amino. Los derivados de la N-maleimida también son selectivos hacia grupos sulfhidrilo, pero, además, pueden ser útiles en el acoplamiento a grupos amino bajo ciertas condiciones. Los ejemplos de grupos funcionales reactivos capaces de reaccionar con grupos amino incluyen agentes alquilantes y acilantes.

[0123] Algunos grupos alquilantes representativos incluyen derivados de la N-maleimida; haluros de arilo, tales como compuestos reactivos nitrohaloaromáticos; aldehídos y cetonas capaces de formación de la base de Schiff con grupos amino, derivados de epóxido tales como epiclorhidrina y bisoxiranos, que pueden reaccionar con grupos amino, sulfhidrilo o hidroxilo fenólico; derivados que contienen cloro de s-triazinas, que son muy reactivos hacia nucleófilos tales como grupos amino, sulfhidrilo e hidroxilo; α - haloalquil éteres.

[0124] Algunos agentes acilantes amino-reactivos representativos incluyen isocianatos e isotiocianatos, cloruros de sulfonilo, haluros de ácido, ésteres activos, tales como nitrofenilésteres o ésteres de N-hidroxisuccinimidilo; anhídridos de ácido; acilazidas, e imidoésteres, que forman amidinas estables al reaccionar con grupos amino.

[0125] El acoplamiento entre el vector de reconocimiento y el tensioactivo también se puede efectuar con ciertas enzimas. Por ejemplo, la transglutaminasa, la peroxidasa y la xantina oxidasa pueden servir como enlazadores de enzimas.

Espaciadores

[0126] Los elementos espaciadores que separan los grupos reactivos de un enlazador bifuncional o polifuncional pueden ser cadenas alifáticas de 2 a 10 enlaces. Puede haber otras estructuras macromoleculares, tales como poli (etilenglicoles) (PEG). Unos pesos moleculares apropiados para espaciadores de PEG usados de acuerdo con la invención serán de entre 120 y 20.000.

[0127] Puede ser deseable que la capacidad de reconocimiento y la estabilidad del producto cambien durante el tiempo de residencia del agente en el cuerpo. Por lo tanto, puede ser deseable que el espaciador tenga enlaces lábiles. Por ejemplo, puede contener brazos que sean biodegradables, químicamente sensibles o enzimáticamente escindibles. Algunos elementos espaciadores escindibles representativos incluyen, pero no se limitan a, glicol vecinal, azo, sulfona, éster, tioéster y grupos disulfuro.

[0128] Como un ejemplo de la práctica de este aspecto de la invención con agentes tensioactivos hechos con enlazadores que tienen espaciadores escindibles, el espaciador escindible puede contener brazos de PEG, que sirven para inhibir la depuración del agente por el RES. A medida que los brazos se separan del espaciador, aumenta la absorción de la partícula por el RES, lo que en última instancia conduce a la eliminación completa del agente de contraste del cuerpo.

[0129] Como alternativa, un enlazador con un espaciador escindible puede conectar el tensioactivo con un vector de reconocimiento. La escisión del enlazador permitirá que la partícula metálica se separe del vector de reconocimiento, y por consiguiente, de los sitios receptores, tras la formación de imágenes.

[0130] Otros elementos espaciadores representativos incluyen, pero no se limitan a, polisacáridos, tales como ácido poligalacturónico, glicosaminoglicanos, heparinoides, celulosa y polisacáridos marinos, tales como alginatos, quitosanos y carragenanos, polisacáridos de tipo almacenamiento, tales como almidón, glucógeno, dextrano y aminodextranos; poliaminoácidos y ésteres metílicos y etílicos de los mismos, tales como homo- y copolímeros de lisina, ácido glutámico y ácido aspártico, y polipéptidos, oligonucleótidos y oligosacáridos. Cada uno de estos puede o no contener sitios de escisión por enzimas.

[0131] Otros materiales espaciadores potencialmente útiles poliméricos incluyen copolímeros de metacrilato de metilo con ácido metacrílico; copolímeros en bloque de polimetacrilatos con poliésteres biodegradables; cianoacrilatos, es decir, polímeros de ésteres de ácido 2-cianoacrílico; polivinilo; copolímeros de vinil metil éter con

anhídrido maleico; polivinilpirrolidonas, polímeros y copolímeros de hidroxiácidos alifáticos de cadena corta tales como ácidos glicólico, láctico, butírico, valérico y caproico; poliésteres que constan de unidades de etilenglicol y ácido tereftálico alternados; copolímeros de bloque que comprenden segmentos biodegradables de polímeros hidroxiácidos alifáticos; poliuretanos, poli (1, 4-dioxano-2-onas; polianhídridos, tales como copolímeros de ácido sebácico (ácido octanodioico) con bis (4-carboxi-fenoxi) propano, polímeros biodegradables que contienen grupos orto-éster; polifosfazenos, que son polímeros inorgánicos que consisten en átomos de fósforo y nitrógeno alternados.

[0132] Otros espaciadores de muchos otros tipos son bien conocidos por los expertos en la materia, como se enseña en las patentes de la lista de referencias.

Modificadores

[0133] La invención abarca la unión al tensioactivo, a través de uno o más grupos de enlace y el espaciador opcional, de varios tipos de modificadores para controlar las propiedades biológicas y químicas del complejo tensioactivo de partículas de metal.

[0134] Los ejemplos de los muchos tipos de estructuras que son posibles para los modificadores incluyen, pero no se limitan a, los siguientes:

(i) Los polímeros sintéticos, polímeros especialmente hidrófilos tales como derivados de PEG, que prolongan el tiempo de residencia de los agentes en la sangre después de inyección intravascular.

(ii) péptidos naturales o sintéticos que tienen un alto grado de resistencia a la degradación por las esterasas, amidasas vascularmente circulantes, o peptidasas. Un procedimiento útil de estabilización de restos peptídicos incorpora el uso de técnicas de ciclación. Como un ejemplo, la ciclación de extremo a extremo por el cual el extremo carboxi-terminal se une covalentemente al extremo amino mediante un enlace amida puede ser útil para inhibir la degradación peptídica y aumentar la media vida circulante. Adicionalmente, una ciclación de cadena lateral-a-cadena lateral o ciclación de cadena de extremo a lado también es útil para inducir estabilidad. Además, la sustitución de un L-aminoácido de un D-aminoácido en una región estratégica del péptido puede ofrecer resistencia a la degradación biológica. En una realización especialmente útil de la invención, estos modificadores resistivos se adjuntan al tensioactivo a través de espaciadores escindibles.

(iii) Los azúcares, incluyendo monosacáridos, polisacáridos y otros carbohidratos. Estos protegen aún más las partículas metálicas de la invención para la captación por el RES. En una realización especialmente útil de la invención, estos azúcares se unen al tensioactivo a través de espaciadores escindibles.

(iv) los materiales terapéuticos, como los fármacos y profármacos. Estos pueden incluir activadores para la terapia fotodinámica, así como agentes para la quimioterapia.

Vectores de reconocimiento

[0135] Una clase particularmente útil de modificadores opcionales para la unión a los tensioactivos de la presente invención comprende vectores de reconocimiento, que son sustancias capaces de adhesión preferente a los grupos químicos o biológicos específicamente asociados con ciertos tipos de tejido, lesiones de la enfermedad o de otras sustancias en el cuerpo. Los vectores de reconocimiento, además, pueden modificar las propiedades químicas y físicas de los agentes de contraste.

[0136] Colectivamente, los sitios de adhesión son conocidos como receptores de reconocimiento. Preferentemente, los receptores de reconocimiento son ciertos tipos de grupos químicos o biológicos que se sobreexpresan en las células de ciertos tejidos de interés, tales como tumores cancerosos u otros sitios de la enfermedad o que están asociados exclusivamente con las células de ciertos tejidos de interés. Los receptores de reconocimiento pueden estar normalmente situados en las superficies de las células diana, en el interior de las células diana, o en el fluido extracelular que rodea a las células diana. Los sitios receptores pueden liberarse normalmente en el fluido extracelular o pueden ser liberados como resultado de la enfermedad, tales como la inflamación o el crecimiento del tumor, o trauma. Se puede usar un ligando de reconocimiento dirigido hacia material trombótico en la placa para diferenciar entre regiones activas e inactivas de la placa aterosclerótica.

[0137] Unos vectores de reconocimiento preferidos pueden seleccionarse de las siguientes especies o sustancias biológicas o químicas:

(i) Anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. Estos tienen la propiedad ventajosa de muy alta afinidad por los sitios receptores específicos. Ambos anticuerpos convencionales y de ingeniería genética se pueden emplear, siendo posible con la ingeniería de anticuerpos maximizar propiedades tales como la afinidad y especificidad. El uso de anticuerpos humanos puede ser preferible para evitar posibles reacciones inmunes contra la molécula vector. Se pueden emplear anticuerpos, por ejemplo, para tomar como objetivo la endoglina, que es un marcador de proliferación de células endoteliales. Un ligando de reconocimiento que puede usarse para tomar como diana la endoglina es el anticuerpo TEC-11 (Thorpe y otros, 1995). Además, los anticuerpos dirigidos a las cadherinas, tales como, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal Ec6C10, se pueden utilizar para reconocer cadherinas expresadas localmente por células endoteliales específicas.

(li) Proteínas y glicoproteínas diferentes de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. Un ejemplo de una proteína que puede ser útil como vector de reconocimiento es la Proteína A, que se produce por la mayoría de cepas de *Staphylococcus aureus*, está disponible comercialmente de Sigma Chemical Co (St. Louis, MO) y se puede usar para la unión de una variedad de anticuerpos IgG. Otras proteínas útiles incluyen citocinas, integrinas, factores de crecimiento, cadherinas, inmunoglobulinas, hormonas peptídicas, lectinas, selectinas y partes de estas. Los factores de crecimiento, incluyendo, por ejemplo, el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), pueden ser útiles para reconocer las células endoteliales del sistema vascular producidas en muchos tumores mediante el proceso de angiogénesis. Las lectinas pueden ser útiles en la orientación de las moléculas de adhesión endotelial de leucocitos (ELAM-del), que son antígenos que se expresan por las células endoteliales en condiciones de estrés

(iii) oligopéptidos, polipéptidos, aminoácidos y otros componentes de las proteínas o fragmentos de proteínas.

Ejemplos representativos de péptidos son YRALVDTLK (SEC ID N °: 22), YAKFRETLEDTRDRMY (SEC ID NO: 23) y RALVDTEFKVKQEAGAK (SEC ID N °: 24), que se unen selectivamente a la placa aterosclerótica.

Los péptidos NDGDFEEIPEEYLQ (SEQ ID NO: 25) y GPRG (SEC ID N °: 26) se unen a los trombos. Péptidos tales como PLYKKIILKLLS (SEC ID N °: 27) que se unen a las plaquetas.

(iv) La familia de las cadherinas de moléculas de adhesión celular también se puede utilizar como vectores de reconocimiento para las células endoteliales. Estos incluyen las cadherinas E-, N- y P-, la cadherina-4, la cadherina-5, la cadherina-6, la cadherina-7, la cadherina-8, la cadherina-9, la cadherina-10.

(v) Los azúcares, incluyendo monosacáridos, polisacáridos y otros carbohidratos. Las superficies de las partículas, ya sea modificadas con los azúcares a través de recubrimiento directo o a través de la unión del azúcar a un agente tensioactivo indirectamente con la superficie de la partícula, serán reconocidos in vivo por los receptores de oligosacáridos, tales como el receptor de la asiologlicoproteína. En algunos casos, se pueden utilizar los azúcares para tomar como objetivo las ELAM.

(vi) Las vitaminas, cofactores para las vitaminas y formas modificadas de estas. Un ejemplo es el ácido fólico y derivados del ácido fólico.

(vii) Los esteroides, análogos de esteroides y formas modificadas estos.

(viii) Se puede utilizar el colesterol para tomar como objetivo las células endoteliales, especialmente en la placa aterosclerótica.

(ix) El material genético, incluyendo nucleósidos, nucleótidos, oligonucleótidos, polinucleótidos y formas modificadas de los nucleósidos, nucleótidos, oligonucleótidos, polinucleótidos y otras sustancias que se unen a ADN o ARN, ya sea a través de Watson-Crick o por medio de algún otro tipo de interacción. El ADN está por lo general sólo está presente en el espacio extracelular debido a daño de la célula, de modo que estos oligonucleótidos pueden ser útiles reconocer el tejido necrótico, que se encuentra en algunos tumores malignos y otros sitios de la enfermedad. Los oligonucleótidos también pueden ser diseñados para unirse específicamente a factores de transcripción, que muy a menudo están altamente sobreexpresados o activados en células tumorales o en células inmunes activadas o endoteliales. Se pueden usar las bibliotecas combinatorias para seleccionar oligonucleótidos que se unan específicamente a las posibles moléculas diana.

(x) Los compuestos sintéticos que combinan una secuencia de aminoácidos naturales con secuencias que no se encuentran normalmente en la naturaleza. A parte de los ligandos naturales para receptores biológicos, también son adecuados los ligandos sintéticos que imitan a los receptores biológicos.

(xi) Una estructura química completamente sintética, que es una construcción química que no se encuentra normalmente en la naturaleza, con una afinidad especial para uno o más sitios receptores presentes en la naturaleza.

[0138] Los expertos en la materia reconocerán que son también posibles muchos otros tipos de vectores de reconocimiento. Ejemplos de otros tipos de vectores de reconocimiento para agentes de contraste de partículas incluyen, pero no se limitan a, los descritos en las patentes americanas 6331, 289,6, 264 917, 6403, 056.

[0139] Una forma alternativa para clasificar vectores de reconocimiento es en términos de los sitios receptores a los que se unen. Debería ser obvio que existe una complementariedad entre los vectores de reconocimiento y los sitios receptores. Por lo tanto, en ciertas situaciones las funciones de los vectores de reconocimiento y sitios receptores se pueden intercambiar. Especies químicas que actúan como receptores, una vez identificadas, pueden convertirse en vectores de reconocimiento.

[0140] Los sitios de receptores para los vectores de reconocimiento de la presente invención pueden pertenecer a los siguientes grupos:

(i) Proteínas o péptidos a los que se unen cadenas laterales de glucosaminoglicano.

(ii) Sitios en la placa aterosclerótica

(iii) Sitios en las células miocárdicas. Entre los ejemplos de vectores de reconocimiento para células miocárdicas se incluyen el anticuerpo anticardiomiosina, que puede comprender anticuerpo policlonal y fragmentos Fab'2. Los ligandos de reconocimiento adicionales incluyen dipiridamol; digitalis; nifedipina; apolipoproteína, rianodina; endotelina, dihidropiridina; adenosina; mineralocorticoide; anticuerpos para el receptor humano alfa 1A adrenérgico; agentes bioactivos, tales como fármacos, incluyendo la alfa-1 prazosina antagonista; anticuerpos del receptor anti-beta; fármacos que se unen a los anticuerpos al receptor anti-beta, y la endotelina-1.

(iv) La interleucina-1 o interleucina-2.

(V) Los linfocitos tales como las células B o células T, con las células T como dianas preferidas. Se puede utilizar un anticuerpo contra el CD-4 para la selección de la clase de las células T que albergan receptores CD4; se puede utilizar un anticuerpo contra el CD-8 para la selección de la clase de las células T que albergan receptores CD-8; se puede utilizar un anticuerpo anti-CD 34 para la selección de la clase de las células T que albergan receptores CD-34; etc.

(Vi) los sitios específicos para la red de nuevos vasos sanguíneos típicamente formados por angiogénesis en muchos tumores cancerosos tal como se describe en la patente americana N ° 6139, 819, que se incorpora en su totalidad por referencia. La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos de ramificación de los vasos existentes en un tumor maligno. Es esencial para el crecimiento de la mayoría de los tumores cancerosos, y su detección es un medio importante para descubrir tumores en desarrollo.

(Vii) las moléculas de adhesión endotelial de leucocitos (ELAM) son antígenos que se expresan por células endoteliales en condiciones de estrés. Las células endoteliales facilitan la migración de los leucocitos a través del endotelio de la vasculatura hacia los tejidos circundantes. Puede seleccionarse una amplia variedad de diferentes vectores de reconocimiento para unir los dominios citoplásmicos de las moléculas ELAM.

[0141] En algunas situaciones, será posible la práctica de esta invención sin conocer la identidad química del sitio receptor. En este caso, puede ser posible no obstante seleccionar un vector de reconocimiento para el tejido u otra estructura de interés del cuerpo mediante la búsqueda funcional de estructuras moleculares que se adhieren al tejido diana u otro componente del cuerpo. La selección de una biblioteca combinatoria será especialmente eficaz para la identificación de un vector de reconocimiento apropiado.

[0142] La invención abarca el uso de vectores de reconocimiento ambifílicos que recubren la superficie de las partículas metálicas sin la necesidad de unión covalente con un agente tensioactivo. Más comúnmente, el vector de reconocimiento se une covalentemente a un agente tensioactivo que interactúa con la superficie de la partícula a través de fuerzas de van der Waals u otras interacciones físicas.

Complejación de barras de oro con anticuerpos

[0143] El siguiente es un procedimiento generalizado para la complejación de las barras de oro con anticuerpos y sigue las directrices de Beesley, 1989. Se puede utilizar un procedimiento similar para formar complejos de barras de oro y otras proteínas, tales como enzimas y lectinas.

[0144] La solución del anticuerpo (1 mg / ml) se dializó con el pH de la solución ajustado hasta el punto isoeléctrico del anticuerpo. La solución tampón del anticuerpo se centrifuga a 100,000 g durante 1 h a 4 ° C para sedimentar cualquier agregado de anticuerpos.

[0145] El pH de una suspensión coloidal de nanobarras de oro desnudas (estabilizador no polimérico) se lleva al punto isoeléctrico del anticuerpo con K₂CO₃, y se eliminan 10 partes alícuotas de 0,5 ml. A cada una de estas se añade una parte alícuota de la solución de anticuerpo diluido a una concentración diferente. Después de que las soluciones del anticuerpo y las partículas de oro reposaran durante 1 min, se añadieron 0,1 ml de solución de NaCl al 10% a cada uno con agitación. Se ha seleccionado la solución con la menor cantidad de proteína que no cambia de color de rojo a azul. La concentración de anticuerpo de esta solución es la menor que es suficiente para la estabilización de las partículas.

[0146] La concentración de proteína apropiada determinada por el procedimiento de la etapa anterior, más el 10%, se añade a una parte alícuota de trabajo de las partículas de oro. Después de 5 min, se añadió una solución filtrada al 1% w / v de PEG en agua destilada con la cantidad de 1% del volumen total de la suspensión coloidal de oro / anticuerpo. La mezcla se agitó durante 5 min. El complejo se centrifugó durante 2 horas a 18.000 rpm. Todo excepto aproximadamente 1 ml del sobrenadante se aspira y se desecha. Un suave sedimento, que contiene el complejo de oro-anticuerpo, está ligeramente separado de un sedimento sólido pegado a la superficie del tubo. El sedimento suave se volvió a suspender en 1 ml del sobrenadante restante de para dar una solución madre, que se microcentrifugó a 18.000 rpm durante 30 minutos justo antes del uso.

[0147] Los complejos de anticuerpo de nanobarras de oro pueden ser dirigidos a tumores cancerosos. Una acumulación de nanopartículas selectiva en células cancerosas o tumores se puede demostrar utilizando microscopía electrónica de transmisión y microscopía electrónica de barrido. Se puede emplear un protocolo de enlace directo para la conjugación de nanoesferas metálicas con IgG-anticuerpo humanizado. Una concentración óptima de la proteína unida a las nanopartículas es de aproximadamente 60 nmol / litro.

[0148] Los expertos en la materia pueden reconocer que un vector dirigido contra el receptor del cáncer puede ser utilizado no sólo para los propósitos de detección, sino también para fines terapéuticos. Esta conclusión viene con la comprensión de que los vectores de reconocimiento (tal como un anticuerpo monoclonal, mAb) unidos a receptores de proteínas en la superficie de las células cancerosas pueden desactivar las funciones vitales de los receptores y por lo tanto matar a las células cancerosas. Un ejemplo de esta acción terapéutica es un mAb comercialmente conocido como Herceptin®, producido contra los receptores asociados con el gen HER2/neu sobreexpresado en células de cáncer de mama y otros tipos de cáncer. El Herceptin ha sido utilizado con éxito para el tratamiento del

cáncer de mama metastásico [J.S. Ross, G.S. Gray: Targeted therapy para cancer: the HER-2/neu y Herceptin story, Clin Leadersh Manag Rev. 2003; 17(6): 333-340]. Nosotros enseñamos que una posibilidad para producir un agente de contraste optoacústico basado en nanopartículas alargadas al menos parcialmente metálicas es a través de la unión de anticuerpos a las nanopartículas diseñadas. En asociación con el efecto terapéutico divulgado previamente de vectores de reconocimiento, anticipamos que el agente de contraste optoacústico descrito en esta solicitud también se puede utilizar como un agente terapéutico contra el cáncer.

Agregados de partículas

[0149] La invención también abarca el uso de agentes de contraste para la formación de imágenes opto-acústicas que comprenden agregados de partículas metálicas esféricas o no esféricas que forman una materia de partículas nanométricas con forma no esférica alargada.

[0150] La invención también abarca el uso de agregados de partículas metálicas. La forma, composición, y dimensiones de las partículas que comprenden se escogen para la máxima absorción de la radiación utilizada para la formación de imágenes opto-acústicas. Preferentemente, la forma, composición, y dimensiones de las partículas que comprenden partículas situarán la absorción máxima de los agregados cerca de la longitud de onda de irradiación. Más preferentemente, la elección de la forma, composición, y dimensiones de las partículas que comprenden partículas situarán la absorción máxima de los agregados cerca de la longitud de onda de irradiación y maximizarán la absorción de luz a esa longitud de onda. Unos agregados preferidos son estructuras de dos y tres dimensiones compuestas por pares de nanopartículas alargadas (estrellas de dos y tres dimensiones, pirámides, etc.).

[0151] Se conocen procedimientos para la organización de nanopartículas metálicas en agregados estabilizados. Storhof y otros (2000) y Dujardin y otros (2001) enseñan que cubriendo la superficie de diferentes partículas de oro con cadenas complementarias de ADN se favorece el auto-ensamblaje de las partículas en agregados ordenados. La agregados de formación es resultado de la interacción favorable entre las cadenas complementarias de ADN. La invención comprende el uso de agentes de contraste para la formación de imágenes optoacústicas que comprenden agregados de partículas recubiertas con cadenas complementarias artificiales o naturales de ADN, ARN o análogos de ARN o ADN.

[0152] En otra forma de realización de la invención, los agentes de contraste comprenden agregados de partículas metálicas. Estos agregados presentarán una resonancia de plasmón colectiva que mejorará la intensidad de la señal optoacústica respecto a la esperada para las partículas individuales. Por ejemplo, una pila cúbica de 16 nanobarras (4 capas con 4 nanobarras en cada capa) absorberá más radiación óptica que 16 nanobarras separadas. La presencia de una resonancia de plasmón colectiva para una colección de nanopartículas se pone de manifiesto experimentalmente por un aumento no lineal en la intensidad de la señal optoacústica a medida que aumenta la concentración de partículas y se forman agregados.

[0153] Un medio útil para promover la agregación de partículas controlada es recubrir diferentes partículas con componentes complementarios de material genético. Por "material genético" se entienden los nucleótidos, oligo-y polinucleótidos, incluidos el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN) y los componentes de nucleótidos, oligo-y polinucleótidos. El material genético puede ser hecho por metodología de síntesis química conocida para un experto en la materia, o mediante el uso de la tecnología recombinante, o por una combinación de estas. El ADN y el ARN pueden comprender opcionalmente nucleótidos no naturales y pueden ser de una sola o de doble cadena. Por "material genético" también se entiende ADN y ARN de sentido y anti-sentido, que son secuencias de nucleótidos que son complementarios a secuencias específicas de nucleótidos en el ADN y/o el ARN. "Material genético" se refiere también a los análogos sintéticos de sustancias de origen natural, por ejemplo, los análogos hechos con azúcares distintos de la ribosa o la desoxirribosa.

Liposomas

[0154] En otra forma de realización adicional de la invención, las partículas metálicas pueden estar encapsuladas en liposomas que son otros tipos de vesículas lipídicas, ya sea en forma de partículas o agregados de partículas individuales. Como se conoce en la técnica, los liposomas son vesículas hechas de fosfolípidos en los que una fase lipídica encapsula a una fase acuosa. Algunos ejemplos de fosfolípidos son el dipalmitoil-fosfatidilglicerol (DPPG) y el dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). La pared de lípidos se puede reforzar, cuando sea necesario, para evitar fugas, con colesterol. Los liposomas tienen preferentemente un tamaño de alrededor de 0.02 a 2.0 micras y preferentemente tienen un tamaño de menos de 1,0 micras.

[0155] Los liposomas se preparan mediante procedimientos estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo, la partícula metálica puede ser dispersada en el fosfolípido antes de que se mezcle con la fase acuosa. La fase orgánica se retira entonces de la mezcla y se recuperan las vesículas lipídicas resultantes.

Formulaciones

[0156] La presente invención contempla una amplia variedad de formulaciones de los agentes de contraste a utilizar en la práctica de la invención. En general, la porción de partículas del agente de contraste se dispersa en un vehículo líquido estéril, que puede ser agua, una solución acuosa tal como solución salina, un líquido orgánico, o un aceite, incluyendo los aceites de origen animal, mineral o sintético. El vehículo también puede ser una mezcla de varios componentes. Algunos ejemplos de líquidos orgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, alcohol metílico, alcohol etílico, o alcohol isopropílico, acetona, glicerol, y dimetilsulfóxido. Algunos ejemplos de aceites adecuados incluyen, pero no se limitan a, aceite de canola, aceite de soja, aceite mineral, y aceite de sésamo. El agua o la solución salina son portadores preferidos cuando el modo de administración es la inyección intravenosa o intra-arterial.

[0157] Las formulaciones utilizadas para la práctica de la invención pueden incluir una variedad de excipientes. La formulación puede comprender además, por ejemplo, uno o más estabilizadores químicos, lípidos neutros, lípidos cargados, gases, precursores gaseosos, líquidos, aceites, agentes de diagnóstico, y/o agentes bioactivos.

[0158] La presente invención prevé además el uso de un agente de contraste para la formación de imágenes optoacústicas en conjunción con la terapia. Por lo tanto, la composición puede contener fármacos o profármacos adsorbidos.

[0159] Las formulaciones tópicas adecuadas tendrán aplicaciones en formación de imágenes y / o terapia de la piel, regiones y órganos subcutáneas y adyacentes, por ejemplo en la orientación de la circulación periférica de las extremidades del cuerpo tales como las piernas.

[0160] Las formulaciones de agente de contraste para la administración por vía oral o por inyección se pueden preparar como soluciones en solución o mezclas con agua y/o uno o más disolventes orgánicos miscibles en agua y fisiológicamente aceptables tal como etanol, glicerol o polietileno glicol.

Procedimiento de administración

[0161] La invención será especialmente útil con respecto a la formación de imágenes médicas de un cuerpo humano o no humano. Sin embargo, también se prevén varios otros usos para la invención. Por ejemplo, el procedimiento será útil para la detección sensible de patógenos ambientales, tales como las bacterias dañinas y esporas de agentes biológicos nocivos. Cuando se examine un patógeno sospechoso, será suficiente por lo general que la muestra de ensayo sea simplemente bañada en la formulación que contiene el agente de contraste.

[0162] Para la formación de imágenes de un ser humano o no humano, son posibles muchos modos de aplicación, dependiendo de los requisitos de formación de imágenes. La administración del agente de contraste puede ser sistémica o local. Los modos de administración incluyen, pero no se limitan a las posibilidades descritas en los siguientes párrafos.

[0163] Las suspensiones líquidas acuosas pueden ser situadas en el tracto gastrointestinal mediante ingestión oral o se pueden insertar mediante una jeringa. El agente puede ser inyectado con una jeringa hipodérmica. Algunos modos de inyección incluyen, pero no se limitan a la intramuscular, intraarterial, intravenosa, intradérmica, intraperitoneal, y subcutánea. Para la inyección intraarterial o intravenosa, el agente puede ser inyectado en el sistema vascular en su conjunto o en los vasos de un órgano específico. Para la formación de imágenes de tumores cancerosos, algunas veces será preferible que el agente se inyecta directamente en el tumor. Cuando las composiciones de la invención se inyectan por vía subcutánea, las partículas metálicas pueden ser absorbidas por el sistema linfático, facilitando de este modo la formación de imágenes de los ganglios linfáticos. La inyección puede incluir algún mecanismo de liberación controlada. Por ejemplo, se puede usar una bomba que administra el agente a una velocidad controlada.

[0164] La administración local del agente de contraste puede llevarse a cabo mediante aplicación tópica, por medio de un catéter, con un supositorio, o por medio de un implante. Otros medios de aplicación local serán evidentes para los expertos en la materia.

[0165] En una forma de realización de la invención, los agentes de contraste se administran en conjunción con el uso de hipertermia, es decir, la elevación artificial de la temperatura local de un órgano u otra parte del cuerpo. Kong, y otros (2000 y 2001) enseñan que la hipertermia acelera el paso de nanopartículas a través de los capilares del sistema vascular de los tumores en crecimiento. La hipertermia también mejorará la captación del agente de contraste de otros tipos de tejido enfermo, los sitios de inflamación causados por la infección o trauma.

[0166] Son posibles cualesquiera de muchos medios diferentes de elevación de la temperatura. Estos incluyen, pero no se limitan a, la aplicación de baños calientes, el uso de ultrasonido enfocado, la irradiación con microondas (con o sin la inyección previa de una sustancia absorbente de microondas), el calentamiento de la sangre que pasa a través del órgano, y la calefacción química. Cualquiera o todos estos procedimientos de calentamiento se puede aplicar activamente, mientras se aplica el agente de contraste, o el calentamiento puede tener lugar hasta 24 horas antes de la administración del agente.

Formación de imágenes

[0167] Oraevsky y col. enseñan la adquisición de imágenes optoacústicas con agentes de contraste en la patente americana Nº 5,840,023. En su procedimiento, a un pulso corto de irradiación le sigue la detección de la onda de presión inducida, que luego se utiliza para la generación de una imagen.

[0168] En la práctica de la presente invención, los pulsos de radiación electromagnética tendrán preferentemente una duración de 10 ns a 1000 ns. Cuando el tejido que se ha fotografiado se simula con un tejido de lámina maciza, la fluencia de la radiación en la superficie de la lámina será de unos 10 mJ/cm². Para otras configuraciones de la muestra de ensayo, o para cuerpos vivos humanos o no humanos la fluencia superficial puede variar, aunque siempre estará en el rango de 1 a 100 mJ/cm², que generalmente se considera como seguro.

[0169] La práctica de la presente invención no se limita a los procedimientos de la patente americana Nº 5,840,023 y abarca la adquisición de una imagen optoacústica con la ayuda de agentes de contraste que comprenden nanopartículas no esféricas, al menos parcialmente metálicas, que pueden comprender un solo metal o pueden ser materiales compuestos de diferentes metales o pueden envolturas llenas de metal, ajustadas a la longitud de onda de irradiación, que puede estar en cualquier lugar en el espectro electromagnético de aproximadamente 300 nm a aproximadamente 300 mm. Sin embargo, se prefieren longitudes de onda en la gama visible o infrarroja de aproximadamente 450 nm a aproximadamente 1500 nm. Más preferida es la irradiación en el rango de longitud de onda en el infrarrojo cercano desde 650 hasta 1200 nm. La irradiación puede ser generada con un láser, aunque la invención abarca el uso de cualquier fuente de radiación, independientemente de si se le puede llamar láser o no.

[0170] La invención también prevé la formación de imágenes opto-acústicas con irradiación en dos o más longitudes de onda, ya sea simultáneamente o secuencialmente, con la ayuda de agentes de contraste que comprenden nanopartículas no esféricas al menos parcialmente metálicas sintonizadas con la longitud de onda de la irradiación, que puede estar en cualquier parte del espectro electromagnético.

[0171] La formación de imágenes puede ocurrir durante la administración del agente de contraste, inmediatamente después de la administración, o en algún momento posterior para permitir la acumulación del agente en los órganos diana o en la lesión enferma.

EJEMPLO I Espectros de absorción óptica de nanopartículas metálicas

[0172] Para calcular la intensidad y la absorción de resonancia de un nanopartículas metálicas con formas de elipsoide (NP) con radios, a y b y longitud, c, es necesario conocer la amplitud de un campo electromagnético dentro de la NP. Cuando la longitud de onda es significativamente más larga que las dimensiones lineales de la NP, las componentes de campo E, E_k, dentro de la NP se pueden expresar en términos del campo externo, E_{0k}, incidente sobre la NP de metal tal como enseña Papavassiliou-1980, que proporcionó detalles a una teoría electromagnética clásica descrita por Stratton-1941:

$$E_{m_k} = \frac{\epsilon_0}{(\epsilon_m - \epsilon_0)P_k + \epsilon_0} E_{0k} \quad (1)$$

donde $\epsilon_m = \epsilon'_m + i\epsilon''_m$

es la constante dieléctrica del metal, del que está hecha la NP, ϵ_0 es la constante del medio ambiente (por lo general se adoptan las propiedades dieléctricas del agua). Se supone que los ejes x, y, z están dirigidos a lo largo de los ejes de la NP. La cantidad P_k {k = x,y,z} se llama el factor de despolarización a lo largo de los ejes x, y, z y se determina mediante la integral:

$$P_k = \frac{1}{2} \int_0^\infty \frac{abc}{(s + d_k^2) \sqrt{(s + a^2)(s + b^2)(s + c^2)}} ds \quad (2)$$

donde $dx = a$, $dy = b$, $dz = c$ son los ejes del elipsoide, tal como se muestra en la figura 1. La expresión (1) es estrictamente válida en el rango de las dimensiones de las nanopartículas limitadas:

$$c < d_{\max}(\lambda) \equiv \frac{\lambda}{2\pi\sqrt{\epsilon(\lambda)}} \quad (3)$$

donde λ es la longitud de onda de irradiación óptica (electromagnética), c es el eje más largo del nanoelipsoide. Se determinó experimentalmente que el factor de 3 satisface la condición que requiere que el máximo tamaño de la NP sea mucho más pequeño que la longitud de onda electromagnética.

5 **[0173]** Para una nanoesfera ($a=b=c$) $P_k=2/3$ y se puede obtener la siguiente ecuación simplificada:

$$E_{m_k} = \frac{3\varepsilon_0}{\varepsilon_m + 2\varepsilon_0} E_{0_k} \quad (4)$$

en el caso en que $\varepsilon_m'' \ll \varepsilon_m'$

15 (lo cual es cierto para los metales nobles tales como la plata y el oro), se tiene una resonancia de plasmones clásica donde el campo electromagnético aumenta drásticamente en el interior de las nanopartículas con la condición de resonancia:

$$\varepsilon_m' + 2\varepsilon_0 = 0 \quad (5)$$

El cálculo que utiliza la ecuación (5) muestra que la resonancia de plasmón de nanoesferas de oro se encuentra en $\lambda=520$ -nm y para nanoesferas de plata $\lambda=390$ -nm.

[0174] Para elipsoides de revolución ($a=b$) y su longitud, c , está dirigida paralela al eje z . Por lo tanto, el factor de despolarización a lo largo del eje z se puede expresar como:

$$P_{\parallel}(\zeta) = \frac{1}{2} \int_0^{\infty} \frac{a^2 c}{(s+c^2)^{3/2} (s+a^2)} ds = \frac{1}{2} \int_0^{\infty} \frac{\zeta}{(s'+\zeta^2)^{3/2} (s'+1)} ds', \quad \zeta = \frac{c}{a} = \frac{c}{b} > 1 \quad (6)$$

donde ζ es la relación de aspecto del elipsoide, es decir, la relación entre eje largo y el eje corto, s es la coordenada espacial que se ejecuta en el espacio x , y , z (parámetro que cambia de 0 a ∞). Era conveniente en la ecuación (6) reemplazar el parámetro de ejecución, s con $s'=s/a^2$.

[0175] Para el campo eléctrico perpendicular al eje z (eje largo de la elipsoide c), se tiene:

$$P_{\perp}(\zeta) = \frac{1}{2} \int_0^{\infty} \frac{a^2 c}{(s+a^2)^2 (s+c^2)^{1/2}} ds = \frac{1}{2} \int_0^{\infty} \frac{\zeta}{(s'+1)^2 (s+\zeta^2)^{1/2}} ds' \quad (7)$$

En la aproximación en la que la dimensión lineal característica del nanoelipsoide es pequeña en comparación con la longitud de onda de la irradiación, se puede calcular la densidad de potencia, W , absorbida por unidad de volumen del nanoelipsoide de metal:

$$W(\lambda, \zeta) = \frac{\varepsilon_m''}{2\lambda} \sum_k \frac{\varepsilon_0^2}{[P_k(\zeta)\varepsilon_m'(\lambda) + (1-P_k)\varepsilon_0]^2 + [P_k(\zeta)\varepsilon_m''(\lambda)]^2} |E_{0_k}|^2 \quad (8)$$

La expresión (8) demuestra que el efecto de la forma de elipsoide y su orientación con respecto al campo eléctrico está determinado por los coeficientes P_k , que a su vez dependen de acuerdo con (6,7) de un solo parámetro, la relación de aspecto, ζ , relacionada con otros parámetros, e y q , y que es conveniente para el uso en los cálculos posteriores:

$$e = \sqrt{1 - \left(\frac{c}{a}\right)^2} = \sqrt{1 - \left(\frac{c}{b}\right)^2} = \sqrt{1 - q^2} = \sqrt{1 - \frac{1}{\zeta^2}} \quad (9)$$

La ecuación (8) permite el cálculo teórico de los espectros de absorción de las nanopartículas de diferentes formas y diámetros (esferas y elipsoides) tal como se presenta en la **figura 1**. La **figura 1** muestra los espectros de absorción de las nanopartículas de oro con igual volumen, pero diferentes formas, mostrando un aumento significativo de la absorbancia de nanopartículas alargadas en relación con nanopartículas esféricas y absorbancia de envolturas con respecto a nanopartículas de cuerpo completo.

[0176] La radiación óptica suele no estar polarizada, especialmente cuando se propaga a través de los tejidos biológicos. Por lo tanto, en el cálculo de la energía absorbida (Ec. 8) se necesita integrar los coeficientes P_k integrados en el rango de todos los ángulos entre el eje de revolución de las nanopartículas y el campo eléctrico. La ecuación resultante muestra que el coeficiente de absorción total se redujo 3 veces con respecto a la situación de campo eléctrico paralelo al eje de las nanopartículas (Ec. 6).

[0177] El espectro de absorción óptica de una colección al azar de nanobarras de oro orientadas con relación de aspecto ζ pueden ser modeladas mediante el uso de una extensión de la teoría de Mie para partículas alargadas (Papavassiliou, 1980). Según (Gans, 1915) el coeficiente de extinción molar ϵ_{mol} para N partículas de volumen V se da dentro de la aproximación dipolar por la siguiente ecuación:

$$\sigma_{mole} = \frac{2\pi NV \epsilon_0^{3/2}}{3\lambda} \sum_j \frac{\left(\frac{1}{P_k^2}\right) \epsilon_m^n}{(\epsilon_m' + \frac{1-P_k}{P_k} \epsilon_0)^2 + \epsilon_m'^2} \quad (10)$$

$$P_x = \frac{1-e^2}{e^2} \left[\frac{1}{2e} \ln\left(\frac{1+e}{1-e}\right) - 1 \right] \quad (11)$$

$$P_x = P_y = P_{\perp} = \frac{1-P_z}{2} = \frac{1-P_{\parallel}}{2} \quad (12)$$

Como era de esperar, el cálculo de los 2 sistemas de ecuaciones (6,7, 8) y (10,11, 12) produce resultados muy similares demostrados por dos curvas muy cercanas en la figura **figura 2**.

[0178] Con el fin de emplear la ecuación 8 (deducida para nanoelipsoides) para el cálculo de la absorbancia de nanobarras, hay que reemplazar el coeficiente 2 (por elipsoides) en el denominador de la ecuación 6 con el coeficiente 3 (para nanobarras). La posición del máximo en el espectro de absorción de nanobarras metálicas embebidas en un medio con permeabilidad dieléctrica de 1 puede ser descrita por la siguiente solución aproximada calculada numéricamente de la ecuación de Mie-Gans (Gans, 1915; Papavassiliou, 1980; Link, 1999), que es útil en la práctica debido a su simplicidad:

$$\lambda_{max} = (33.34 \zeta - 46.31) \epsilon_0 + 472.31 \quad (13)$$

[0179] Una y la misma relación de aspecto en nanobarras y nanoelipsoides produce una posición ligeramente diferente del máximo de absorción. Por ejemplo, el máximo de absorción se encuentra en la longitud de onda de 760 nm para nanobarras con relación de aspecto de 3,6 y para nanoelipsoides con relación de aspecto de 4. La diferencia también se produce si se toman datos de la tabla para el material de nanopartícula a partir de diferentes fuentes.

[0180] También enseñamos que el recubrimiento de las nanopartículas metálicas con envolturas dieléctricas (tales como proteínas) cambia la posición y la fuerza del máximo de absorción de las nanopartículas, especialmente en las nanopartículas alargadas, que se pueden utilizar en la detección y la formación de imágenes.

[0181] Haciendo referencia ahora a la **figura 3**, consideremos la absorción óptica de un elipsoide de revolución de metal rodeado por una envoltura dieléctrica. Esta estructura puede formarse, por ejemplo, cuando una nanopartícula metálica penetra en un tejido biológico de un microorganismo o de una partícula metálica recubierta con proteínas u otros biopolímeros. Se discuten aquí las propiedades de absorción de la luz por una nanopartícula de este tipo mediante el ejemplo de un elipsoide de oro rodeado por una envoltura dieléctrica con la constante dieléctrica $\epsilon_d \approx 4$ y colocada en agua. Suponemos que el nanoelipsoide tiene una orientación paralela al campo eléctrico en el haz de láser debido a que en este caso las propiedades de una nanopartículas ponen de manifiesto su utilidad para la formación de imágenes optoacústicas en el rango espectral del infrarrojo cercano.

[0182] La sección transversal de absorción de una nanopartícula con la orientación paralela (la constante dieléctrica compleja del núcleo de metal es ϵ_m y la constante dieléctrica de la carcasa dieléctrica es ϵ_d) en medio circundante medium con constante dieléctrica ϵ_0 en la forma de

$$\sigma_{abs} = V_m p_{||}^2 \frac{e^4}{q^4} \epsilon_0^2 \epsilon_d^2 \text{Im} \epsilon_m \frac{2\pi}{\lambda} |\gamma^{(||)}|^2 \quad (14)$$

donde V_m es el volumen del nanoelipsoide metálico,

$\lambda = \frac{2\pi c}{\omega}$ es la longitud de onda de la onda electromagnética incidente, $p_{||}$ y $p_{\perp}$ son las relaciones entre la envoltura de proteínas y el diámetro de las nanopartículas en direcciones paralelas y perpendiculares al campo eléctrico (ver la figura 3), $\gamma^{(||)}$ es el coeficiente dependiente de la geometría y las propiedades dieléctricas de las nanopartículas y el medio circundante:

$$\gamma^{(||)} = \frac{e^2}{p_{\perp}^2 q^2} \{ (\epsilon_s - \epsilon_m) [\epsilon_0 \frac{e^2}{p_{\perp}^2 q^2} + \frac{e^2}{2q^2} B^{(||)} (\epsilon_s - \epsilon_0)] \times \frac{e^2}{2q^2} (p_{||} A^{||} - B^{||}) - \epsilon_s \frac{e^2}{2q^2} B^{(||)} [(\epsilon_s - \epsilon_0) p_{||} \frac{e^2}{q^2} - (\epsilon_s - \epsilon_m) \frac{e^2}{p_{\perp}^2 q^2}] - \epsilon_0 \epsilon_s \frac{e^2}{p_{\perp}^2 q^2} p_{||} \frac{e^2}{q^2} \}^{-1} \quad (15)$$

$$\text{tomando } A^{(||)} = -\frac{2q^2}{e^2} [1 - \frac{1}{2e} \ln(\frac{1+e}{1-e})]; \quad B^{(||)} = -\frac{2q^2}{e^2} [1 - \frac{p_{||}}{2e} \ln(\frac{p_{||}+e}{p_{||}-e})] \quad (16)$$

[0183] La expresión (14) se obtuvo mediante la integración de la expresión para el valor absoluto del campo eléctrico (obtenido en J.A. Stratton, "Electromagnetic Theory", NY, McGraw-Hill, 1941) dirigido paralelo al eje de un nanoelipsoide sobre el volumen V_m . La expresión para la sección eficaz de absorción en el caso de orientación perpendicular se puede obtener de forma similar mediante la integración del valor absoluto del campo eléctrico dirigido perpendicular al eje del nanoelipsoide sobre el volumen V_m .

[0184] Nuestro cálculo muestra que la sección transversal de absorción, σ_{abs}^{res} , tiene una forma de resonancia como función de la longitud de onda. La longitud de onda de resonancia correspondiente al máximo de la sección transversal de absorción depende del grosor de la envoltura dieléctrica (**La figura 4**). Haciendo referencia a la figura 4, a medida que aumenta el grosor de la envoltura (para el volumen dado del nanoelipsoide y la relación de aspecto dada, q), la longitud de onda de resonancia, λ_{res} , también aumenta, tendiendo al valor límite que corresponde al caso cuando se coloca el elipsoide en un medio infinitamente extendido. También hay que tener en cuenta que λ_{res} también aumenta con el aumento de la relación de aspecto de la nanopartícula, $q-1$.

[0185] La dependencia de la máxima absorción de resonancia de la sección transversal, ecuación (14), en el grosor de la envoltura se muestra en la **figura 5**. Se puede ver que, para la relación de aspecto especificada, $q-1$, existe el grosor óptimo de la envoltura que ofrece el máximo de la sección transversal de absorción. Sin embargo, en la región de los grandes valores de $p_{||}$, se puede esperar una variación no monótona en la sección transversal de

absorción para la longitud de onda dada. Esto se explica por la aparición de resonancias cuando el tamaño de la envoltura es comparable con la longitud de onda en el dieléctrico.

[0186] Los efectos representados en la figura 4 y la figura 5 tienen un valor significativo para las aplicaciones potenciales de las nanopartículas como agentes de contraste. Unas nanopartículas diseñadas para absorber la radiación óptica sólo cuando están cubiertas con una nanoenvoltura dieléctrica de proteína perderá su absorción a una longitud de onda determinada en caso de que la envoltura esté ausente. Por lo tanto, las nanopartículas "desnudas" y las nanopartículas recubiertas absorben a diferentes longitudes de onda. Esto permite el suministro de la energía óptica de forma selectiva a un tipo de partículas y no en a otras. Las aplicaciones incluyen (i) la eliminación de las nanopartículas "desnudas" de la mezcla con nanopartículas recubiertas, (ii) apuntar con energía láser sólo nanopartículas unidas a la superficie celular o rodeadas de proteínas o lípidos, y no a las partículas en la corriente sanguínea.

[0187] De este ejemplo se concluye que una nanopartícula preferida que posee una fuerte absorción de banda estrecha en el rango espectral del infrarrojo cercano es una nanopartícula esférica simétrica no alargada, tal como una nano-barra, un nano-elipsoide, un nano-paralelepípedo o nano poliedros. La variación de una relación de aspecto de nanopartícula permite la sintonización de la banda de absorción óptica a una longitud de onda de radiación electromagnética deseable.

[0188] Las partículas mencionadas anteriormente también se pueden hacer como envolturas huecas o rellenas. Se han descrito las envolturas metálicas con núcleo dieléctrico (Halas-2002, patente americana 6,344,272). Con este ejemplo se destacan las envolturas dieléctricas con núcleo metálico. La variación del espesor de nanoenvoltura dieléctrica permite afinar al máximo la absorción óptica en el rango espectral del infrarrojo cercano. Por lo tanto, se pueden emplear tanto el grosor de la envoltura como la relación de aspecto para optimizar el diseño de las nanopartículas como agente de contraste optoacústico..

[0189] Hemos descubierto que las nanopartículas de oro y nanopartículas preferentemente alargadas tales como nanobarras o elipsoides y preferentemente envolturas dieléctricas alargadas con núcleo de oro poseen absorción óptica una excepcionalmente fuerte en el rango espectral del infrarrojo cercano. Esta absorción es tan alta, que no hay moléculas orgánicas o incluso nanopartículas hechas de sustancias orgánicas tales como los colorantes que posean absorción óptica en el rango del infrarrojo cercano tan cerca de la de las nanobarras de oro (o elipsoides de revolución) o cualquier otra de estructuras de dos o tres- dimensiones basadas en nanopartículas alargadas. Como ejemplo, vamos a comparar el coeficiente de extinción óptica del colorante de indocianina verde (ICG), una molécula orgánica que se sabe que tiene muy alta absorbancia en el infrarrojo cercano (ver el espectro presentado en la figura 6). La absorbancia molar máxima del ICG es de aproximadamente $1.1 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-1}$. Para comparar, la máxima absorbancia molar de nanoelipsoides de oro de revolución (tal como se representa en la figura 2) es igual a $5.8 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-1}$. Este valor puede ser calculado como un producto de la sección transversal máxima de absorción para nanoelipsoides de oro ($9.7 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^2$) multiplicado por el número de nanoelipsoides en un volumen de 1-cm^3 ($6 \cdot 10^{20}$) que tiene una concentración de 1 mol por litro. Por lo tanto, la absorbancia de nanoelipsoides 1 M es de unos 50 millones de veces más fuerte que la de ICG 1 M. Incluso cuando se considera la diferencia en volumen de las moléculas de ICG ($V_{ICG} \approx 3 \text{ nm}^3$) en relación con el volumen de las nanopartículas ($V_{NP} \approx 30500 \text{ nm}^3$), la diferencia en el coeficiente de absorción es de más de 5000 veces. Puesto que el suministro de cualquier agente de contraste (ya sean moléculas o partículas) a un tipo deseable de tejido siempre está limitado, sería beneficiosa para una tecnología de formación imágenes emplear agentes de contraste con un mayor contraste (es decir, absorción) por partícula.

EJEMPLO II Mejora de la Señal optoacústica a 532 nm con Agentes de contraste fabricados de nanopartículas metálicas.

[0190] Si la fluencia óptica supera el umbral de transición de fase de una sustancia que cubre las nanopartículas (para este ejemplo se supone que la sustancia que rodea las nanopartículas es agua) la amplitud de la señal optoacústica se puede aumentar en un orden de magnitud o más. Supongamos que la temperatura de la nanopartícula y el agua circundante llega al punto de ebullición en algún momento t_{ev} en el transcurso del pulso de láser. Se puede generar una capa delgada de vapor alrededor de la partícula que se calienta por encima de 100°C , o puede producirse agua en el estado estacionario sobrecalentado. Debido a la baja conductividad térmica del vapor en comparación con la del agua, la temperatura de la partícula puede seguir aumentando en el transcurso de pulso de láser con fluencia que exceda el umbral. Después del final del pulso de láser la temperatura de la partícula se reduce hasta el valor inicial debido al flujo de calor desde la partícula a través de la capa de vapor en el agua.

[0191] La masa total de vapor se determina por el calor transmitido desde la partícula al agua circundante y la tensión superficial del agua. En el curso de la relajación en algún momento del tiempo la temperatura de la partícula se vuelve menor que el punto de ebullición y empieza la condensación de vapor. La masa total de vapor producido en torno a una sola partícula no supera el valor siguiente:

$$m_v = \sigma \Phi_0 / \lambda \quad (14)$$

5 donde λ es el calor específico de evaporación. Se desprecian el calor contenido en la partícula y la tensión superficial del agua.

[0192] La onda de presión, generada por volumen elemental calentado puede ser tomado en la forma:

$$p' = \frac{\rho}{4\pi r} \frac{d^2(\delta V)}{dt^2} \quad (15)$$

10 donde δV es la variación del volumen elemental debido a la expansión térmica y a la producción de vapor.

[0193] En caso de mayor absorción homogénea de luz, la expansión de un volumen elemental, δV , se puede expresar como:

$$\frac{\delta V_1}{a^3} = \frac{\beta}{\rho c_p} \mu_a \Phi_0 \quad (16)$$

15 donde β es el coeficiente de la expansión de volumen. El coeficiente de expansión térmica depende de la temperatura y para el agua esta dependencia es bastante fuerte tal como saben expertos en la materia. Por lo tanto, antes de que la temperatura de la partícula pueda alcanzar el punto de ebullición, la eficiencia de la generación optoacústica aumenta más de 3 veces.

[0194] Las fuentes térmicas, que producen la onda acústica se pueden describir de la siguiente manera:

$$\beta \delta T = \left(\beta_0 + \frac{d\beta}{dT} \delta T \right) \delta T. \quad (17)$$

20 La expresión (9) muestra, que para un pequeño aumento de la temperatura

$$|\beta_0^{-1} d\beta/dT \delta T| \ll 1$$

25 el primer término entre paréntesis domina sobre el segundo término, y la distribución de las fuentes de calor es proporcional al aumento de temperatura, δT . En el caso contrario de un aumento de temperatura sustancial

$$|\beta_0^{-1} d\beta/dT \delta T| \gg 1,$$

30 y el segundo término es mucho mayor que el primer término, obteniéndose la distribución de fuentes de calor proporcional a δT^2 . Así, para pulsos cortos de láser la distribución espacial de las fuentes de calor será una suma de dos exponentes:

35 Para un pequeño aumento de la temperatura (bajo fluencia del láser) el borde de ataque de la señal optoacústica (que se asemeja a la distribución espacial de las fuentes de calor) tendrá forma exponencial con la $\exp[\mu_a c_0 t]$. Para fluencias más altas la pendiente exponencial será dos veces más fuerte: $2\mu_a c_0 t$. En el caso del medio heterogéneo con centros absorbentes, la variación del volumen elemental debido a la producción de vapor puede ser estimada como (se tiene en cuenta que la presión se reduce durante ese momento):

$$\frac{\delta V_2}{a^3} = \frac{\mu_a \Phi_0}{\rho_v \lambda} \quad (19)$$

donde ρ_v es la densidad del vapor. El calentamiento del vapor aumentará aún más el volumen elemental:

$$\frac{\delta V_3}{a^3} = \frac{\mu_a \Phi_0}{p_0} \frac{\gamma-1}{\gamma} \quad (20)$$

donde γ es el exponente adiabático, p_0 es la presión ambiente.

[0195] El modelo teórico presentado más arriba permite la estimación de la eficiencia optoacústica para diversos mecanismos de fenómenos termomecánicos. La deformación de volumen por unidad de calor específico liberado por diversos mecanismos se presenta en la siguiente tabla.

Eficiencia optoacústica	Expansión térmica del agua	Producción de vapor a través de transición de fases	Expansión térmica del vapor
$\delta V / \mu_a \Phi_0 a^3, \text{ cm}^3/\text{J}$	$8,6 \cdot 10^{-5}$	$3,2 \cdot 10^{-1}$	1,7

[0196] Por lo tanto, el calentamiento de nanopartículas a través de la absorción óptica puede mejorar la eficiencia de la generación optoacústica hasta varios órdenes de magnitud, aunque este proceso tiene un umbral de fluencia de energía que depende de la duración del pulso láser, del tamaño de la partícula y del coeficiente de absorción óptica de las partículas.

[0197] En este ejemplo, se demuestra experimentalmente que la eficacia de la formación de imágenes optoacústicas puede ser mejorada aún más mediante sobrecalentamiento altamente localizado de NPs resultantes de la evaporación de una nanocapa de agua circundante, que produce ondas acústicas de hasta un orden de magnitud mayor que la de una solución homogénea absorbente con un coeficiente de absorción promedio equivalente.

[0198] Un experto en la materia puede concluir que debido a que la absorción de plasmón de las nanopartículas de oro es mucho más fuerte que la absorción óptica de colorantes orgánicos, una concentración muy pequeña de NPs acumuladas en un objeto de un cuerpo hará que este objeto sea detectable con LOIS (suponiendo ausencia de NPs en otras partes del cuerpo). La figura 7A muestra la ventaja de NP's de oro con respecto a un colorante orgánico (tal como el verde de indocianina) como agente de contraste optoacústico. No sólo el colorante orgánico tiene tres órdenes de magnitud menos de absorción en el rango espectral del infrarrojo cercano (ICG es uno de los más fuertes cromóforos de los que se informa en la literatura con coeficiente de absorción $\mu_a \approx 1,2 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-1}$), sino también unas 8 veces menos eficiencia optoacústica (debido al efecto optoacústico no lineal en nanopartículas sobrecalentadas).

[0199] La figura 7B representa una imagen optoacústica de dos dimensiones con dos objetos que tienen igual absorción óptica de $\approx 1 \text{ cm}^{-1}$ y dimensiones idénticas. Un objeto (a la izquierda) se llenó con una solución acuosa de CuSO_4 y el otro objeto (a la derecha) se llenó con nanobarras de oro con relación de aspecto de 8. La fluencia óptica de un láser de nanosegundos Nd: YAG empleado para la iluminación de este maniquí era de 39 mJ/cm^2 . Se puede ver una clara diferencia en el brillo de los dos objetos. El objeto lleno de nanopartículas de oro es mucho más brillante. La diferencia en el brillo también se traduce en dimensiones visiblemente más pequeñas para el objeto lleno de solución homogénea absorbente de CuSO_4 . Esto es debido a la poca resolución de color (rango dinámico) de visualización de la imagen.

[0200] Otro ejemplo de cómo las nanopartículas absorbentes de la radiación electromagnética en el infrarrojo cercano pueden mejorar el brillo de las imágenes optoacústica (optoacústica) se presenta en la figura 8A. Tal como se representa en la figura 8A, la interacción del pulso láser con nanotubos de carbono en suspensión de agua da como resultado señales optoacústicas excepcionalmente fuertes. Mientras que la señal detectada en una solución acuosa de CuSO_4 sigue la teoría lineal de la expansión termoelástica, la amplitud de la señal optoacústica detectada en una suspensión de nanotubos de carbono de pared única es mucho mayor que la predicha por la teoría lineal de expansión termoelástica. La diferencia aumenta con el aumento de la fluencia óptica. Por lo tanto, en un procedimiento de tratamiento de imágenes médicas, la amplitud optoacústica a partir de nanotubos de carbono puede ser mucho mayor que la amplitud optoacústica de un colorante orgánico molecular con absorción similar.

[0201] Un efecto similar se demuestra en la imagen optoacústica de dos dimensiones, figura 8B, donde 3 se visualizaron objetos muy pequeños (el diámetro de los tres objetos era inferior a 1mm) a una profundidad de 5 cm dentro de un maniquí de gel de simulación de tejido biológico mediante el sistema LOIS con 32 transductores y una fluencia óptica muy baja de sólo 1 mJ/cm^2 . Este resultado demuestra el potencial de la detección sensible de objetos pequeños (dentro del cuerpo humano o animal) direccionados con el agente de contraste de nanopartículas basado en nanotubos de carbono.

[0202] La sustancia del núcleo es también un parámetro importante en los agentes de contraste optoacústica. No sólo puede la sustancia de núcleo influir en las propiedades ópticas de las nanocápsulas o nanotubos, sino también la sustancia del núcleo puede desempeñar un papel importante en la generación de señales acústicas aumentadas inducidas por láser.

EJEMPLO III. Biosensor Optoacústico para la detección de Armas biológicas

[0203] La técnica optoacústica que emplea pulsos de láser para la excitación espectralmente selectiva de medios de componentes múltiples y la detección de las ondas acústicas resultantes es bien conocida por su excepcional sensibilidad en la medición de pequeñas concentraciones de moléculas en líquidos y gases (Tam, 1986; Zharov y Letokhov, 1984). El procedimiento de tomografía optoacústica desarrollado por Oraevsky et al (Patente americana 5,840,023) permite la detección sensible y la visualización de alto contraste y el diagnóstico de los tumores malignos tempranos en los órganos humanos (Oraevsky 1994, 1996, 2000, 2002). Enseñamos aquí que la resolución y la sensibilidad de este procedimiento pueden ser mejoradas aún más a través de la administración selectiva de nanopartículas de oro no esféricas en el volumen de interés diagnóstico. Las nanopartículas de oro ayudan a mejorar drásticamente el contraste optoacústico, ya que pueden ser diseñadas para absorber fuertemente la radiación láser en el rango espectral del infrarrojo cercano y, ser calentadas por pulsos de radiación electromagnética, generar de forma efectiva ondas ultrasónicas transitorias en medios acuosos. Los transitorios acústicos resultantes (ultrasónicos) se pueden detectar con transductores piezoeléctricos diseñados especialmente para banda ultra ancha. Los avances tecnológicos mencionados anteriormente crean la base física para un nanobiosensor optoacústico que puede ser utilizado en la detección en tiempo real de pequeñas concentraciones de virus y bacterias fuertemente infecciosas y letales, tales como la viruela, el ántrax y otros posibles agentes de guerra biológica.

[0204] Un diagrama esquemático de tecnología de detección de guerra biológica se representa en la **Figure 9A**. El procedimiento de medición con el nanobiosensor optoacústico 10 incluye las siguientes etapas. Una muestra de aerosoles o agua sospechosa de contener agentes de guerra biológica, por ejemplo, DMO, se recoge y se mezcla en agua con nanopartículas de oro (NP) 14 conjugadas con un anticuerpo monoclonal (mAB) contra el tipo específico de DMO con el fin de enlazar NP con DMO. Las nanopartículas de oro que se muestra en el ejemplo I tienen una resonancia de plasmones de absorción óptica que puede ser desplazada a cualquier longitud de onda deseable entre rango espectral verde (conveniente para la aplicación de pulsos del segundo armónico de un láser Nd: YAG), y el rango espectral del infrarrojo cercano (conveniente para la aplicación de un láser Nd: YAG que funciona a la longitud de onda fundamental). En el caso de contaminación de agua, una concentración suficientemente excesiva de nanopartículas permitirá el reconocimiento y el enlace de todos los DMO en la sonda de NP conjugados con mAB. En la siguiente etapa, se inserta una membrana de red 16 con trampas de DMO enlazadas 18 basados en el anticuerpo secundario y se mueve a través de la suspensión acuosa contaminada. Solamente el DMO complementario al anticuerpo secundario será atrapado en la red de membrana 16 proporcionando especificidad de este procedimiento. Las NP no conjugadas con DMO no quedarán atrapadas. La red de membrana 16 con DMO atrapados enlazados con las NPs se coloca entonces en la cámara de detección 12 en contacto acústico con el transductor piezoeléctrico 20. La iluminación de la zona de trampas DMO con pulsos de láser 22 del láser pulsado 11 en la longitud de onda coincidente con la absorción resonante de nanopartículas de oro genera una burbuja de vapor expansiva 24 producida por la transferencia de energía térmica a partir de nanopartículas de agua sobrecalentadas. Con la resonancia de plasmón de las nanopartículas de oro se obtiene un coeficiente de absorción óptica extremadamente alto ($>10^7 \text{ cm}^{-1}$), que permiten el calentamiento o incluso el sobrecalentamiento de NP con bajo consumo de energía láser. Las NP sobrecalentadas con láser de pulso pueden evaporar una capa de agua circundante, lo que se traduce en la generación de ondas de presión transitorias y pulsos ultrasónicos 26 (llamado Efecto optoacústico gigante) (Diebold, 1990; Oraevsky, 2001). Como se ha demostrado por nuestro experimento representado en la **Figure 9B**, la eficiencia de la generación de ultrasonidos mediante la expansión de vapor en la transición de fase ($1.7 \text{ cm}^3/\text{J}$) excede la de la expansión térmica lineal de líquidos y sólidos ($<9 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^3/\text{J}$) varios órdenes de magnitud. Los pulsos ultrasónicos gigantes 26 son detectados por un transductor acústico de banda ancha (piezoeléctrico) 20, amplificados con un amplificador de carga (ChAmp) 28, digitalizados con el convertidor de analógico a digital (ADC) 30 y procesados con un microordenador 32. Las nanopartículas de oro calentadas por debajo de la temperatura de fusión no serán destruidas por el colapso de las burbujas de cavitación inducidas por láser. Por lo tanto, el proceso de detección se puede repetir con el fin de aumentar la relación señal-a-ruido y llevar a cabo el análisis estadístico de las señales optoacústicas. La sensibilidad del procedimiento propuesto supera significativamente la de la técnica conocida y permite la detección de una sola nanopartícula (DMO individual). La concentración de DMO se puede determinar sobre la base de la curva de calibración de la amplitud de la señal optoacústica como una función de la concentración de DMO en muestras contaminadas (Egerev 1992, 2000).

[0205] Nuestros cálculos realizados utilizando ecuaciones y expresiones analíticas deducidas en el ejemplo II mostraron que el sobrecalentamiento láser de nanopartículas de oro conduce a la vaporización de una nanocapa de agua calentada a la temperatura del punto crítico. La presión resultante se mide en kilobares y depende del radio de las nanopartículas y la duración del pulso láser.

[0206] Sorprendentemente, hemos descubierto que existen varios efectos interesantes en el curso de la interacción de la energía láser con nanopartículas de oro: (1) el espectro de absorción de las nanopartículas de oro se define por su forma, como por ejemplo la esfera **40**, el elipsoide **42** el cilindro **44** (ver **La figura 10A**), (2) la sección transversal de absorción a una longitud de onda dada depende del tamaño característico de la NP (**La figura 10B**), y (3) existen dimensiones óptimas de las nanopartículas para cada fluencia de irradiación láser que dan como resultado un radio máximo de la burbuja de vapor y, a su vez, la amplitud optoacústica máxima (**La figura 10C**).

[0207] La principal conclusión de nuestros estudios fue que los fenómenos que se producen en el curso de la interacción del pulso láser con las nanopartículas se puede emplear para la optimización de las dimensiones, forma y estructura de las NP (ver la **Figura 10A**) y las condiciones de irradiación con láser (tales como fluencia y el pulso duración) con el fin de maximizar la señal ultrasónica resultante para la detección de NP con mayor sensibilidad. Por ejemplo, los resultados de nuestros cálculos indicaron que el coeficiente de absorción de oro NP inicialmente aumenta con el aumento del radio de la NP, y entonces se satura como consecuencia del denominado efecto piel, es decir, la profundidad de penetración efectiva limitada de la energía electromagnética en los metales. Es interesante el hallazgo de que el radio NP óptimo en términos de coeficiente de absorción óptica (**La figura 10B**) corresponde aproximadamente a un radio de NP óptimo para la generación de tamaño máximo de la burbuja de vapor (**La figura 10C**). La presión inducida por láser generada por efecto optoacústico gigante en nanopartículas de oro puede ser muy alta (hasta 10 kbar). Sin embargo, el decrecimiento $1/r$ de la amplitud optoacústica sobre la propagación esférica de la onda ultrasónica desde una nanopartícula al transductor puede reducir significativamente la amplitud detectada en función de la distancia entre la partícula y el detector piezoeléctrico.

EJEMPLO IV Detección optoacústica sensible de nanopartículas de oro en el maniquí de gel similar al tejido

[0208] Se preparó un maniquí de gelatina con propiedades ópticas similares a las propiedades de los tejidos biológicos y se incrustaron seis objetos cilíndricos llenos de diversas concentraciones de nanopartículas esféricas de oro de 40 nm de diámetro en el maniquí. Las concentraciones de NP se variaron en el intervalo que va desde $1.0 \cdot 10^9$ NP/cm³ a $1.3 \cdot 10^{10}$ NP/cm³.

[0209] Con referencia a la figura 11A, se suministraron pulsos láser de nanosegundos en la longitud de onda de 532-nm a la superficie del maniquí **100** con fluencia de energía de 4.8 mJ/cm², tal como se indica en **101**, de modo que se iluminó todo el área de un objeto de 5-mm incrustado **107**. Las ondas transitorias de presión resultantes (optoacústicas) **102** se propagaron hasta la superficie del maniquí y se detectaron con un transductor acústico de banda ultra ancha **103**, se amplificaron con un amplificador de carga **104**, se pasaron a un osciloscopio **105** y se leyeron en un ordenador **106**.

[0210] Los perfiles optoacústicos medidos se presentan en la **figura 11B**. La amplitud optoacústica se representa en la **figura 11C** como una función de la concentración de nanopartículas.

[0211] Este experimento demostró que las nanopartículas de oro podían representarse de forma fiable en concentraciones que es realista esperar en los tejidos biológicos de interés para el diagnóstico tras la administración del agente de contraste de nanopartículas. Este experimento demostró que las nanopartículas de oro podían representarse de forma fiable en concentraciones que es realista esperar en los tejidos biológicos de interés para el diagnóstico tras la administración del agente de contraste de nanopartículas. La misma técnica utilizada en este Ejemplo IV producirá una señal mucho más sensible con una nanobarra de oro. Suponiendo un volumen de célula promedio de 1000 mm³, se puede calcular que una concentración de nanopartículas de 109 por cm³ da alrededor de 1 nanopartícula por célula. Esto significa que la formación de imágenes opto-acústicas empleando un agente de contraste de materia de partículas nanométricas proporciona una sensibilidad de detección cercana a la definitiva.

EJEMPLO V Formación de imágenes opto-acústicas de células de cáncer direccionadas selectivamente con nanopartículas de oro

[0212] Una de las consideraciones importantes para la formación de imágenes optoacústicas (optoacústica) es la sensibilidad para la detección de objetos pequeños en el cuerpo. Se realizó un experimento piloto in vitro que demostró el potencial de formación de imágenes optoacústicas combinadas con nanopartículas de oro como agente de contraste en la detección de grupos de células cancerosas. La figura 7 representa una imagen optoacústica del maniquí de gel con tres objetos incrustados. Un maniquí de gel en forma de lámina con un diámetro de 12-cm, espesor de 9-cm y volumen aproximado de 1 litro se colocó en una matriz de transductores optoacústicos en forma de arco (a) y una imagen optoacústica del mismo maniquí (b). Los 3 cm superiores del maniquí de gel se rebanaron para producir una superficie plana para la iluminación láser. El maniquí se ilumina desde la parte superior con pulsos de láser en la longitud de onda de 532-nm. El haz de láser tenía una sección transversal gaussiana con fluencia de energía incidente de 10 mJ/cm² y diámetro de 30-mm (visible como una línea manchada de luz en la parte superior de la imagen optoacústica). El maniquí se fabricó empleando 90 g de polvo de gelatina (Sigma, St. Louis, MO), 10 mL de leche entera (Oak Farms, Dallas, TX) y agua.

[0213] Con referencia a la figura 12A, tres tubos con diámetro interno de 4-mm y longitud de 11-mm se incrustaron en el centro del maniquí a 5 cm de profundidad de la superficie iluminada y a 4 cm de la matriz de transductores. Estos tubos se llenaron con tres medios: el mismo gel empleado en el maniquí (izquierda), nanopartículas esféricas de oro de 40 nm con concentración de 10^9 NP/cm³ (centro) y células de cáncer de mama SK-BR3 direccionadas con nanopartículas de oro (a la derecha). Dos de los tres objetos pueden visualizarse claramente. El tercer objeto invisible sirvió como control del hecho de que un tubo de plástico de pared delgada utilizado para contener células cancerosas no tenía suficiente contraste optoacústico.

[0214] Haciendo referencia a la figura 12B, el principal resultado de este experimento es una demostración de que las células de cáncer de mama SK-BR3 pueden ser (1) alcanzadas con éxito por el anticuerpo Herceptin biotinilado, (2) alcanzado también más con nanopartículas de oro de 40 nm conjugadas con estreptavidina, y (3) detectadas y fotografiadas con sistema de imagen optoacústica láser (LOIS) en un maniquí de gel a una profundidad de al menos 5 cm. Las propiedades ópticas del maniquí en la longitud de onda de 532 nm se parecían a las propiedades ópticas del tejido de la mama en el rango espectral del infrarrojo cercano (la atenuación óptica efectiva era $\mu_{\text{eff}} = 1,4 \text{ cm}^{-1}$ dominada por la dispersión óptica). Las propiedades ópticas de la suspensión acuosa de las nanopartículas de oro eran $\mu_a = 0,12 \text{ cm}^{-1}$ y $\mu_s^1 = 0$.

Las propiedades ópticas de la agrupación de células eran desconocidas. Sin embargo, la muestra de las células era visualmente de color rosa con una tonalidad ligeramente más clara en comparación con la suspensión de nanopartículas de oro. La distribución espacial del color de rosa a través de la muestra de células era heterogénea con aproximadamente la mitad de las células de color rosa y la otra mitad crema ligera. La descripción visual de las células que coincidían con la imagen optoacústica era ligeramente de menor brillo y de menor diámetro (derecha), en comparación con el tubo de referencia que contenía nanopartículas de oro (en el centro). Con el uso de nanopartículas no esféricas de la presente invención, las señales son mayores y se mejora la sensibilidad de la prueba.

REFERENCIAS CITADAS

[0215]

M. Aslam "Bioconjugation : protein coupling techniques for the biomedical sciences," Macmillan Reference, New York, 1998.

S. B. Abrams Laser-based breast imager competes with X-rays, Biophotonics International, 1997, 4(1): 21-22.

J. E. Beesley Colloidal Gold: A New Perspective for Cytochemical Marking," Oxford, New York, 1989.

D. Boyer D, Tamarat P, Maali A, Lounis B, Orrit M. Photothermal imaging of nanometer-sized metal particles among scatterers," Science. 2002, 297, 1160-3.

G. Blume, G. Cevc Biochim. Biophys. Acta 1990, 1029, 91-97.

I. Brigger, C. Dubernet, P. Couvreur Adv. Drug Dev. Rev., 2002, 13, 631.

S.-S. Chang, C.-W. Shih, W.-C. Lai, C.R.C. Wang "The Shape Transition of Gold Nanorods", Langmuir, 1999, 15, 701-709.

J. B. Carroll, B. L. Frankamp, V. M. Rotello "Self-assembly of gold nanoparticles through tandem hydrogen bonding and polyoligosilsequioxane (POSS)-POSS recognition processes," Chem Commun., 2002, 1892-3. S.-S. Chang et al., Langmuir 1, 1999, 15, 701.

E. Dujardin, L.-B. Hsin, C. R. Chris Wang, S. Mann "DNA-driven self-assembly of gold nanorods", Chem. Commun., 2001, 1264-1265.

G. J. Diebold, T. Sun "Properties of optoacoustic waves in one, two, and three dimensions," Acustica, 1994; 80, 339-351.

G.J. Diebold, M.I. Khan, S.M. Park: "Photoacoustic signatures of particulate matter: optical production of acoustic monopole radiation", Science 1990; 250: 101-104.

F. A. Duck, Physical properties of tissue: A comprehensive reference book, Academic Press, San Diego, 1990.

S.V. Egerev, and A.V. Fokin in Biomedical Optoacoustics, ed. by A.A. Oraevsky, Proc. SPIE, 2000, v.3916, pág. 210-217.

S.V. Egerev, O.M. Zozulya, and O.V. Puchenkov: Sensitive wide-band ultrasonic detection of particles in liquids, In Photoacoustic and Photothermal Phenomena III, Springer, New-York - Heidelberg, 1992, pág.50-52.

Patente europea EP0601618

Patente europea EP0602700

Patente europea EP0808175

M.A. Eghtedari, J.A. Copeland, V.L. Popov, M. Motamedi, N. Kotov, A.A. Oraevsky: Bioconjugated gold nanoparticles as a contrast agent for optoacoustic detection of small tumors, Proc. SPIE 2003, 4960: 76-85.

R. Gans: Ann. Phys. 1915, 47, 270

R. T. Greenlee, M. B. Hill-Harmon, T. Murray, M. Thun "Cancer statistics 2001," CA Cancer J. Clin., 2001;51,15-36.

G. Gregoriadis, B. McCormack, Targeting of Drugs 6: Strategies for Stealth Therapeutic Systems, Plenum, 1998, pág. 264-267.

A. J. Haes, R. P. Van Duyne "A nanoscale optical biosensor: sensitivity and selectivity of an approach based on the localized surface plasmon resonance spectroscopy of triangular silver nanoparticles," J. Am. Chem. Soc. 2002,124(35),10596-604.

J. F. Hainfeld, Scanning Microsc., 1995,239,254.

- M. Harris, J. (ed) "Poly(ethylene glycol) chemistry, biotechnical and biomedical applications" Plenum Press, New York, 1992.
- M. A. Hayat Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications Vol. 3, Academic Press, New York, 1985.
- M. Harris, J. (ed) "Poly(ethylene glycol) chemistry, biotechnical and biomedical applications" Plenum Press, New York, 1992.
- Hata K, Fujihara H. "Preparation and electrochemical polymerization of new multifunctional pyrroliothiolate-stabilized gold and palladium nanoparticles," Chem. Commun., 2002, 22, 2714-5.
- S. Hsieh, S. Meltzer, C. R C. Wang, A. A. G. Requicha, M. E. Thompson, B. E. Koel J. Phys. Chem., 2002, 106, 231.
- R. Jin, Y. Cao, C. A. Mirkin, K. L. Kelly, G. C. Schatz, J. Zheng Science, 2001, 294, 1901.
- A. Kameo, A. Suzuki, K. Torigoe, K. Esumi J. Coll. Interface Sci., 2001, 241, 289.
- P. W. Kantoff, "Prostate cancer," WebMD Scientific American Medicine, 2002.
- A.A. Karabutov, E.V. Savateeva, V.G. Andreev, S.V. Solomatin, RD.Y. Fleming, Z. Gatalica, H. Singh, M.P. Henrichs, and A.A. Oraevsky: "Optoacoustic images of early cancer in forward and backward modes", European Conference on Biomedical Optics, Proc. SPIE 2001; 4434: 13-27.
- A.A. Karabutov, E.V. Savateeva, A.A. Oraevsky: Optoacoustic supercontrast for early cancer detection, Proc. SPIE 2001; 4256: 179-187.
- A.A. Karabutov, A.A. Oraevsky: Ultimate sensitivity of wide-band detection for laser-induced ultrasonic transients, Proc. SPIE 2000; 3916: 228-239.
- F. Kim, J. H. Song, P. Yang "Photochemical Synthesis of Gold Nanorods," J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 14316-14317.
- A. L. Klibanov, et al. FEBS Letters 1990, 268, 235.
- G. Kong, R. D. Braun, M. W. Dewhirst, Cancer Res., 2001, 61, 3027.
- G. Kong, R. D. Braun, M. W. Dewhirst, Cancer Res., 2000, 60, 4440.
- M. N. V. R. Kumar, J. Pharm. Pharmaceut. Sci., 2000, 3, 234.
- Leggett "Optical mammography offers promise as alternative to X-ray detection," Biophotonics International., 1996; 3(1): 56-57.
- M. Link, M. W. El-Sayed: Spectral properties and relaxation dynamics of surface plasmon electronic oscillations in gold and silver nanodots and nanorods, J. Phys. Chem. B, 1999, 103, 8410.
- S. Link, M.B. M.A. El-Sayed: J. Phys. Chem. B 1999, 103: 3073-3077.
- M. B. Mohammed, K. Z. Ishmail, S. Link, M. A. El-Sayed, J. Phys. Chem., 1998, 102, 9370.
- A.A. Oraevsky, S.L. Jacques, R.O. Esenaliev, F.K. Tittel: Laser based optoacoustic imaging in biological tissues, Proc. SPIE 1994; 2134A: 122-128
- A.A. Oraevsky, R.O. Esenaliev, S.L. Jacques, F.K. Tittel, and D. Medina. "Breast Cancer Diagnostics by Laser Opto-Acoustic Tomography", OSA Trends in Optics and Photonics on Advances in Optical Imaging and Photon Migration", R.R. Alfano and J.G. Fujimoto, eds. (OSA, Washington, DC), 1996, v.2, pág. 316-321.
- A.A. Oraevsky, A.A. Karabutov, V.A. Andreev, R.O. Esenaliev: Laser opto-acoustic imaging of the breast: Detection of cancer angiogenesis, Proc. SPIE 1999; 3597: 352-363.
- A. A. Oraevsky, S. L. Jacques, F. K. Tittel "Determination of tissue optical properties by time-resolved detection of laser-induced stress waves, Proc. SPIE 1993; 1882: 86-101.
- A. A. Oraevsky, R.O. Esenaliev, S. L. Jacques, F.K. Tittel "Lateral and z-axial resolution in laser optoacoustic imaging with ultrasonic transducers," Proc. SPIE, 1995, 2389, 198-208, (Appendix).
- A. A. Oraevsky, S. L. Jacques, F.K. Tittel, "Measurement of tissue optical properties by time-resolved detection of laser-induced transient stress," Applied Optics, 1997, 36(1): 402-415.
- A .A. Oraevsky, A. A. Karabutov, E. V. Savateeva Optoacoustic supercontrast for early cancer detection," Proc. SPIE 2001; 4256, 179-187.
- A. A. Oraevsky, A. A. Karabutov, E. V. Savateeva "Enhancement of optoacoustic tissue contrast with absorbing nanoparticles," European Conference on Biomedical Optics, Proc. SPIE 2001, 4434, 60-69.
- A. Oraevsky, A. N. Oraevsky "Plasmon resonance in ellipsoid nanoparticles," Quant. Electron. 2002; 32(1), 79-82.
- A.A. Oraevsky, E.V. Savateeva, S.V. Solomatin, A.A. Karabutov, V.G. Andreev, Z. Gatalica, T. Khamapirad: "Optoacoustic imaging of blood for visualization and diagnosis of breast cancer", Proc. SPIE 2002; 4619: 81-94.
- A.A. Oraevsky, A.A. Karabutov, E.V. Savateeva: "Enhancement of optoacoustic tissue contrast with absorbing nanoparticles", European Conference on Biomedical Optics, Proc. SPIE 2001; 4434: 60-69.
- M. Page: "Tumor targeting in Cancer Therapy", Humana Press, 2002.
- G.C. Papavassiliou: Optical Properties of small inorganic and organic metal particles, Prog. Solid State Chem, 1980, 12, 185-286
- PCT WO0106257
- PCT WO9857667
- PCT WO02059226
- M. L. Sandroock, C. D. Pibel, F. M. Geiger, C. A. Foss J. Phys. Chem., 1999, 103, 2668.
- C.-W. Shih, W.-C. Lai, C.-C. Hwang, S.-S. Chang, C.R. Chris Wang "Electrochemcial Synthesis and Optical properties of Au Nanorods," in The Handbook of Metal Nanoparticles: Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Applications" Marcel Dekker, 2001, Chapter 7, pág. 163-182.
- J. J. Storhoff, A. A. Lazaorides, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, G. C. Schatz, "What controls the optical properties of DNA-linked fold nanoparticle assemblies?" J. Am. Chem. Soc., 2000, 122, 4640.
- J.A. Stratton: "Electromagnetic Theory, McGraw-Hill, New York, 1941.
- Y. Sun, Y. Xia "Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles," Science, 2002, 298, 2176-9.

- F. Kim, J. H. Song, P. Yang "Photochemical synthesis of gold nanorods," J. Am. Chem. Soc., 2002, 124(48):14316-7.
 Y. Sun, Y. Xia "Increased sensitivity of surface plasmon resonance of gold nanoshells compared to that of gold solid colloids in response to environmental changes," Anal. Chem., 2002, 74(20), 5297-305.
 A. C. Tam, "Applications of photoacoustic sensing techniques", Rev. Modern Phys. 58(2), 381-431, (1986).
- 5 Thorpe et al. "Breast Cancer Research and Treatment," 1995, 36:237-51.
 B. J. Tromberg, N. Shah, Ryan Lanning, A. Cerussi, J. Espinoza, T. Pham, L. Svaasand, J. Butler "Noninvasive in vivo characterization of breast tumors using photon migration spectroscopy," Neoplasia, 2000, 2(1), 26-40.
 Solicitud de patente de Estados Unidos 20010002275
 Solicitud de patente de Estados Unidos 2002044909.
- 10 Solicitud de patente de Estados Unidos 2002022004
 Solicitud de patente de Estados Unidos 2002132045
 Solicitud de patente de Estados Unidos 20020103517
 Solicitud de patente de Estados Unidos 20020160195
 Solicitud de patente de Estados Unidos 20020034537
- 15 Patente de Estados Unidos No. 5,472,683
 Patente de Estados Unidos No. 5,500,204
 Patente de Estados Unidos No. 5,521,218
 Patente de Estados Unidos No. 5,525,328
 Patente de Estados Unidos No. 5,543,133
- 20 Patente de Estados Unidos No. 5,447,710
 Patente de Estados Unidos No. 5,560,932
 Patente de Estados Unidos No. 5,573,783
 Patente de Estados Unidos No. 5,580,579
 Patente de Estados Unidos No. 5,840,023
- 25 Patente de Estados Unidos No. 6,090,858
 Patente de Estados Unidos No. 6,123,923
 Patente de Estados Unidos No. 6,139,819
 Patente de Estados Unidos No. 6,180,085
 Patente de Estados Unidos No. 6,180,087
- 30 Patente de Estados Unidos No. 6,183,726
 Patente de Estados Unidos No. 6,190,641
 Patente de Estados Unidos No. 6,264,920
 Patente de Estados Unidos No. 6,264,914
 Patente de Estados Unidos No. 6,264,917
- 35 Patente de Estados Unidos No. 6,264,919
 Patente de Estados Unidos No. 6,270,806
 Patente de Estados Unidos No. 6,331,289
 Patente de Estados Unidos No. 6,344,272
 Patente de Estados Unidos No. 6,395,257
- 40 Patente de Estados Unidos No. 6,403,056
 Patente de Estados Unidos No. 6,428,811
 N. Weidner, J. P. Semple, W. R. Welch, J. Folkman "Tumor angiogenesis and metastasis - correlation in invasive breast carcinoma," New England J. of Med., 1991, 324, 1-7.
 G.-T. Wei, F.-K. Liu, S.-S. Chang, C.R.C. Wang "Shape Separation of Nanometer Gold Particles by Size Exclusion Chromatography" Anal. Chem., 1999, 71, 1085-2091
- 45 W. T. Yang "Correlation between color power Doppler sonographic measurement of breast tumor vasculature and immunohistochemical analysis of microvessel density for the quantitation of angiogenesis," J. Ultrasound Med., 2002, 21(11), 1227-1235.
 Y. Y. Yu, S.-S. Chang, C.L. Lee, C. R. C. Wang, J. Phys. Chem. B, 1997, 101, 6661.
- 50 M. Yamada, A. Kuzume, M. Kurihara, K. Kubo, H. Nishihara "Formation of a novel porphyrin-gold nanoparticle network film induced by IR light irradiation," Chem. Commun. 2001, 23, 2476-2477.
 B. M. I. van der Zande, M. R. Böhmer, L. G. J. Fokkink, C. Schönenberger, J. Chem. Phys., 1997, 101, 852.
 Q. Zhu, E. Conant, B. Chance, "Optical imaging as an adjuvant to sonography in differentiating benign from malignant breast lesions," J. Biomed. Optics, 2000, 5, 12-17.
- 55 V.P. Zarov, V.S. Letokhov, Laser opto-acoustic spectroscopy, (Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1984), 320p.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para mejorar la detectabilidad para un objeto específico en un cuerpo, que comprende las etapas de: (a) dirigir sobre un cuerpo una radiación electromagnética específica que tiene una longitud de onda o espectro de longitudes de onda en el rango que va desde 3nm a 300mm para la detección del objeto, si este está presente, teniendo dicho cuerpo materia de partículas nanométricas en su interior que es una colección de nanopartículas caracterizadas por el hecho de que tienen un tamaño más probable y un máximo de absorción más probable a una longitud de onda o rango de longitudes de onda seleccionados, dichas nanopartículas al menos parcialmente recubiertas con uno o más materias orgánicas o materia inorgánica, teniendo la materia de partículas nanométricas las siguientes propiedades:
 - i. es al menos parcialmente metálica,
 - ii. tiene una forma perfilada alargada no esférica que tiene una dimensión característica mínima en el rango que va desde aproximadamente 1 a aproximadamente 3000 nanómetros, y
 - iii. tiene una composición formada de modo que al ser irradiada con dicha radiación electromagnética específica se produce una presión térmica ya sea en dicha materia de partículas nanométricas o en dicho objeto mayor que la que dicho objeto podría producir como resultado de dicha irradiación en ausencia de dicha materia de partículas nanométricas; y dicha radiación electromagnética específica se selecciona de modo que la longitud de onda o espectro de longitudes de onda es más largo en un factor de al menos 3 que la dimensión característica mínima de dicha materia de partículas nanométricas, de modo que dicha radiación electromagnética es absorbida por dicha materia de partículas nanométricas más de lo que dicha radiación electromagnética sería absorbida por una o más partículas formadas esféricamente no agregadas con el mismo volumen total con una composición idéntica a dicha materia de partículas nanométricas, resultando dicha absorción en la producción de una señal opto-acústica mejorada, (b) recibir dicha señal opto-acústica, (c) convertir dicha señal opto-acústica recibida en una señal electrónica **caracterizado por el hecho de que** al menos un parámetro seleccionado de entre la amplitud, frecuencia, fase, perfil temporal, tiempo de llegada, espectro de frecuencias, o una combinación de cualquiera o más de estos parámetros; y (d) presentar dicha señal para una evaluación de dicho al menos un parámetro por un humano o una máquina.
2. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicha materia de partículas nanométricas produce un desplazamiento de la absorción máxima para dichas longitud de onda o rango de longitudes de onda seleccionados al interactuar con dicho objeto.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicha colección de nanopartículas tiene una relación de aspecto más probable desde aproximadamente 2 a aproximadamente 10.
4. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que la mayor dimensión de dichas nanopartículas más probables está en el rango que va desde aproximadamente 2 nanómetros a aproximadamente 200 nanómetros.
5. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dichas nanopartículas tienen una pluralidad de modos de distribución granulométrica.
6. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicha colección de nanopartículas está constituida por combinaciones de nanopartículas con una forma y con nanopartículas con otra forma para formar geometrías capaces de absorber una longitud de onda específica o rango de longitudes de onda seleccionados.
7. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicha colección comprende un agregado de nanopartículas.
8. El procedimiento de la reivindicación 7 en el que dicho agregado incluye nanopartículas esféricas.
9. El procedimiento de la reivindicación 7 en el que dicho agregado está ordenado y en el que dichas nanopartículas están al menos parcialmente recubiertas con material orgánico, comprendiendo dicho material orgánico material genético.
10. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicho metal de dicha colección de nanopartículas al menos parcialmente metálicas se selecciona de entre oro, plata, platino, una forma de carbono que tiene propiedades metálicas, una mezcla de al menos dos de dichos metales, o una aleación de al menos dos de dichos metales.
11. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicha colección comprende nanopartículas de carbono, tales como nanotubos de carbono, que absorben dicha radiación electromagnética específica.
12. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicha colección de nanopartículas tiene un tamaño más probable de menos que 300 nanómetros.
13. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dichas nanopartículas comprenden envolturas que tienen un valor negativo de la parte real de la permeabilidad dieléctrica compleja.

14. El procedimiento de la reivindicación 13 en el que dichas envolturas tienen un núcleo dieléctrico.
- 5 15. El procedimiento de la reivindicación 13 en el que dichas nanopartículas tienen un núcleo con un valor negativo de la parte real de la permeabilidad dieléctrica compleja.
16. El procedimiento de la reivindicación 13 en el que las envolturas están rellenas de una sustancia que tiene un coeficiente de expansión térmica en el rango de $9 \times 10^{-2} \text{ mm}^3/\text{joule}$ a $2 \times 10^3 \text{ mm}^3/\text{joule}$.
- 10 17. El procedimiento de la reivindicación 16 en el que dicha sustancia se selecciona de entre el grupo que consiste en agua, geles acuosos, hidrogeles, gases, lípidos y otras sustancias orgánicas.
18. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicho material orgánico está unido a la superficie de las nanopartículas físicamente o químicamente o ambos.
- 15 19. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicho material orgánico es ambifílico.
20. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicho material orgánico comprende polietileno glicol.
- 20 21. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicho material orgánico incluye grupos funcionales reactivos, incluyendo grupos hidroxilo, grupos tiol, grupos amino, hidroxilo, halógeno, grupos ciano, grupos sulfhidrilo, grupos carboxilo, y grupos carbonilo, grupos con carbohidratos, dioles vicinales, tioéteres, 2-aminoalcoholes, 2- grupos aminotioles, grupos guanidinilo, grupos imidazolilo y grupos fenólicos.
- 25 22. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicho material orgánico comprende peptidos o anticuerpos conjugados con dichas nanopartículas y capaces de apuntar selectivamente a marcadores específicos del objeto.
23. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que las nanopartículas en dicha colección son están al menos parcialmente oro y tienen una distribución bimodal de relaciones de aspecto, y la longitud de onda para irradiación va desde aproximadamente 520 nanómetros a aproximadamente 1120 nanómetros.
- 30 24. El procedimiento de la reivindicación 23 en el que un máximo local en la distribución de relaciones de aspecto es de aproximadamente 4 y el otro máximo local en la distribución de relaciones de aspecto es de aproximadamente 8, y dicha radiación electromagnética comprende dos o más bandas de longitud de onda.
- 35 25. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicha longitud de onda de radiación electromagnética se escoge para coincidir con la máxima absorción para nanopartículas al menos parcialmente recubiertas con material dieléctrico orgánico o inorgánico.
- 40 26. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicha señal opto-acústica se produce mediante absorción de resonancia por plasmones por electrones conductores en dicha al menos una materia de partículas nanométricas.
27. El procedimiento de la reivindicación 26 en el que la radiación electromagnética es por pulsos y está emitida desde un láser por pulsos.
- 45 28. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicho cuerpo está en un cuerpo humano o cuerpo no-humano vivo.
29. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicho cuerpo es un espécimen in vitro.
- 50 30. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicho objeto comprende un tejido, célula, microorganismo o molécula específicos.
31. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicha colección de nanopartículas es un agente de contraste fisiológicamente tolerable que se acumula en un tejido, célula o microorganismo específicos.
- 55 32. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicho objeto es al menos un tumor en un cuerpo humano o cuerpo no-humano vivo.
33. El procedimiento de la reivindicación 1 que comprende además generar una imagen bi o tridimensional a partir de dicha señal detectada.
- 60 34. Procedimiento de generar una imagen de un cuerpo humano o no-humano vivo animal o part thereof, que comprende (a) exponer un cuerpo o de una parte de este a radiación electromagnética en el rango infrarrojo cercano de un espectro de longitudes de onda, teniendo dicho cuerpo o de una parte de este en su interior un agente de contraste fisiológicamente tolerable que comprende una colección de partículas al menos parcialmente metálicas
- 65

que tienen un tamaño más probable no menor que aproximadamente 1 nanómetro y no mayores que aproximadamente 1000 nanómetros y una forma no esférica alargada perfilada capaces de absorber longitudes de onda de radiación electromagnética seleccionadas específicas, estando dichas partículas al menos parcialmente recubiertas con una o más materias orgánicas o materia inorgánica, teniendo dicha radiación electromagnética una longitud de onda o rango de longitudes de onda seleccionados mayores en un factor de al menos 5 con respecto a el tamaño mínimo de dichas partículas, (b) detectar una señal opto-acústica generada en dicho cuerpo como resultado de calentar dicha colección de partículas al menos parcialmente metálicas, y (c) generar una imagen a partir de dicha señal detectada.

35. El procedimiento de la reivindicación 34 en el que la conversión de dicha señal opto-acústica en dicha señal electrónica se hace mediante un detector seleccionado de entre detectores térmico, acústico, óptico o infrarrojo o una combinación de estos detectores.

36. Agente de contraste fisiológicamente tolerable que comprende una colección de materias de partículas nanométrica al menos parcialmente metálicas que tienen un tamaño más probable no menor que aproximadamente 1 nanómetro y no mayores que aproximadamente 1000 nanómetros y una forma no esférica alargada perfilada capaces de absorber longitudes de onda de radiación electromagnética seleccionadas específicas y que tiene al menos un revestimiento parcial de una o más materias orgánicas o materia inorgánica, para su utilización en un procedimiento de detección y tratamiento no invasivos de un tumor en un cuerpo vivo humano o no-humano animal o de una parte de este, comprendiendo dicho procedimiento (a) administrar dicho agente de contraste a dicho cuerpo o a una parte de este de manera a posicionarlo donde se desea examinar la presencia de un tumor, (b) exponer dicho cuerpo o una parte de este a radiación electromagnética en el rango infrarrojo cercano de espectro de longitudes de onda que tiene una longitud de onda o rango de longitudes de onda seleccionados mayores en un factor de al menos 5 con respecto a el tamaño mínimo de dichas materias de partículas nanométricas, (c) detectar una señal opto-acústica generada en dicho cuerpo como resultado de calentar dicha colección de materias de partículas nanométrica al menos parcialmente metálicas, (d) convertir dicha señal opto-acústica en una señal electrónica **caracterizado por el hecho de que** al menos un parámetro seleccionado de entre la amplitud, la frecuencia, la fase, el perfil temporal, el tiempo de llegada o el espectro de frecuencias o una combinación de estos, (e) presentar dicha señal para una evaluación de dicho al menos un parámetro por un humano o una máquina para saber si hay un tumor presente en dicho cuerpo, y (f) dirigir sobre dichas materias de partículas nanométricas radiación con una longitud de onda o rango de longitudes de onda seleccionados, de modo que dicha radiación es absorbida de manera mínima por material del cuerpo con la finalidad de calentar dichas materias de partículas nanométricas en dicho tumor y producir un efecto optoacústico mejorado suficiente para destruir la viabilidad de dicho tumor.

Fig. 1

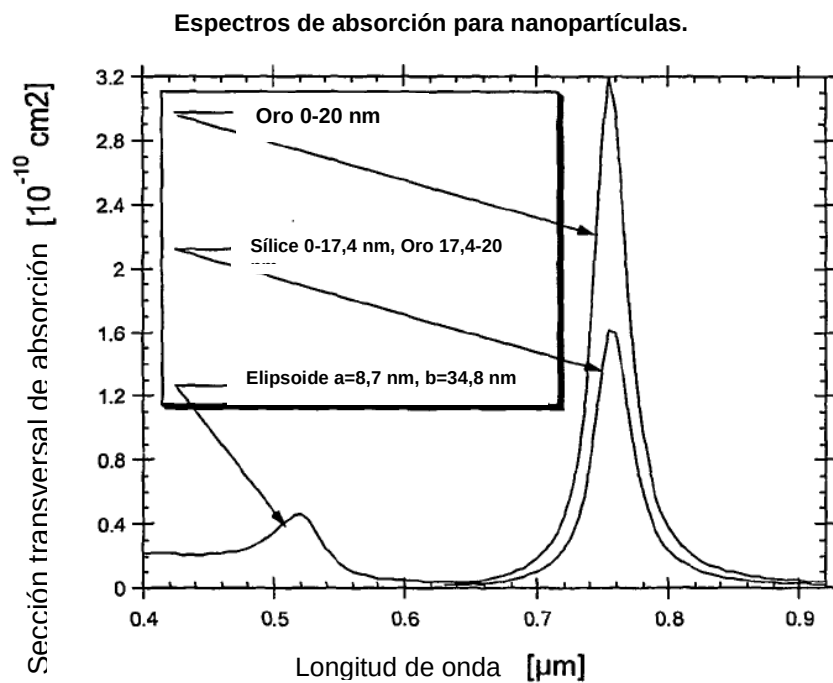


Fig. 2

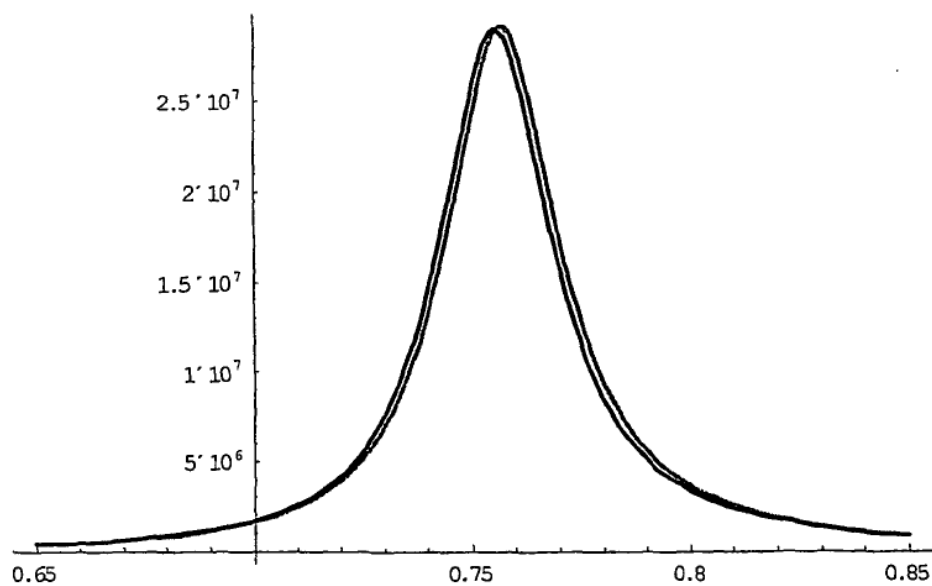


Fig. 3

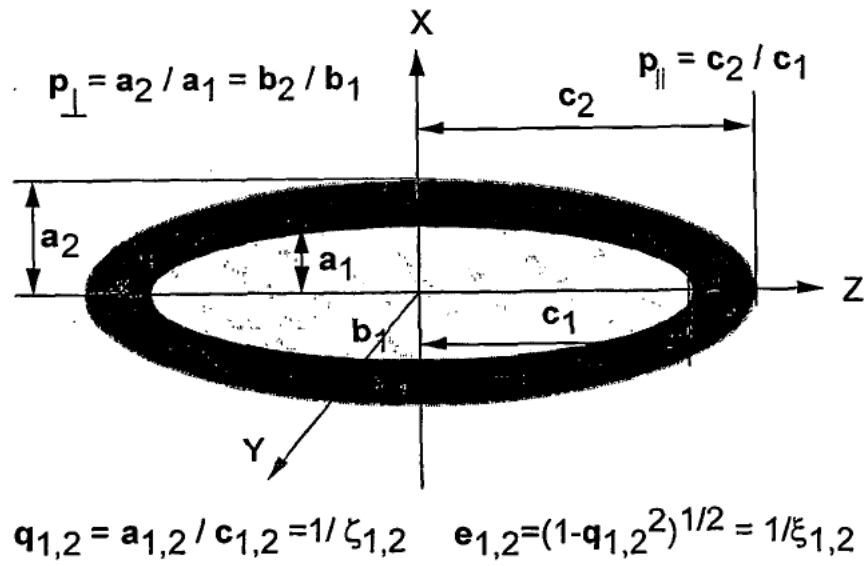


Fig. 4

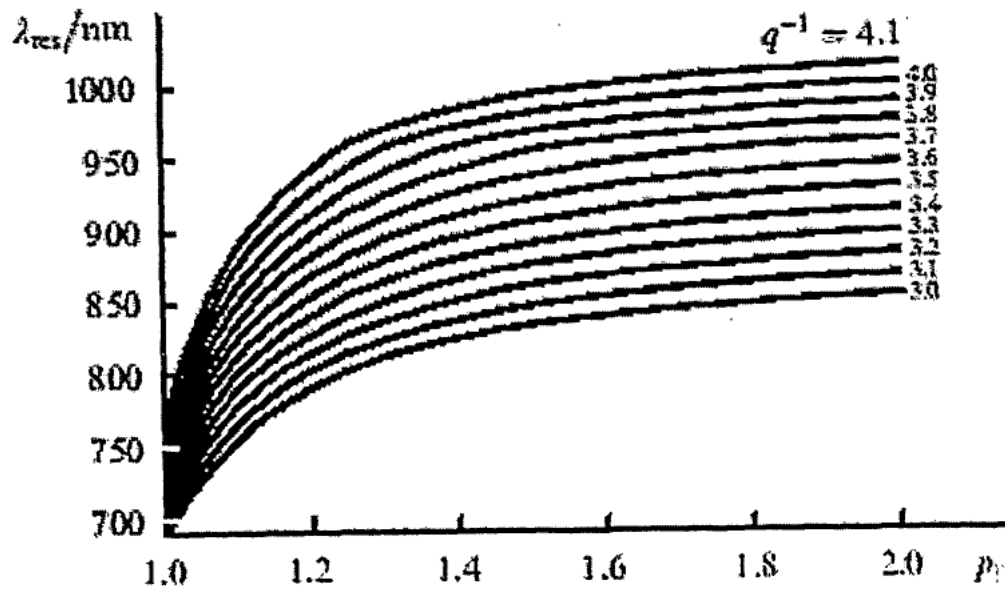


Fig. 5

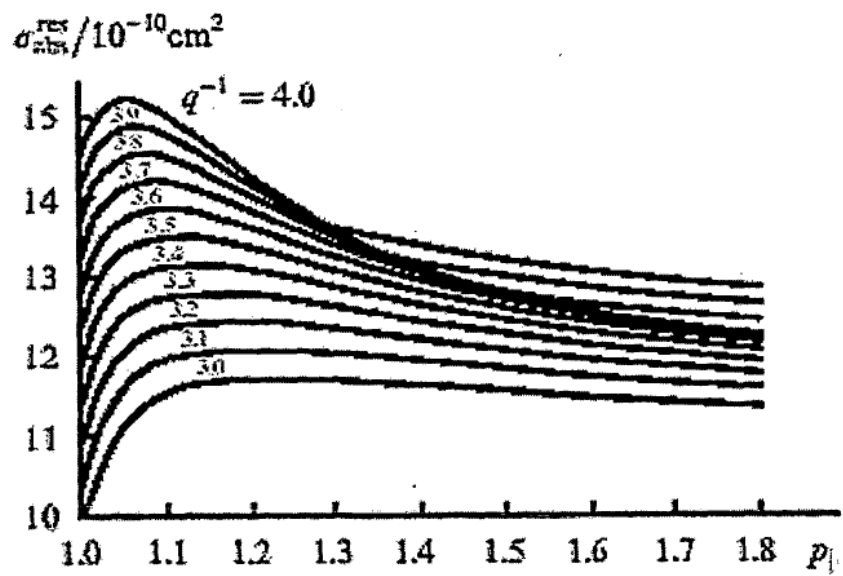


Fig. 6

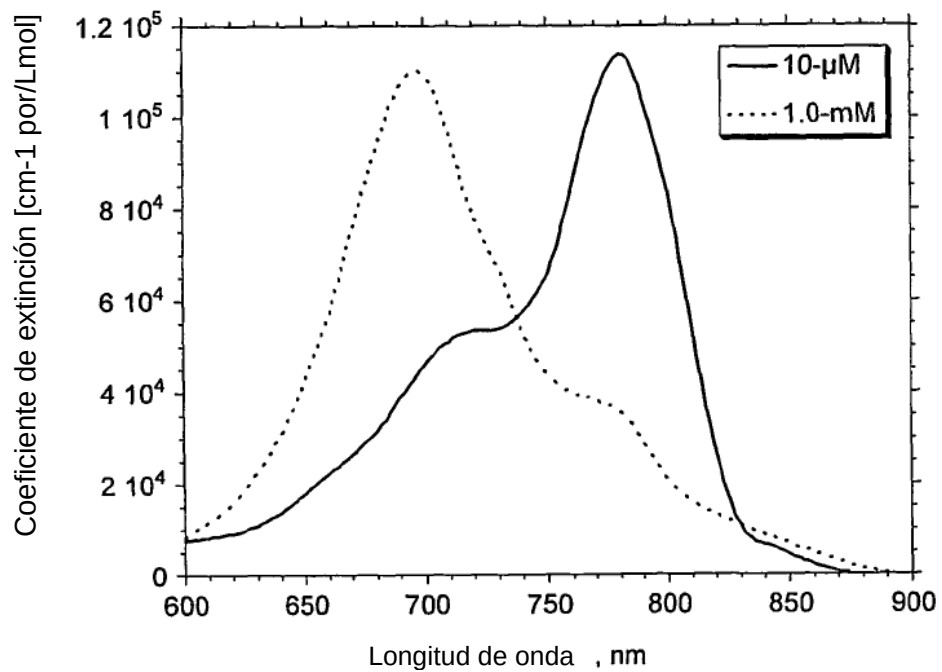


Fig. 7A

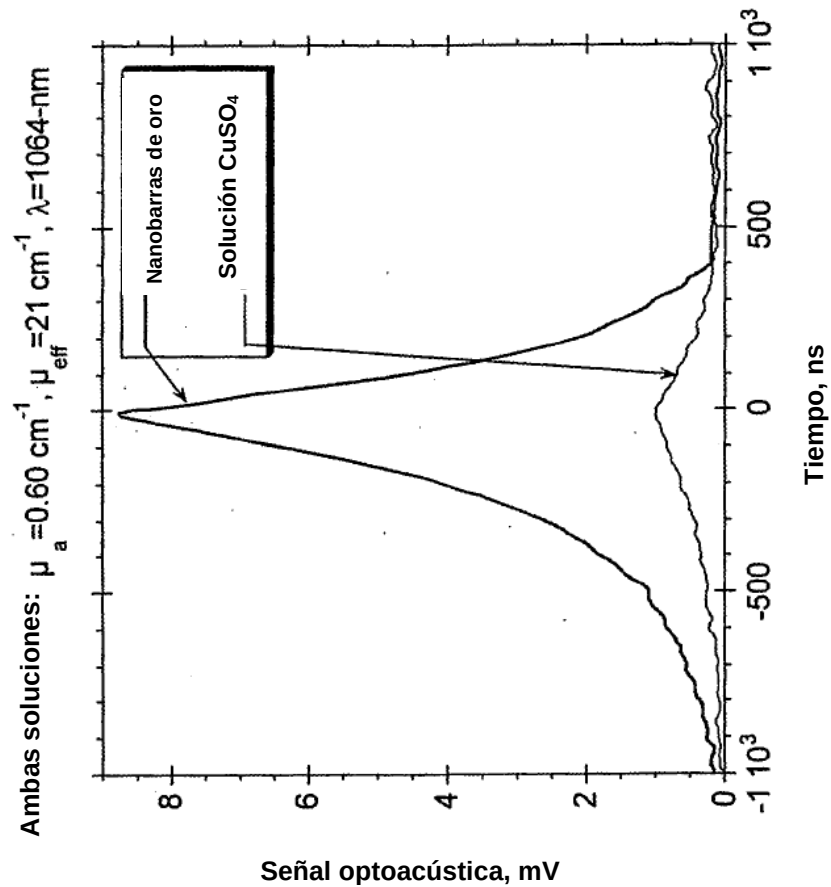


Fig. 7B

OA – Imagen nanobarras de oro frente a CuSO₄

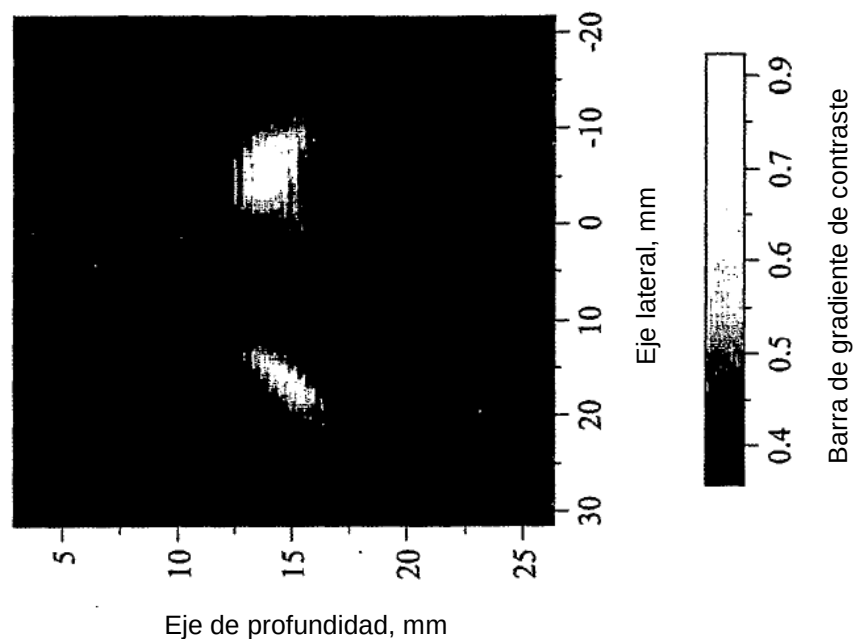


Fig. 8a

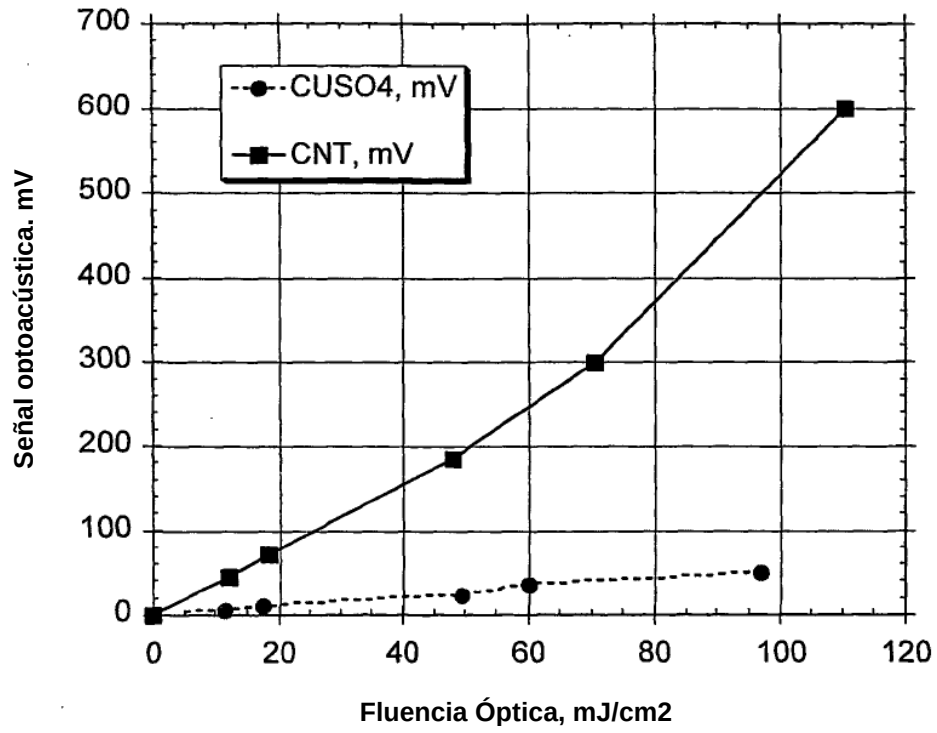


Fig. 8b

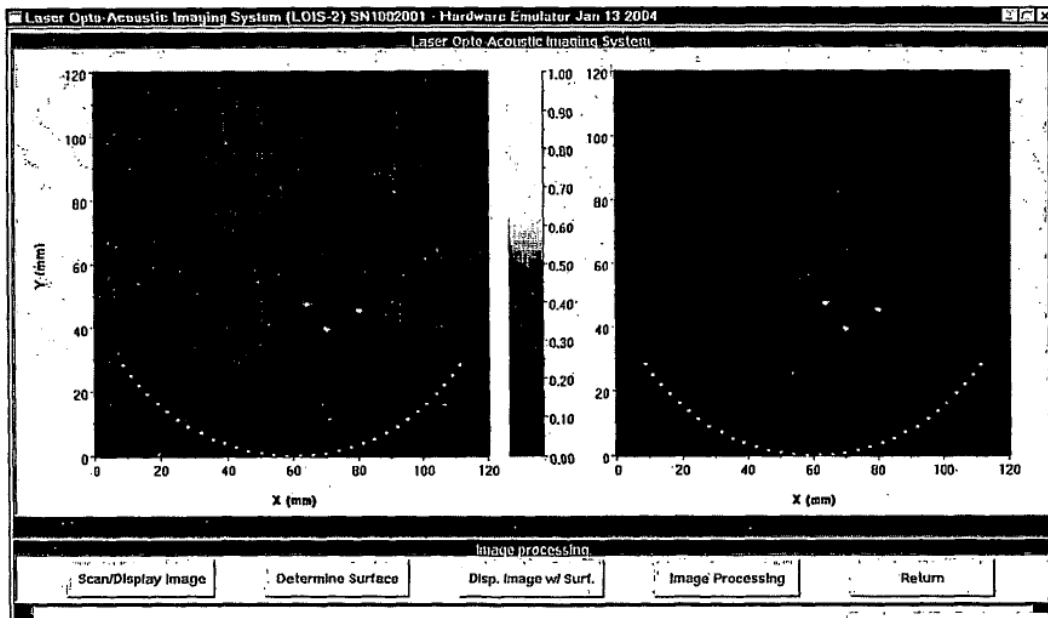


Fig. 9A

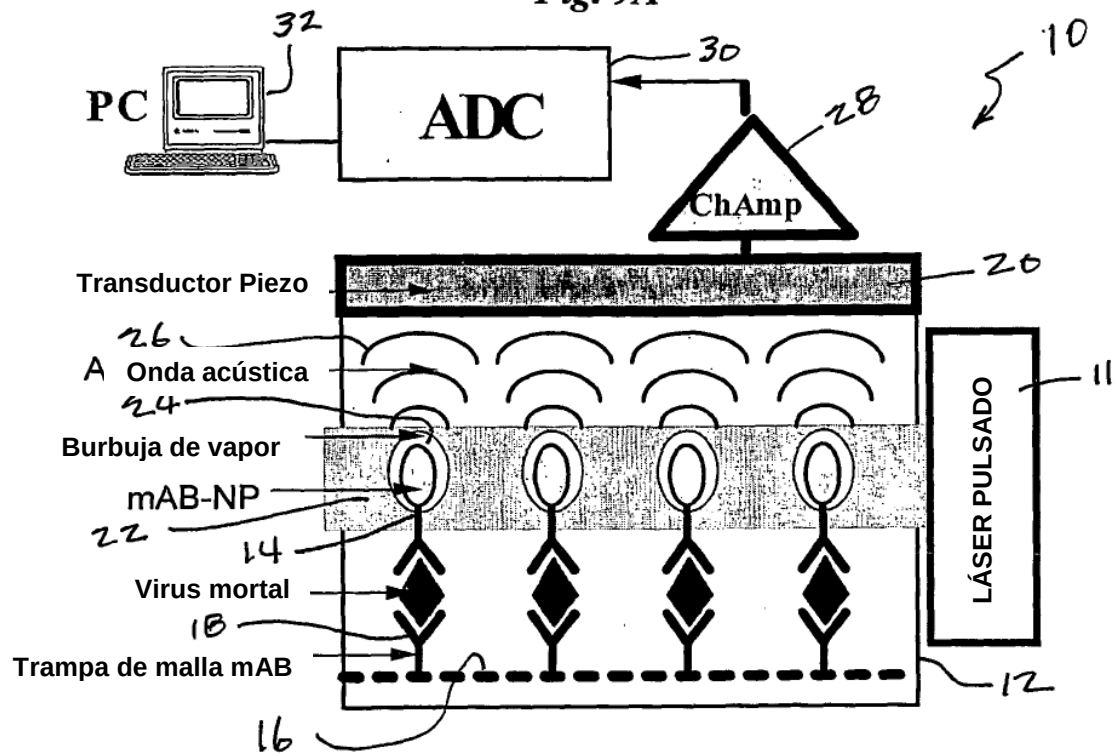


Fig. 9B

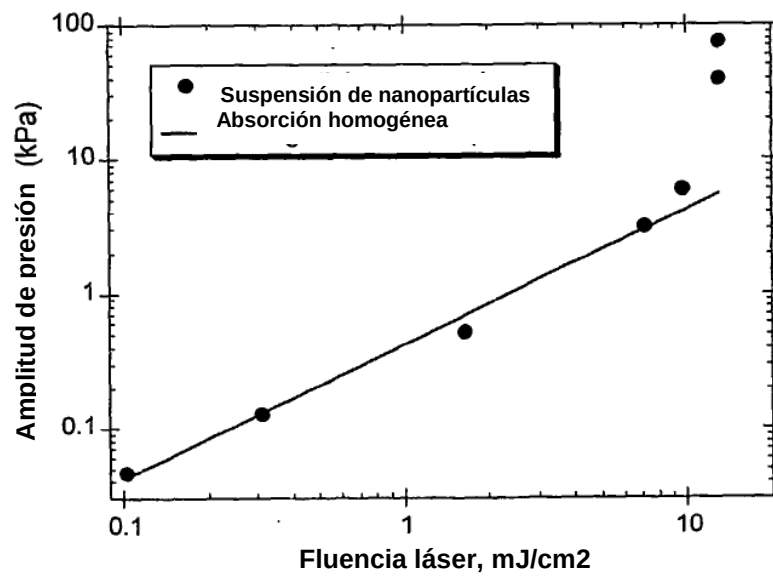


Fig. 10A

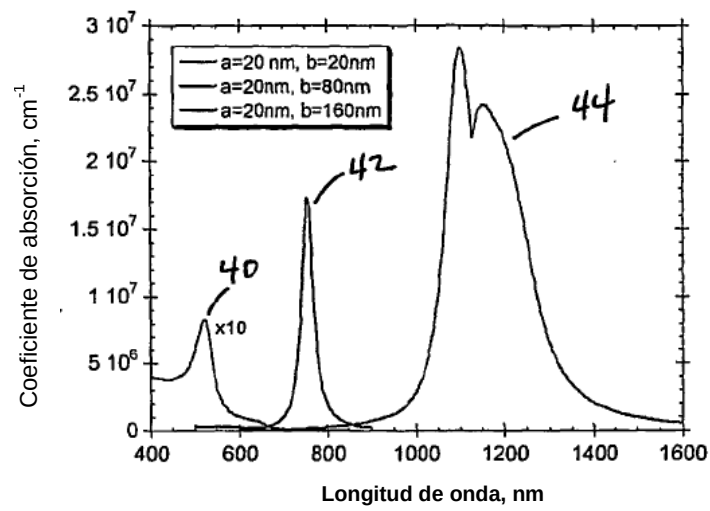


Fig. 10B

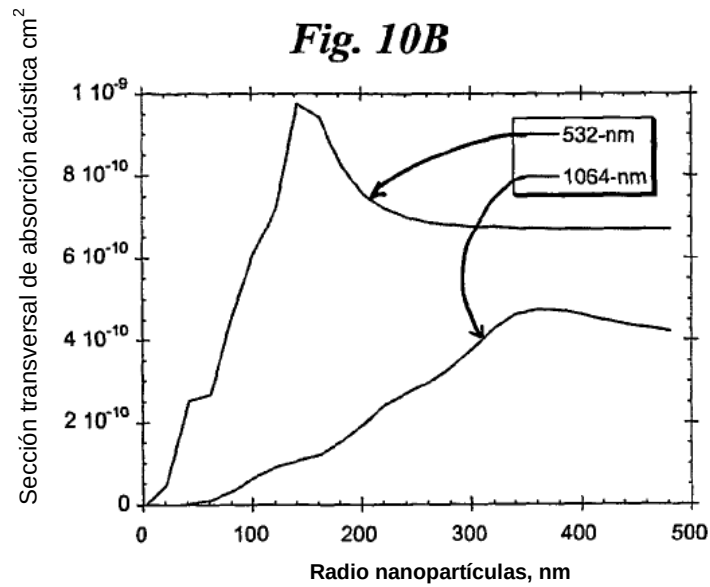


Fig. 10C

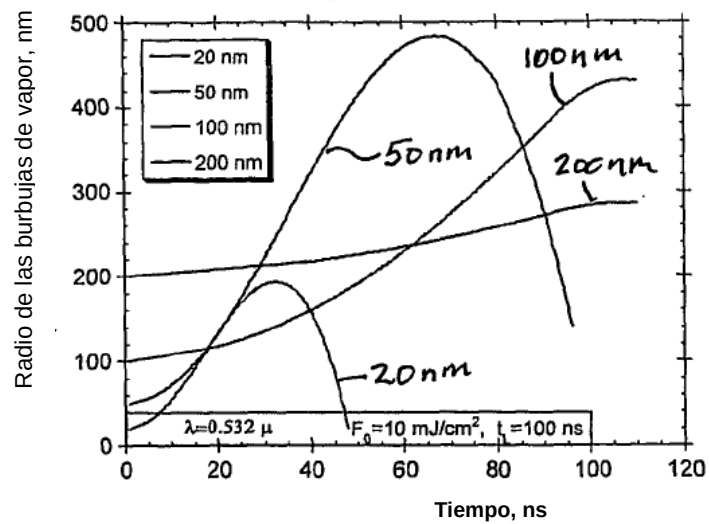


Fig. 11A

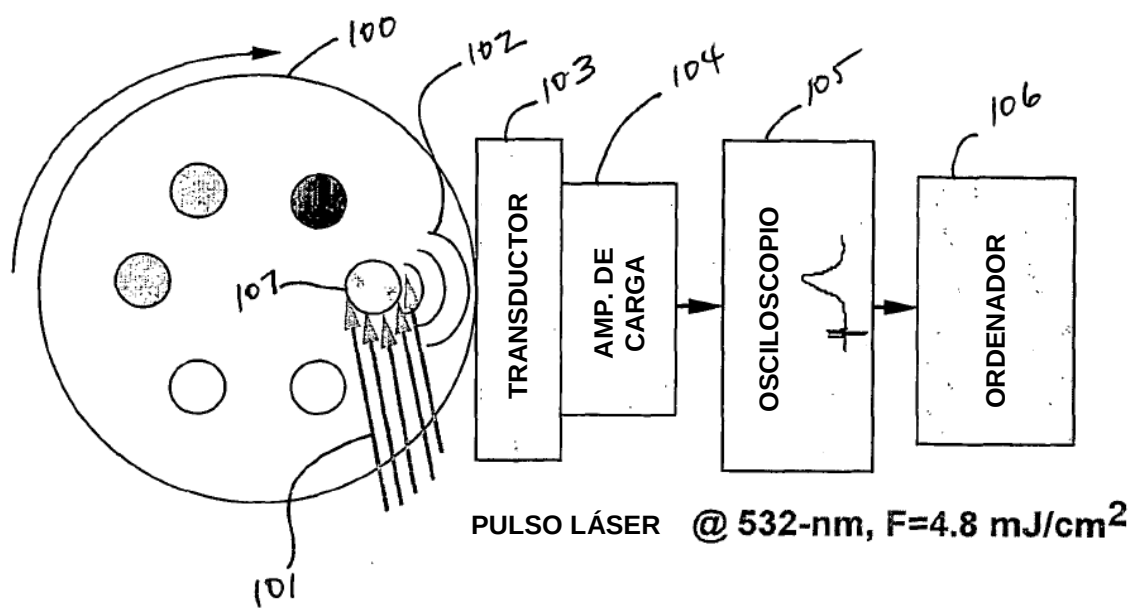


Fig. 11B

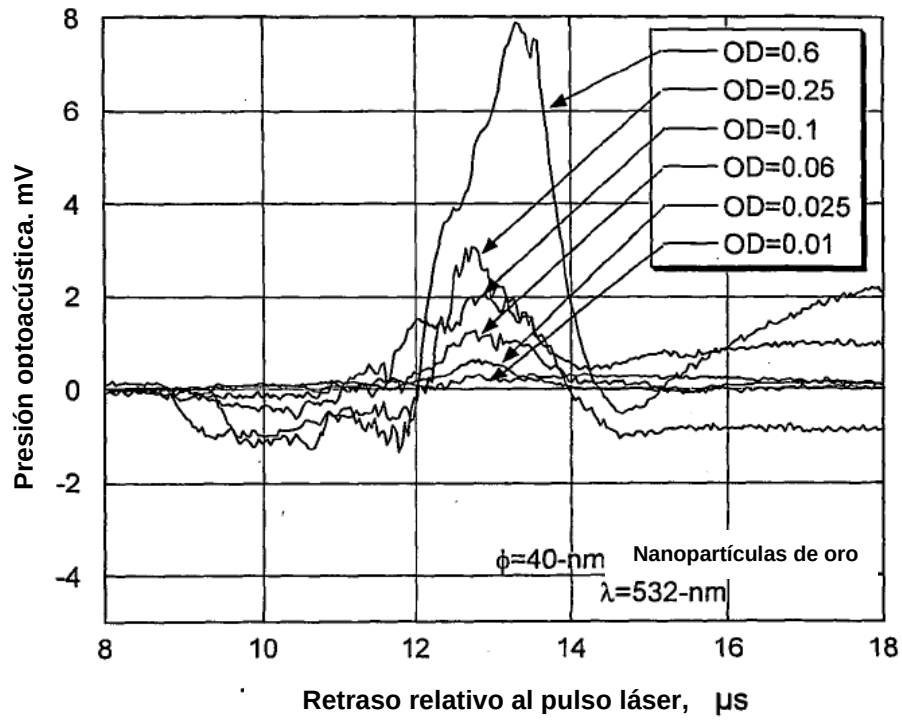


Fig. 11C

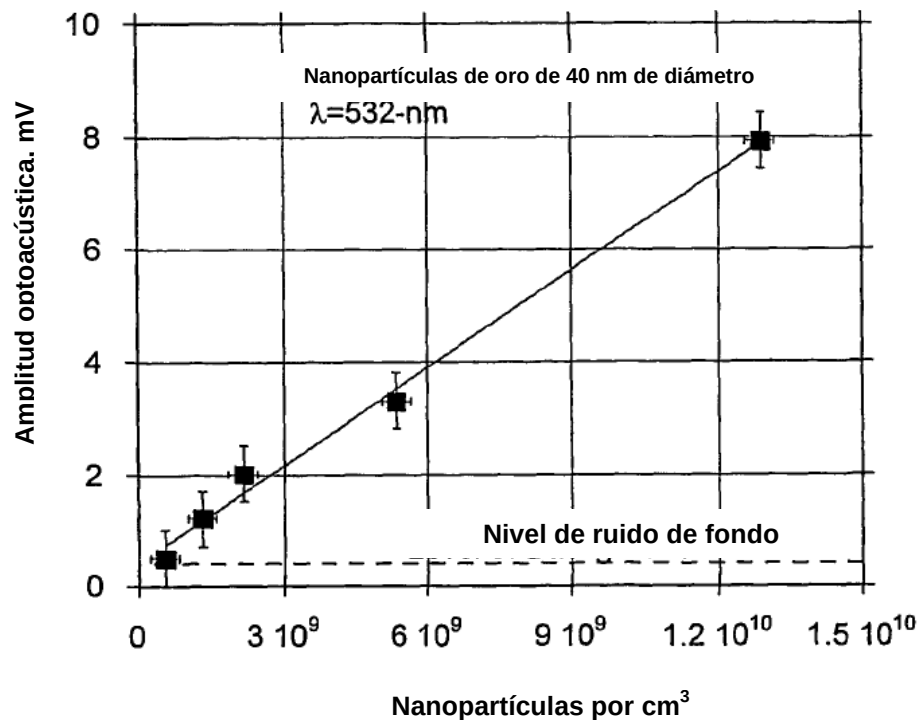


Fig. 12A

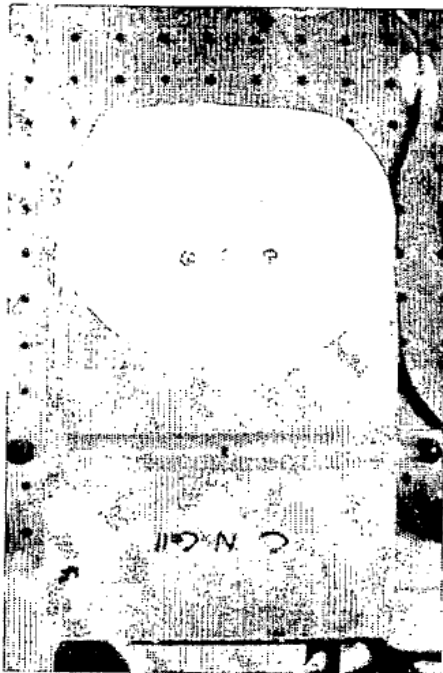


Fig. 12B

