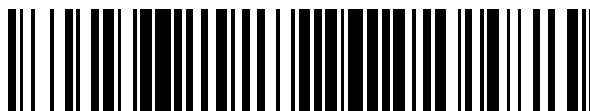


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 235**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/48** (2006.01)

**A61K 49/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2004 E 12167788 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2013 EP 2486944**

54 Título: **Nanopartículas magnéticas**

30 Prioridad:

**09.06.2003 GB 0313259**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**03.02.2014**

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (50.0%)  
C/ Serrano 117  
28006 Madrid, ES y  
MIDATECH LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PENADES, SOLEDAD;  
MARTIN-LOMAS, M;  
MARTINES DE LA FUENTE, JESÚS y  
RADEMACHER, THOMAS WILLIAM**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 441 235 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Nanopartículas magnéticas

5 **Campo de la invención**

10 **[0001]** La presente invención se refiere a nanopartículas magnéticas, y en particular a nanopartículas magnéticas que tienen ligandos inmovilizados y a su uso en el estudio de la interacción de estos ligandos con otras especies. La presente invención se refiere además a aplicaciones de las nanopartículas, por ejemplo, para cribado, diagnóstico y terapia.

**Antecedentes de la invención**

15 **[0002]** El desarrollo de metodologías para producir nanopartículas con propiedades biosensibles ha abierto el camino para producir herramientas útiles para los diagnósticos moleculares, la terapéutica y la biotecnología [1]. Las nanopartículas coloidales metálicas, semiconductoras y magnéticas son actualmente objeto de un intenso estudio para posibles aplicaciones [2].

20 **[0003]** Se han fabricado nanopartículas que contienen materiales paramagnéticos tales como óxido de hierro que presentan propiedades magnéticas excepcionalmente fuertes bajo campos magnéticos externos. Estas nanopartículas magnéticas pueden usarse en muchas aplicaciones biomédicas que incluyen separación de células, marcado de células y de tejidos *in vivo*, mejora del contraste en la obtención de imágenes de resonancia magnética, elección de tumores como diana, terapias de hipertermia y administración de fármacos.

25 **[0004]** Para tales aplicaciones, las nanopartículas deberán ser preferiblemente suficientemente pequeñas para evitar provocar una respuesta inmunitaria y ser captadas por células, si es necesario. También es útil si el tamaño de las partículas puede controlarse, ya que las partículas deberán ser de aproximadamente el mismo tamaño de forma que muestren las mismas propiedades magnéticas. Las partículas también deberán ser preferiblemente químicamente estables de forma que no sean descompuestas por el cuerpo.

30 **[0005]** También se prefiere que las nanopartículas magnéticas para uso en biomedicina sean solubles, especialmente en agua, con el fin de que puedan almacenarse y administrarse eficazmente. Idealmente, tales partículas serían estables en disolución y no se agregarían, tanto cuando se almacenaran antes de uso como en el cuerpo. Las nanopartículas magnéticas tienden a aglutinarse juntas en disolución debido a que se atraen entre sí. Si esto ocurriera en el cuerpo, obstaculizaría la circulación sanguínea y posiblemente sería peligroso; en disolución coloidal harían que el coloide fuera difícil de usar.

35 **[0006]** Previamente, las partículas de óxido de hierro comercialmente disponibles se han usado en clasificación y separación de células [3]. Las nanopartículas magnéticas monodispersas de Fe/Pt [4], Co y Co/Fe [5], Fe [6] y óxidos de hierro [7] se han sintetizado recientemente por química de disolución para aplicaciones en materiales [8]. También se han descrito nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con dextrano reticulado para evitar la aglutinización, véase por ejemplo el documento WO 03/005029.

40 **[0007]** Idealmente, las nanopartículas magnéticas están fabricadas de metal magnético elemental en vez de óxido metálico ya que el metal elemental es un mejor potenciador de la obtención de imágenes magnéticas. Sin embargo, tales nanopartículas son frecuentemente químicamente inestables, ya que el metal puede oxidarse. Una posibilidad para aumentar la estabilidad química de las nanopartículas magnéticas es sintetizarlas a partir de un metal magnético con un metal pasivo para estabilizar el metal magnético.

45 **[0008]** El documento US 2002/0068187 desvela nanopartículas con núcleo-envoltura de oro-hierro protegidas con tensioactivo sintetizadas por medio de micelas inversas. Sin embargo, este procedimiento es complejo, requiriendo tres etapas de síntesis. La composición multicapa de las partículas resultantes también aumenta el límite de tamaño inferior para las partículas, que puede ser una desventaja si se requieren partículas muy pequeñas [14].

50 **[0009]** La patente de EE.UU. nº: 6.254.662 da a conocer el uso de nanopartículas de aleaciones de FePt y CoPt para formar finas películas nanocristalinas sobre una superficie sólida para uso en la fabricación de medios de grabación de densidad ultra-alta. Otros usos de las películas se mencionan en la patente, que incluyen el uso como películas de polarización magnética y puntas magnéticas para microscopía de fuerza magnética, pero no se prevén aplicaciones biomédicas.

55 **[0010]** Para muchas de las aplicaciones descritas anteriormente es necesario ligar las nanopartículas a moléculas biológicamente activas tales como ligandos que se unen a moléculas intracelulares o extracelulares. Tales ligandos pueden ser, por ejemplo, carbohidrato, ácido nucleico o proteína.

5 [0011] La patente de EE.UU. nº: 6.514.481 desvela nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con una envoltura de sílice en las que la envoltura está unida a una molécula que elige diana tal como un péptido mediante una molécula espaciadora. Los documentos WO 02/098364 y WO 01/19405 desvelan nanopartículas magnéticas de óxido metálico recubiertas con dextrano y funcionalizadas con péptidos y oligonucleótidos. Se han usado estrategias similares para preparar nanopartículas para el mercado intracelular [9] y como nanosensores [10]. Todos estos procedimientos son procedimientos de múltiples etapas que requieren mucho tiempo que requieren que las nanopartículas se recubran con dextrano o sílice, que las nanopartículas recubiertas se funcionalicen de forma que se unan al ligando, y finalmente que el ligando se una a las nanopartículas.

10 [0012] El documento WO 03/073444 desvela nanopartículas superparamagnéticas que tienen un núcleo formado de átomos de los metales Au y Fe en una relación de al menos 3:7. La solicitud dice que los ligandos pueden ligarse al núcleo mediante un grupo sulfuro y que las nanopartículas se usan para formar dispositivos nanoelectrónicos. Los núcleos de las nanopartículas tienen diámetros en el intervalo de 5 nm a 50 nm.

15 [0013] El documento WO 02/093140 desvela nanoalambres magnéticos que comprenden uno o más segmentos y grupos funcionales o ligandos asociados a al menos uno de dichos segmentos. Los nanoalambres tienen un diámetro en el intervalo de aproximadamente 10-300 nm y una longitud de 10 nm a decenas de micrómetros. Los segmentos de los nanoalambres pueden formarse a partir de materiales tales como oro, plata, platino, cobre, hierro y cobalto en forma pura o aleada y los grupos funcionales pueden ser átomos o grupos de átomos que pueden tener más reactividad química tal como reaccionar con un ligando para unir el ligando al alambre, o para unirse a una molécula diana. Aunque se propone una variedad de posibles formas de asociar los ligandos y los nanoalambres, los ejemplos se basan en la interacción iónica entre ligandos que contienen grupos ácido carboxílico y el nanoalambre.

25 [0014] La patente de EE.UU. nº: 6.531.304 desvela un coloide a escala nanométrica formado a partir de aleaciones metálicas que se hace reaccionar y se une no covalentemente a un "modificador" de polisacárido o de azúcar.

30 [0015] El documento WO 02/32404 desvela nano-herramientas solubles en agua para estudiar interacciones mediadas por carbohidratos [11], [12]. Estas herramientas son gliconopartículas de oro y gliconopuntos de sulfuro de cadmio que incorporan antígenos de carbohidrato. Estos nanopuntos de oro y semiconductores solubles en agua son estables durante meses en disoluciones fisiológicas y presentan tamaños de núcleo excepcionalmente pequeños. Son resistentes a glicosidasas y no presentan citotoxicidad. También son plataformas útiles para estudios básicos de interacciones de carbohidratos [13] y son herramientas para aplicaciones biotecnológicas y biomédicas. Sin embargo, estas nanopartículas no son magnéticas.

40 [0016] Por tanto, hay una necesidad continua en la materia de nanopartículas magnéticas estables que estén unidas a ligandos para hacerlas adecuadas para usos biomédicos que pueden sintetizarse a un tamaño deseado, y que pueden producirse mediante un procedimiento de síntesis fidedigno simple.

### Características de la invención

45 [0017] En líneas generales, la presente invención proporciona composiciones que comprenden nanopartículas magnéticas tal como se definen en las reivindicaciones, para utilizar tal como se definen en las reivindicaciones. En particular, la presente invención proporciona nanopartículas magnéticas tal como se definen en las reivindicaciones, para utilizar tal como se definen en las reivindicaciones, que se emplean como sustrato para inmovilizar un conjunto de ligandos, en las que los ligandos están covalentemente unidos al núcleo de la nanopartícula, en los que por lo menos uno de los ligandos comprende un grupo carbohidratos. Por tanto, estas nanopartículas pueden usarse para estudiar interacciones mediadas por ligando, por ejemplo, con otros carbohidratos, proteínas o ácidos nucleicos, y como agentes terapéuticos y reactivos de diagnóstico. En algunas realizaciones, las partículas tienen la ventaja adicional de que son solubles, por ejemplo, en agua y una variedad de disolventes orgánicos y pueden usarse en una variedad de formatos de aplicación homogénea.

55 [0018] Los inventores han desarrollado ahora nanopartículas magnéticas con tamaño en la escala de nanómetros que forman disoluciones acuosas coloidales estables (ferrofluidos). Los procedimientos descritos en este documento constituyen una estrategia simple y versátil por la cual neoglicoconjugados de carbohidratos significativos se ligan covalentemente a agrupaciones de oro/hierro como procedimiento para confeccionar gliconopartículas magnéticas estables solubles en agua con formas globulares y superficies de carbohidrato altamente polivalentes. La metodología también permite la unión de muchas otras moléculas directamente a la nanoagrupación.

60 [0019] Por consiguiente, el presente documento proporciona una partícula que comprende un núcleo magnético, tal como un núcleo metálico, unido a un conjunto de ligandos. Los ligandos pueden comprender grupos carbohidrato, péptidos, dominios de proteína, segmentos de ácidos nucleicos u otras macromoléculas biológicas. Los ligandos pueden comprender adicionalmente o alternativamente grupos fluorescentes.

5 [0020] Preferiblemente, cuando el núcleo magnético comprende átomos de metales pasivos y átomos de metales magnéticos, la proporción de átomos de metales pasivos con respecto a átomos de metales magnéticos en el núcleo está entre aproximadamente 5:0,1 y aproximadamente 2:5. Más preferiblemente, la proporción está entre aproximadamente 5:0,1 y aproximadamente 5:1.

[0021] Como se usa en este documento, el término "metal pasivo" se refiere a metales que no muestran propiedades magnéticas y son químicamente estables a la oxidación.

10 [0022] Los metales pasivos de la invención pueden ser diamagnéticos. "Diamagnético" se refiere a materiales con todos los electrones apareados que, por tanto, no tienen momento magnético neto permanente por átomo. Los materiales "magnéticos" tienen algunos electrones sin aparear y son positivamente susceptibles a campos magnéticos externos - es decir, el campo magnético externo induce a los electrones para que se alineen con el campo aplicado, de forma que los momentos magnéticos de los electrones están alineados.

15 [0023] Los materiales magnéticos pueden ser paramagnéticos, superparamagnéticos o ferromagnéticos. Los materiales paramagnéticos no son muy susceptibles a campos magnéticos externos y no conservan sus propiedades magnéticas cuando se quita el campo magnético externo. Los materiales ferromagnéticos son altamente susceptibles a campos magnéticos externos y contienen dominios magnéticos incluso cuando no está presente ningún campo magnético externo debido a que los átomos vecinos cooperan de forma que sus espines electrónicos sean paralelos. Los campos magnéticos externos alinean los momentos magnéticos de dominios vecinos, amplificando el efecto magnético. Partículas muy pequeñas de materiales que normalmente tienen propiedades ferromagnéticas no son ferromagnéticas, ya que el efecto de colaboración no se produce en partículas de 300 nm o menos, de forma que el material no tiene magnetismo permanente. Sin embargo, las partículas todavía son muy susceptibles a campos magnéticos externos y tienen fuertes propiedades paramagnéticas, y se conocen como superparamagnéticas. Preferiblemente, las nanopartículas de la invención son superparamagnéticas.

20 [0024] En una realización, la nanopartícula consiste en un núcleo que comprende átomos de metal pasivo y átomos de metal magnético, cuyo núcleo está unido covalentemente a un conjunto de ligandos. Preferiblemente, la proporción de átomos de metales pasivos con respecto a los átomos de metales magnéticos en el núcleo está ente aproximadamente 5:0,1 y aproximadamente 2:5. Más preferiblemente, la proporción está entre aproximadamente 5:0,1 y aproximadamente 5:1.

25 [0025] En un aspecto adicional, la presente memoria proporciona composiciones que comprenden poblaciones de una o más de las partículas anteriormente definidas. En algunas realizaciones, las poblaciones de nanopartículas pueden tener diferentes densidades de ligandos iguales o diferentes unidos al núcleo.

30 [0026] En un aspecto adicional, la presente memoria proporciona las partículas anteriormente definidas para uso en un método de tratamiento médico.

35 [0027] En un aspecto adicional, la presente memoria proporciona el uso de las partículas anteriormente definidas para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección mejorada mediante la administración del ligando. A modo de ejemplo, esto puede producirse cuando el ligando bloquea una interacción mediada por carbohidratos que de otro modo tendería a conducir a una patología.

40 [0028] Esta realización de la presente memoria tiene ventajas con respecto a las estrategias de la técnica anterior para tratar afecciones que implican interacciones mediadas por carbohidratos. Como se ha descrito anteriormente, normalmente las interacciones son polivalentes, mientras que el agente usado para tratar las interacciones sólo puede modular frecuentemente una o algunas de estas interacciones. Esto tiene como resultado que es difícil administrar un agente al sitio de la interacción que pueda modular de forma fidedigna la interacción para el efecto terapéutico deseado. A diferencia de este problema, la presente memoria proporciona agentes que tienen un conjunto de ligandos para modular las interacciones mediadas por carbohidratos, superándose posiblemente la dificultad para modular las interacciones polivalentes.

45 [0029] En realizaciones preferidas, el diámetro medio del núcleo, preferiblemente el núcleo metálico, está entre 0,5 y 100 nm, más preferiblemente entre 1 y 50 nm, más preferiblemente entre 1 y 20 nm. Más preferiblemente, el diámetro medio del núcleo es inferior a 5 nm, más preferiblemente inferior a 2,5 nm, y todavía más preferiblemente inferior a 2 nm. El diámetro medio puede medirse usando técnicas muy conocidas en el sector, tales como microscopía electrónica de transmisión.

50 [0030] El material del núcleo puede ser un metal (por ejemplo, Au, u otro átomo de metal pasivo) o puede estar formado de más de un tipo de átomo. Preferiblemente, el material del núcleo es un material compuesto o una aleación de un metal pasivo y un metal magnético. Los metales pasivos preferidos son Au, Ag, Pt o Cu y los metales magnéticos preferidos son Fe y Co, siendo el material compuesto más preferido Au/Fe. También pueden usarse

5 otros materiales compuestos o aleaciones. Los núcleos de nanopartículas también pueden formarse a partir de aleaciones que incluyen Au/Fe, Au/Cu, Au/Gd, Au/Zn, Au/Fe/Cu, Au/Fe/Gd y Au/Fe/Cu/Gd, y pueden usarse. Los materiales del núcleo preferidos son Au y Fe, siendo el material más preferido Au. Los núcleos de las nanopartículas comprenden preferiblemente entre 100 y 500 átomos (por ejemplo, átomos de oro), más preferiblemente entre 20 y 500 átomos, y todavía más preferiblemente entre aproximadamente 50 y 500 átomos, para proporcionar diámetros de núcleo en el intervalo de nanómetros. Otro ejemplo preferido de nanopartículas de la presente invención tiene núcleos formados a partir de átomos de Au y Gd, por ejemplo, Gd III, por ejemplo, que tiene un diámetro medio inferior a 10 nm, más preferiblemente inferior a 5 nm y lo más preferiblemente 2,5 nm. Las partículas preferidas de este tipo comprenden aproximadamente el 1-20% de átomos de Gd y del 99 al 80% de átomos de Au, y más preferiblemente aproximadamente el 1-10% de Gd y del 99 al 90% de Au, en base a la relación de la proporción de átomos de metales respectivos presentes en el núcleo de la nanopartícula.

15 **[0031]** Para algunas aplicaciones, los materiales del núcleo están dopados o marcados con uno o más átomos que son activos para RMN, permitiendo que las nanopartículas se detecten usando RMN, tanto *in vitro* como *in vivo*. Ejemplos de átomos activos para RMN incluyen  $Mn^{+2}$ ,  $Gd^{+3}$ ,  $Eu^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $V^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$  y lantánidos<sup>+3</sup>, o los puntos cuánticos descritos en otro sitio en la presente solicitud.

20 **[0032]** Pueden detectarse núcleos de nanopartículas que comprenden átomos semiconductores ya que los cristales semiconductores a escala nanométrica son capaces de actuar como puntos cuánticos, es decir, pueden absorber luz, excitando así electrones en los materiales hasta niveles de energía superior, liberando posteriormente fotones de luz a frecuencias características del material. Un ejemplo de un material del núcleo semiconductor es seleniuro de cadmio, sulfuro de cadmio, telururo de cadmio. También se incluyen compuestos de cinc, tales como sulfuro de cinc.

25 **[0033]** En algunas realizaciones, la nanopartícula de la presente memoria o el ligando o ligandos pueden comprender un marcador detectable. El marcador puede ser un elemento del núcleo de la nanopartícula o el ligando. El marcador puede ser detectable debido a una propiedad intrínseca de ese elemento de la nanopartícula o por estar unida, conjugada o asociada a otro grupo que es detectable. Los ejemplos preferidos de marcadores incluyen un marcador que es un grupo fluorescente, un radionucleido, un marcador magnético o un colorante. Los grupos fluorescentes incluyen fluoresceína, rodamina o tetrametil-rodamina, Texas-Red, Cy3, Cy5, etc., y pueden detectarse mediante la excitación del marcador fluorescente y la detección de la luz emitida usando espectroscopía de dispersión Raman (Y.C. Cao, R. Jin, C. A. Mirkin, Science 2002, 297: 1536-1539).

35 **[0034]** En algunas realizaciones, las nanopartículas pueden comprender un radionucleido para uso en la detección de la nanopartícula usando la radiactividad emitida por el radionucleido, por ejemplo, usando PET o SPECT, o para terapia, es decir, para destruir células diana. Ejemplos de radionucleidos usados habitualmente en la técnica que podrían adaptarse fácilmente para uso en la presente memoria incluyen  $^{99m}Tc$ , que existe en una variedad de estados de oxidación, aunque el más estable es  $TcO^{4-}$ ;  $^{32}P$  o  $^{33}P$ ;  $^{57}Co$ ;  $^{59}Fe$ ;  $^{67}Cu$  que se usa frecuentemente como sales de  $Cu^{2+}$ ;  $^{67}Ga$  que se usa habitualmente como una sal de  $Ga^{3+}$ , por ejemplo, citrato de galio;  $^{68}Ge$ ;  $^{82}Sr$ ;  $^{99}Mo$ ;  $^{103}Pd$ ;  $^{111}In$  que se usa generalmente como sales de  $In^{3+}$ ;  $^{125}I$  o  $^{131}I$  que se usa generalmente como yoduro de sodio;  $^{137}Cs$ ;  $^{153}Gd$ ;  $^{153}Sm$ ;  $^{158}Au$ ;  $^{186}Re$ ;  $^{201}Tl$  generalmente usado como una sal de  $Tl^{+}$ , tal como cloruro de talio;  $^{39}Y^{3+}$ ;  $^{71}Lu^{3+}$ ; y  $^{24}Cr^{2+}$ . El uso general de radionucleidos como marcadores y trazadores es muy conocido en la técnica y podría adaptarse fácilmente por el experto en la materia para uso en los aspectos de la presente memoria. Los radionucleidos pueden emplearse más fácilmente dopando los núcleos de las nanopartículas o incluyéndolas como marcadores presentes como parte de ligandos inmovilizados sobre las nanopartículas.

45 **[0035]** Las nanopartículas magnéticas previamente descritas para aplicaciones biológicas se fabrican casi siempre a partir de un óxido metálico magnético, normalmente óxido de hierro (magnetita). Se han fabricado nanopartículas que comprenden Fe y Au, como se ha descrito anteriormente, pero no se han usado para aplicaciones biológicas ni se han unido a moléculas biológicamente activas. Estas nanopartículas se sintetizan como una "nano-cebolla" que comprende un núcleo de oro rodeado por una envoltura de hierro que está recubierta de oro para evitar la oxidación. Las nanopartículas descritas en este documento, que tienen un núcleo heterogéneo que comprende tanto átomos de oro como de hierro, son una mejora con respecto a las partículas previamente descritas debido a que pueden sintetizarse en una única etapa simple, en vez de requerir múltiples etapas de síntesis para formar las diferentes envolturas de la nano-cebolla.

55 **[0036]** Las nanopartículas y los resultados de sus interacciones pueden detectarse usando varias técnicas muy conocidas en el sector. Estas pueden variar desde la detección de la agregación que resulta cuando las nanopartículas se unen a otra especie, por ejemplo, mediante simple inspección visual, o usando dispersión de la luz (transmitancia de una disolución que contiene las nanopartículas), hasta usar sofisticadas técnicas, tales como microscopía electrónica de transmisión (TEM) o microscopía de fuerza atómica (AFM) para visualizar las nanopartículas. Otro procedimiento de detección de partículas metálicas es emplear resonancia de plasmones, es decir, la excitación de electrones en la superficie de un metal, normalmente producido por radiación óptica. El fenómeno de la resonancia de plasmones superficiales (SPR) existe en la superficie de separación de un metal (tal como Ag o Au) y un material dieléctrico, tal como aire o agua. Dado que se producen cambios en la SPR a medida

que los analitos se unen al ligando inmovilizado sobre la superficie de una nanopartícula, cambia el índice de refracción de la superficie de separación. Otra ventaja de la SPR es que puede usarse para monitorizar interacciones en tiempo real. Como se menciona anteriormente, si las nanopartículas incluyen o están dopadas con átomos que son activos para RMN, entonces esta técnica puede usarse para detectar las partículas, tanto *in vitro* como *in vivo*, usando técnicas muy conocidas en el sector. Las nanopartículas también pueden detectarse como se describe en [18] usando un sistema basado en la amplificación de señales cuantitativas usando la reducción promovida por nanopartículas de plata (I) y usando un escáner de sobremesa como lector. La espectroscopía de fluorescencia puede usarse si las nanopartículas incluyen ligandos que combinan grupos carbohidratos y sondas fluorescentes. Por tanto, puede usarse el marcaje isotópico del carbohidrato para facilitar su detección.

**[0037]** El ligando unido al núcleo puede comprender uno o más grupos carbohidratos (sacáridos), por ejemplo, que comprende un grupo polisacárido, un oligosacárido o un sacárido individual tal como se define en las reivindicaciones. El ligando también puede ser un glicanoconjugado, tal como un glicolípido o una glicoproteína. Además del grupo carbohidrato, el ligando puede comprender adicionalmente uno o más de un grupo péptido, un dominio de proteína, una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un segmento de ADN, una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla o doble, una molécula de ARN de cadena sencilla o doble, una molécula de ARN que tiene de 17 a 30 ribonucleótidos, por ejemplo, un ligando siARN o miARN) y/o una sonda fluorescente.

**[0038]** En otra realización, el ligando puede ser un péptido o una proteína. Éstos pueden ser péptidos que se unen a receptores en una célula o pueden ser anticuerpos o proteínas terapéuticas.

**[0039]** En una realización adicional, el ligando puede ser una molécula de ácido nucleico. El ácido nucleico puede ser una sonda de oligonucleótido que se une a una secuencia en la célula. Alternativamente, el ácido nucleico puede comprender una secuencia génica codificante para la liberación a una célula.

**[0040]** Las partículas pueden tener más de una especie de ligando inmovilizado sobre ellas, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 10, 20 ó 100 ligandos diferentes. Alternativamente o adicionalmente pueden emplearse juntos un conjunto de diferentes tipos de partículas. Los ligandos con múltiples sitios de unión pueden ligarse a un conjunto de núcleos de nanopartículas, por ejemplo 2, 3 ó 4 partículas. Un ejemplo de esto serían núcleos de nanopartículas unidos a los extremos de polipéptidos o moléculas de ácidos nucleicos.

**[0041]** En realizaciones preferidas, el número medio de ligandos unidos a un núcleo metálico individual de la partícula es al menos 20 ligandos, más preferiblemente al menos 50 ligandos, y lo más preferiblemente 60 ligandos.

**[0042]** Preferiblemente, los ligandos están unidos covalentemente al núcleo de las partículas tal como se define en las reivindicaciones. Los protocolos para llevar a cabo esto se conocen en la técnica, aunque el trabajo descrito en este documento es el primer informe de las reacciones que se usan para unir covalentemente ligandos al núcleo de la partícula.

**[0043]** Esto puede llevarse a cabo haciendo reaccionar ligandos con grupos terminales reductores con oro y hierro bajo condiciones reductoras. Un procedimiento preferido de producción de las partículas emplea grupos de carbohidratos derivatizados con tiol para acoplar los ligandos a partículas. Por tanto, en un aspecto, la presente memoria proporciona un procedimiento de preparación de las partículas anteriormente definidas, por ejemplo, que tienen un núcleo que comprende oro u oro y hierro, cuyo núcleo está covalentemente unido a un conjunto de ligandos, comprendiendo el procedimiento:

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

(b) hacer reaccionar el ligando derivatizado de sulfuro con  $\text{HAuCl}_4$  (ácido tetracloroáurico), y opcionalmente con una sal férrica en la que están presentes átomos de hierro en el núcleo, en presencia de un agente reductor para producir las partículas.

**[0044]** Una sal de hierro preferida es  $\text{FeCl}_3$ .

**[0045]** En algunas realizaciones, el ligando se derivatiza con un enlazador. Preferiblemente, el enlazador es un enlazador de disulfuro, por ejemplo, un enlazador de disulfuro mixto. El enlazador puede comprender adicionalmente en la cadena grupos etileno, grupos peptídicos o aminoácidos, grupos polinucleótidos o nucleótidos.

**[0046]** Un grupo enlazador a modo de ejemplo se representa por la fórmula general  $\text{HO}-(\text{CH}_2)_n-\text{S}-\text{S}-(\text{CH}_2)_m-\text{OH}$  en la que  $n$  y  $m$  son independientemente número enteros entre 1 y 5. El ligando puede ligarse convenientemente al espaciador mediante un grupo adecuado, y en el caso de los enlazadores de disulfuro mixtos preferidos mediante uno de los enlazadores de grupos hidroxilo terminales. Si se sintetizan las nanopartículas, el -S-S- del enlazador se disocia para formar dos enlazadores tio que pueden cada uno unirse covalentemente al núcleo de la nanopartícula mediante un grupo -S-. Por tanto, en una realización preferida, el ligando se derivatiza como un disulfuro protegido. Convenientemente, el ligando protegido de disulfuro en metanol o agua puede añadirse a una disolución acuosa de

ácido tetracloroáurico. Un agente reductor preferido es borohidruro de sodio. Otras características preferidas del procedimiento se describen en los ejemplos más adelante.

5 **[0047]** La presente memoria proporciona una forma de presentar una matriz esférica de ligandos que tiene ventajas con respecto a los otros tipos de matriz propuestos en la técnica anterior. En particular, las nanopartículas son solubles en la mayoría de los disolventes orgánicos y especialmente agua. Esto puede usarse en su purificación y, lo que es más importante, significa que pueden usarse en disolución para presentar el ligando inmovilizado sobre la superficie de la partícula. El hecho de que las nanopartículas sean solubles tiene la ventaja de presentar los ligandos en una conformación natural. Para aplicaciones terapéuticas, las nanopartículas son no tóxicas, solubles y estable  
10 bajo condiciones fisiológicas.

**[0048]** Las nanopartículas magnéticas en disolución forman coloides magnéticos conocidos como ferrofluidos. Los ferrofluidos tienen las propiedades fluidas de un líquido y las propiedades magnéticas de un sólido. Tienen una variedad de aplicaciones, como se describe más adelante. El principal problema encontrado con los ferrofluidos conocidos en la técnica es su falta de estabilidad: debido a que las partículas magnéticas se atraen entre sí, se aglomerarán después de un cierto tiempo. Los procedimientos previamente usados para prevenir la aglomeración incluyen recubrir las partículas con tensioactivos, reticular polímeros o polisacáridos. Si la nanopartícula va a unirse a un ligando o molécula que elige diana se requiere otra etapa de síntesis.

20 **[0049]** Las partículas de la presente memoria son altamente solubles en agua y, por tanto, son ideales para preparar ferrofluidos. Además, los ferrofluidos resultantes son extremadamente estables y pueden guardarse durante muchos meses sin agregarse. Los ferrofluidos de la invención se han guardado durante un año sin signos de agregación. Los procedimientos del presente documento permiten nanopartículas magnéticas que son estables y que ya están unidas a ligandos funcionales que van a sintetizarse en una única reacción en vez de requerir que las partículas se recubran primero y luego se unan a ligandos.  
25

**[0050]** La estabilidad puede evaluarse a ojo - una disolución coloidal sigue siendo transparente en ausencia de aglomeración, pero se vuelve opaca una vez empieza a aglomerarse. Alternativamente, la presencia de floculación puede determinarse por micrografía electrónica de transmisión (TEM), o comparando los espectros de RMN de protones de las partículas en agua deuterada con aquellos de nanopartículas recientemente preparadas. Preferiblemente, las partículas magnéticas no mostrarán signos de aglomeración durante al menos un año después de la preparación.  
30

**[0051]** En el procedimiento descrito en este documento, la formación del núcleo y el enlace covalente del ligando es un procedimiento simultáneo, de manera que la presencia del neoglicoconjugado controla la forma y el tamaño de las nanoagrupaciones. Las gliconanopartículas preparadas de esta forma tienen un núcleo menos de 2 nm de diámetro, que es más pequeño que cualquiera de las nanopartículas magnéticas conocidas en la técnica.  
35

**[0052]** El comportamiento superparamagnético se muestra a todas las temperaturas y las mediciones con el dispositivo de interferencia de cuantos superconductores (SQUID) también indican la existencia de un componente ferromagnético a temperatura ambiente. Esta propiedad magnética anómala puede ser de importancia para obtener imágenes y separaciones de células.  
40

**[0053]** Los siguientes ejemplos de aplicación para las nanopartículas magnéticas y los ferrofluidos se proporcionan a modo de ilustración y no de limitación para apoyar la amplia aplicabilidad de las tecnologías descritas en este documento.  
45

**[0054]** En un aspecto de la presente memoria, las propiedades magnéticas de las nanopartículas de la presente memoria se explotan en técnicas de separación de células que eliminan la necesidad de columnas o centrifugación. Esto permite que se obtenga rápida y fácilmente una población muy pura de células. En una realización, las nanopartículas pueden ligarse a ligandos que se unen específicamente a un receptor en la célula de interés. Las nanopartículas pueden entonces añadirse a una suspensión de células y las células unidas a partículas separarse del resto de la suspensión mediante la aplicación de un campo magnético.  
50

**[0055]** Éste es un procedimiento altamente sensible, además de eficaz, que puede usarse en muchas aplicaciones, por ejemplo, en el diagnóstico de tumores probando fluidos corporales para la presencia de células tumorales. La sensibilidad de la técnica es una gran ventaja a este respecto.  
55

**[0056]** En otro aspecto, la presente memoria proporciona un procedimiento para determinar si se produce o no una interacción con un ligando, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una o más especies de nanopartículas unidas a ligando con un componente de unión candidato y determinar si tiene lugar la unión.  
60

**[0057]** En otro aspecto, la presente memoria proporciona un procedimiento de cribado de sustancias que pueden unirse a un ligando, comprendiendo el procedimiento:

poner en contacto nanopartículas como se definen en este documento que tienen un núcleo que comprende un metal pasivo o un metal pasivo y un metal magnético, cuyo núcleo está unido covalentemente a un conjunto de ligandos, con uno o más compuestos candidatos; y  
5 detectar si los compuestos candidatos se unen al ligando.

**[0058]** Preferiblemente, la relación de átomos de metal pasivo con respecto a átomos de metal magnético en el núcleo está entre aproximadamente 5:0,1 y aproximadamente 2:5. Más preferiblemente, la relación está entre aproximadamente 5:0,1 y aproximadamente 5:1.

**[0059]** En otro aspecto, la presente memoria proporciona un procedimiento de determinación de la presencia en una muestra de una sustancia que puede unirse a un ligando, comprendiendo el procedimiento poner en contacto la muestra con nanopartículas unidas al ligando y determinar si tiene lugar la unión. El procedimiento puede usarse para determinar la presencia o la cantidad de uno o más analitos en una muestra, por ejemplo, para usar en ayudar en el diagnóstico de un estado patológico asociado a la presencia del analito. La presencia de analitos puede señalizarse mediante la formación de agregados de analito-nanopartícula cuya presencia puede detectarse midiendo las propiedades de relajación del fluido en la muestra. Un cambio en las propiedades de relajación indica la presencia de agregados y, por tanto, moléculas diana.

**[0060]** Si el ligando es un carbohidrato, en la técnica se conoce una variedad de diferentes interacciones mediadas por carbohidrato y podrían estudiarse o modularse usando las nanopartículas descritas en este documento. Éstas incluyen la adhesión de leucocitos-células endoteliales, interacciones carbohidrato-anticuerpo, infección bacteriana y vírica por carbohidrato-proteína, reconocimiento inmunológico de células tumorales, células tumorales-células endoteliales (por ejemplo, para estudiar metástasis) y reconocimiento de tejido y células exógenas.

**[0061]** En otro aspecto, las nanopartículas magnéticas y los ferrofluidos de la memoria pueden usarse para tratar cáncer. Las nanopartículas magnéticas pueden usarse para tratamiento hipertérmico de tumores, en el que las nanopartículas magnéticas se inyectan en tumores y se someten a un campo magnético de CA o CC de alta frecuencia. Alternativamente puede usarse luz de IR próximo. Por tanto, el calor generado por la energía magnética de relajación del material magnético destruye el tejido tumoral alrededor de las partículas. En una realización de la presente memoria, las células tumorales pueden elegirse específicamente como diana incorporando antígenos específicos de tumor en las nanopartículas. Esto permite que tumores no fácilmente alcanzados por la inyección sean elegidos como diana por las partículas terapéuticas, y se evita destruir células sanas normales.

**[0062]** Para una frecuencia de excitación dada existe un tamaño de nanopartícula óptimo que proporciona una tasa de absorción específica (SAR) máxima y, por tanto, el calentamiento más eficiente. Por tanto, esta técnica requiere nanopartículas magnéticas con una estrecha distribución de tamaño del núcleo para maximizar la eficiencia de la terapia y minimizar la cantidad de ferrofluido que va a administrarse. Por tanto, las nanopartículas magnéticas de la memoria son particularmente muy adecuadas para la presente aplicación ya que el procedimiento de síntesis permite que el tamaño de las nanopartículas se controle estrechamente.

**[0063]** En otra realización, las nanopartículas pueden ligarse a sustancias terapéuticamente activas tales como anticuerpos o fármacos destructores de tumores. Las propiedades magnéticas de las nanopartículas también pueden usarse para elegir como diana tumores usando un campo magnético para guiar las nanopartículas a las células tumorales. Sin embargo, el uso de un campo magnético solo para dirigir nanopartículas a células tumorales no siempre es factible o preciso, por lo que la presente memoria proporciona una ventaja permitiendo que las nanopartículas sean específicamente dirigidas a células tumorales mediante ligandos específicos de tumor. Esto puede permitir que se use menos fármaco y reducir la posibilidad de efectos secundarios, ya que el fármaco sólo se dirige a las células en las que se necesita y no a células sanas.

**[0064]** En otro aspecto, la composición que comprende nanopartículas magnéticas de la invención puede usarse para mejorar la calidad de la obtención de imágenes de resonancia magnética (MRI) tal como se define en las reivindicaciones. La MRI no siempre proporciona suficiente contraste para permitir que se visualicen eficientemente estructuras, tales como tumores, pero las imágenes obtenidas pueden potenciarse usando nanopartículas magnéticas como medios de contraste. La sensibilidad potenciada obtenida de este modo permite que se detecten tumores mientras aún son muy pequeños y permite la detección de tumores en una fase muy precoz cuando hay más posibilidad de tratamiento satisfactorio.

**[0065]** La detección de células tumorales de esta forma también puede combinarse con hipertermia: una vez se identifican las células tumorales, puede dirigirse luz láser o luz de IR próxima al sitio tumoral para destruir las células.

**[0066]** Además, actualmente, no pueden obtenerse imágenes de los pulmones por rastreo por MRI. La tomografía de emisión de positrones (PET) puede obtener imágenes de los pulmones, pero no puede usarse para pacientes que requieren rastreos regulares, tales como pacientes con asma y enfisema debido a los riesgos de la exposición



- repetida a radiación. El trabajo reciente ha mostrado que la MRI por gas hiperpolarizado puede aplicarse a enfermedades, tales como asma, ya que la magnetización de estos gases es suficiente para una imagen de un pulmón completo que va a tomarse en los pocos segundos que tarda un paciente en inhalar, contener su respiración y exhalar. La capacidad de tomar imágenes cuando el paciente inhala y exhala también puede producir imágenes dinámicas cuando el paciente inspira y espira usando MRI. Las gliconanopartículas magnetizadas, y en particular aquellas que contienen gadolinio, pueden producirse de hasta 0,8 nm de tamaño. Estas pequeñas partículas pueden considerarse eficazmente “un gas magnetizado” y, por tanto, pueden utilizarse para la obtención de imágenes del pulmón en un entorno mucho más conveniente que el uso de gases hiperpolarizados.
- 5
- 10 **[0067]** Las partículas unidas a ligando de la presente memoria pueden administrarse específicamente a células tumorales, por lo que incluso células tumorales que se han movido del sitio tumoral original pueden elegirse como diana para terapia.
- 15 **[0068]** Las realizaciones de la presente memoria que tienen un núcleo que comprende metal magnético elemental son particularmente muy adecuadas para aplicaciones de obtención de imágenes, ya que el metal elemental es un potenciador más eficiente de la obtención de imágenes que el óxido metálico. La presencia de un metal pasivo en el núcleo es ventajosa ya que inhibe la oxidación del metal magnético. El metal pasivo también aumenta la biocompatibilidad de las nanopartículas y permite que el núcleo se una a ligandos, que además de sus usos biológicos protege adicionalmente el metal magnético de la oxidación y reduce la probabilidad de aglomeración.
- 20 **[0069]** Otra ventaja de las nanopartículas de la presente memoria es su tamaño excepcionalmente pequeño, que hace que sea más probable que sean captadas por células incluso cuando se ligan a moléculas de reconocimiento o terapéuticas.
- 25 **[0070]** En otro aspecto, las nanopartículas magnéticas de la memoria pueden usarse para sustituir materiales radiactivos usados como trazadores para la administración de fármacos. El uso de partículas magnéticas en lugar de materiales radiactivos permite que la administración de fármacos se evalúe midiendo variaciones magnéticas, eliminando el posible daño de la radiación.
- 30 **[0071]** En general, ha sido un problema difícil en el sector detectar o modular interacciones mediadas por carbohidratos, ya que la unión de carbohidratos a otras especies, tales como proteínas u otros carbohidratos es muy débil y tiende a ser polivalente. Por tanto, para la detección la unión es débil y para modular la interacción, los agentes monovalentes sólo han tenido un éxito limitado en la interrupción de interacciones polivalentes basadas en carbohidratos.
- 35 **[0072]** En realizaciones de la presente memoria referentes a interacciones carbohidrato-carbohidrato, pueden identificarse dos tipos de interacción. En interacciones homofílicas, los carbohidratos idénticos interaccionan entre sí y podrían detectarse aumentando regularmente la concentración de partículas que tienen una única especie de ligandos inmovilizado sobre su superficie hasta que se produzca la agregación. Esto puede detectarse por dispersión de la luz o efectos electrónicos. Las interacciones heterofílicas pueden detectarse mezclando dos o más nanopartículas diferentes y determinando el estado de agregación de las partículas.
- 40 **[0073]** Por tanto, la presente memoria proporciona una plataforma versátil para estudiar y modular las interacciones mediadas por carbohidratos. Por ejemplo, podrían usarse partículas para detectar anticuerpos dirigidos contra carbohidratos, detectar la unión de anticuerpo a los ligandos en la partícula mediante dispersión de la luz para detectar la agregación de las partículas, o efectos de campo eléctrico, tales como resonancia de plasmones de superficie, que se modificarían cuando los átomos de metal se agruparan juntos en las partículas.
- 45 **[0074]** La presente memoria proporciona de este modo un procedimiento para determinar si se produce o no una interacción mediada por carbohidratos, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una o más especies que se sospecha que interaccionan mediante una interacción mediada por carbohidratos con las nanopartículas de la presente memoria, y determinar si las nanopartículas modulan o no la interacción mediada por carbohidratos.
- 50 **[0075]** La presente memoria también proporciona un procedimiento de interrupción de una interacción entre un carbohidrato y un componente de unión, comprendiendo el procedimiento poner en contacto el carbohidrato y el componente de unión con las nanopartículas de la presente memoria, en el que las nanopartículas comprenden un grupo carbohidrato capaz de interrumpir la interacción del carbohidrato y el componente de unión.
- 55 **[0076]** En otro aspecto, las nanopartículas en las que el ligando es un antígeno pueden administrarse como vacuna, por ejemplo, balísticamente, usando una pistola de administración para acelerar su paso transdérmico a través de la capa externa de la epidermis. A continuación, las nanopartículas pueden ser captadas, por ejemplo, por células dendríticas que maduran a medida que migran por el sistema linfático, dando lugar a la modulación de la respuesta inmunitaria y la vacunación contra el antígeno.
- 60

**[0077]** Las nanopartículas en las que el ligando es ácido nucleico que codifica un antígeno también pueden administrarse como vacuna. Las nanopartículas son particularmente muy adecuadas para dichas aplicaciones debido a que las vacunas de ácido nucleico deben entrar en las células individuales para ser eficaces, por lo que es importante que las partículas sean suficientemente pequeñas para que atraviesen la membrana celular sin dañar las células que se usan.

**[0078]** Las pistolas de administración de vacunas conocidas en la técnica liberan potencia mediante el uso de aire o gas comprimido, normalmente gas helio. Esto puede ser doloroso y produce ronchas en la piel. Las nanopartículas magnéticas de la invención podrían usarse en un sistema de administración alternativo por el que la potencia para administrar las partículas se proporciona mediante la aplicación de un campo magnético. La inversión del campo magnético produciría una rápida aceleración de las nanopartículas, suficiente para impulsarlas a través de la capa epidérmica externa. Esto reduciría el dolor y la formación de ronchas resultantes del uso de gas comprimido.

**[0079]** En otra aplicación, se sabe que los carbohidratos de la superficie celular actúan de ligandos para los receptores víricos o bacterianos (llamados adhesinas) y que la unión de los carbohidratos a los receptores es un acontecimiento requerido durante la infección. Los carbohidratos sintéticos, por ejemplo glicoconjugados, que son capaces de modular estas interacciones pueden inmovilizarse en las nanopartículas de la presente memoria y usarse como reactivos para estudiar estas interacciones y como agentes terapéuticos para prevenir la infección vírica o bacteriana.

**[0080]** En otra aplicación, los artículos de la presente memoria pueden ser útiles en la modulación de la respuesta inmunitaria, por ejemplo, tras el trasplante. Como el reconocimiento inmunológico de tejido empieza con interacciones mediadas por carbohidratos entre carbohidratos de la superficie presentes en tejido trasplantado y los componentes del sistema inmunitario del huésped, tales como anticuerpos, entonces ésta puede elegirse como diana para mejorar las reacciones inmunitarias que resultan de esta interacción. A modo de ejemplo, el carbohidrato Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlnAc (el epítipo "αGal") se ha implicado como un epítipo antigénico importante que participa en el rechazo de tejido trasplantado. Por tanto, la modulación de la interacción del epítipo αGal y el sistema inmunitario puede ser una diana terapéutica para las nanopartículas descritas en este documento.

**[0081]** Puede ser útil una estrategia alternativa en el tratamiento del cáncer ya que muchos antígenos asociados a tumor o factores autocrinos de tumor tienen una base de carbohidratos. En este caso, las nanopartículas podrían proporcionarse como vacunas para cebar el sistema inmunitario para producir anticuerpos que pueden atacar células tumorales que presentan los carbohidratos sobre su superficie. A este respecto, se sabe que muchas células tumorales poseen patrones de glicosilación atípicos que pueden permitir que la respuesta inmunitaria sea estimulada por nanopartículas que van a dirigirse específicamente a células tumorales a diferencia de a células normales sanas. Las nanopartículas también pueden usarse para inhibir metástasis en cáncer, por ejemplo, mediante la migración de células tumorales a través de las células endoteliales.

**[0082]** La detección no invasiva de metástasis de los ganglios linfáticos clínicamente ocultas en cáncer de próstata ya se ha demostrado usando nanopartículas superparamagnéticas linfotrópicas conjuntamente con MRI. A continuación se enumeran ejemplos de gliconanopartículas que pueden tener afinidad o especificidad aumentada por metástasis.

Le <sup>x</sup> -GNP	Le <sup>y</sup> -GNP	STn-GNP
Globo-H-GNP	Gg <sup>3</sup> -GNP	Gluco-GNP
Malto-GNP	Lacto-GNP	Man-GNP

**[0083]** Además de otros ligandos que pueden estar presentes, tales como gliconanopartículas, hormonas tales como estrógeno, DHEA, etc., también pueden unirse a las nanopartículas y solubilizarse. Éstas pueden tener uso en la detección de cánceres tales como de mama. Los péptidos también pueden unirse a nanopartículas que se localizan en receptores específicos tales como receptores oncógenos codificados de la superficie celular. También pueden unirse lípidos, en particular aquellos que se unen a receptores toll. Ligandos químicos tales como azul de metileno pueden unirse a las gliconanopartículas que pueden ser útiles en la detección de metástasis de melanoma. Finalmente, pueden prepararse nanopartículas de siARN que, después de la captación en la célula, podrían obtener imágenes de la expresión de ARNm de oncogenes o específico de virus.

**[0084]** En otro aspecto, las nanopartículas pueden usarse como vehículos para producir anticuerpos que pueden unirse específicamente al ligando. Esto es particularmente ventajoso cuando el ligando es un carbohidrato, ya que puede ser un problema desafiante en la técnica producir anticuerpos contra grupos que contienen carbohidratos, ya que son frecuentemente pequeños y no producen fuertes respuestas inmunitarias.

**[0085]** En otro aspecto, los carbohidratos pueden unirse a nanocristales de seleniuro de cadmio para proporcionar puntos cuánticos, que a continuación pueden guiarse a la estructura celular requerida por nanopartículas. Pueden usarse otros aniones, tales como sulfuro, además de seleniuro. Los puntos cuánticos tienen posibles usos en la

obtención de imágenes biológicas, tanto en dispositivos electrónicos como ópticos, ordenadores cuánticos y el cribado de fármacos candidatos.

5 **[0086]** En otro aspecto, la presente invención incluye el uso de las nanopartículas definidas en las reivindicaciones para la evaluación de la recuperación miocárdica, es decir, la cantidad de tejido cardiaco que queda viable después de un infarto de miocardio. Actualmente, esto se monitoriza predominantemente por técnicas escintigráficas (por ejemplo, SPECT) usando compuestos, tales como sestamibi o tetrofosmina, que pueden ser captados por las células, en conjugación con radionucleidos, tales como tecnecio. La captación de los trazadores radiactivos es proporcional a la circulación sanguínea regional y, por tanto, da una indicación del grado de recuperación miocárdica, cuanto mayor sea la captación, mayor será la recuperación miocárdica.

15 **[0087]** Los compuestos tales como sestamibi o tetrofosmina funcionan debido a que son complejos catiónicos lipófilos que se difunden pasivamente a través de membranas celulares. Los ligandos funcionalizados de dichos complejos pueden incorporarse fácilmente como ligandos de superficie durante el autoensamblaje de nanopartículas magnetizadas. Puede unirse una amplia variedad de otros ligandos químicos novedosos a las nanopartículas para hacerlas libremente difundibles.

20 **[0088]** Las nanopartículas definidas en las reivindicaciones pueden autoensamblarse en presencia de derivados de sestamibi, tetrofosmina u otros compuestos que permiten la difusión en las células. A continuación, las nanopartículas resultantes se usan para permitir que se monitorice la recuperación miocárdica mediante la obtención de imágenes magnéticas sin necesidad de radioactividad. La obtención de imágenes de resonancia magnética se usa para detectar las nanopartículas; al igual que para trazadores radiactivos, la captación de nanopartículas será proporcional a la circulación sanguínea regional. Los trazadores escintigráficos más comúnmente usados actualmente son  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi y  $^{99m}\text{Tc}$ -tetrofosmina (Recent Advances in  $^{99\text{Tc}}$  Radiopharmaceuticals - Annals of Nuclear Medicine 16:79-93 (2003); Contributions of Nuclear Cardiology to Diagnosis and Prognosis of Patients with Coronary Artery Disease – Circulation 2000: 101:1465-1478). Las nanopartículas definidas en las reivindicaciones se pueden conjugar a sestamibi y usarse para la obtención de imágenes magnéticas. De esta forma, puede usarse la presente invención para sustituir por  $^{99m}\text{Tc}$  para monitorizar la recuperación miocárdica.

30 **[0089]** En otra aplicación, las nanopartículas magnéticas descritas en este documento pueden usarse en la producción de medios de grabación magnética.

35 **[0090]** A continuación, se describirán realizaciones de la presente invención a modo de ejemplo y sin limitación con referencia a las figuras que se acompañan.

### **Breve descripción de las figuras**

#### **[0091]**

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

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

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

50 La Figura 4 muestra a) el neoglicoconjugado 1 usado para la preparación de las gliconanopartículas *malto*-Au y la micrografía y el histograma de TEM correspondientes; b) RMN  $^1\text{H}$  en  $\text{D}_2\text{O}$  y  $\text{DMSO-d}_6$  de las nanopartículas *malto*-Au.

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

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

La Figura 7 muestra cambios en los valores de  $T_1$  (A) y  $T_2$  (B) de gliconanopartículas *malto*-Au con concentración creciente de Gd (III).

60 La Figura 8 muestra cambios en los valores de  $r_1$  (A) y  $r_2$  (B) de gliconanopartículas *malto*-Au con concentración creciente de Gd (III).

### **Descripción detallada**

**Composiciones farmacéuticas**

5 [0092] Las nanopartículas descritas en el presente documento o sus derivados pueden formularse en composiciones farmacéuticas y administrarse a pacientes en una variedad de formas. Por tanto, las nanopartículas pueden usarse como medicamento para el reconocimiento de tumores y terapias hipertérmicas, para el marcaje in vivo de células y tejidos, o como medio potenciador del contraste en la obtención de imágenes de resonancia magnética.

10 [0093] Las composiciones farmacéuticas para administración por vía oral pueden ser un comprimido, cápsula, polvo o forma líquida. Un comprimido puede incluir un vehículo sólido tal como gelatina o un adyuvante o un diluyente inerte. Las composiciones farmacéuticas líquidas incluyen generalmente un vehículo líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Pueden incluirse solución salina fisiológica, o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Tales composiciones y preparaciones contienen generalmente al menos el 0,1% en peso del compuesto.

20 [0094] La administración parenteral incluye administración por las siguientes vías: intravenosa, cutánea o subcutánea, nasal, intramuscular, intraocular, transepitelial, intraperitoneal y tópica (incluyendo dérmica, ocular, rectal, nasal, inhalación y aerosol), y vías sistémicas rectales. Para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o inyección en el sitio de afección, el principio activo estará en forma de una disolución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógenos y tiene pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Aquellos expertos en la materia saben bien preparar disoluciones adecuadas usando, por ejemplo, disoluciones de los compuestos o un derivado de los mismos, por ejemplo, en solución salina fisiológica, una dispersión preparada con glicerol, polietilenglicol líquido o aceites.

25 [0095] Además de uno o más de los compuestos, opcionalmente en combinación con otro principio activo, las composiciones pueden comprender uno o más de un excipiente, vehículo, tampón, estabilizador, agente isotonzante, conservante o antioxidante farmacéuticamente aceptables u otros materiales muy conocidos para aquellos expertos en la materia. Tales materiales no deberán ser tóxicos y no deberán interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material puede depender de la vía de administración, por ejemplo, por vía oral o parenteralmente.

35 [0096] Las composiciones farmacéuticas líquidas se formulan normalmente para tener un pH entre aproximadamente 3,0 y 9,0, más preferiblemente entre aproximadamente 4,5 y 8,5, y todavía más preferiblemente entre aproximadamente 5,0 y 8,0. El pH de una composición puede mantenerse mediante el uso de un tampón tal como acetato, citrato, fosfato, succinato, Tris o histidina, normalmente empleado en el intervalo de aproximadamente 1 mM a 50 mM. El pH de las composiciones puede ajustarse de otro modo usando ácidos o bases fisiológicamente aceptables.

40 [0097] Los conservantes se incluyen generalmente en composiciones farmacéuticas para retardar el crecimiento microbiano, prolongando la estabilidad en almacén de las composiciones y permitiendo envases de múltiples usos. Ejemplos de conservantes incluyen fenol, meta-cresol, alcohol bencílico, ácido para-hidroxibenzoico y sus ésteres, metilparabeno, propilparabeno, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio. Los conservantes se emplean normalmente en el intervalo de aproximadamente el 0,1 al 1,0% (peso/volumen).

45 [0098] Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se administran a un individuo en una "cantidad profilácticamente eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" (según corresponda, aunque la profilaxis puede considerarse terapia), siendo esto suficiente para mostrar beneficio al individuo. Normalmente, esto será para producir una actividad terapéuticamente útil que proporciona beneficio al individuo. La cantidad real de los compuestos administrados, y la tasa y el transcurso de tiempo de administración, dependerán de la naturaleza y la gravedad de la afección que está tratándose. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre la dosificación, etc., estará dentro de la responsabilidad de los médicos generales y otros doctores médicos, y normalmente tiene en cuenta el trastorno que va a tratarse, la afección del paciente individual, el sitio de administración, el procedimiento de administración y otros factores conocidos para los médicos. Ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente pueden encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania, 19ª edición, 1995, Handbook of Pharmaceutical Additives, 2ª edición (eds. M. Ash y I. Ash), 2001 (Synapse Information Resources, Inc., Endicott, Nueva York, EE.UU.), y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2ª edición, 1994. A modo de ejemplo, y las composiciones se administran preferiblemente a pacientes en dosificaciones de entre aproximadamente 0,01 y 100 mg de compuesto activo por kg de peso corporal, y más preferiblemente entre aproximadamente 0,5 y 10 mg/kg de peso corporal.

**Anticuerpos**

[0099] Las nanopartículas pueden usarse como vehículos para fomentar respuestas de anticuerpos frente a los

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

5  
10  
15  
[0100] Como alternativa o complemento a inmunizar un mamífero con una nanopartícula, un anticuerpo específico para el ligando y/o nanopartícula puede obtenerse a partir de una biblioteca recombinantemente producida de dominios variables de inmunoglobulinas expresadas, por ejemplo, usando el bacteriófago lambda o el bacteriófago filamentoso que muestra dominios de unión a inmunoglobulina funcionales en sus superficies; por ejemplo, véase el documento WO92/01047. La biblioteca puede ser sin tratamiento previo, que se construye a partir de secuencias obtenidas a partir de un organismo que no ha sido inmunizado con ninguna de las nanopartículas, o puede ser una construida usando secuencias obtenidas a partir de un organismo que ha sido expuesto al antígeno de interés.

20  
25  
[0101] El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en menores cantidades. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse mediante el procedimiento descrito por primer vez por Kohler y Milstein, Nature, 256:495, 1975, o pueden prepararse por procedimientos recombinantes, véase Cabilly y col., patente de EE.UU. nº. 4.816.567, o Mage y Lamoyi en Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, páginas 79-97, Marcel Dekker Inc, Nueva York, 1987.

30  
[0102] En el procedimiento de hibridomas, un ratón u otro animal huésped apropiado se inmuniza con el antígeno por las vías subcutánea, intraperitoneal o intramuscular para provocar que los linfocitos produzcan o puedan producir anticuerpos que se unirán específicamente a las nanopartículas usadas para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Entonces, los linfocitos se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado tal como polietilenglicol para formar una célula de hibridoma, véase Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pág. 59-103 (Academic Press, 1986).

35  
40  
[0103] Las células de hibridoma así preparadas pueden sembrarse y hacerse crecer en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma sin fusionar parentales. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

45  
[0104] Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan expresión de alto nivel estable de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como medio HAT.

50  
[0105] El medio de cultivo en el que están creciendo las células de hibridoma se analiza para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra las nanopartículas/ligandos. Preferiblemente, la especificidad de unión se determina por ensayo de inmunoabsorbancia unido a enzimas (ELISA). Los anticuerpos monoclonales de la presente memoria son aquellos que se unen específicamente a las nanopartículas/ligandos.

55  
[0106] En una realización preferida, el anticuerpo monoclonal tendrá una afinidad que es superior a micromolar o una afinidad mayor (es decir, una afinidad superior a  $10^{-6}$  mol) como se determina, por ejemplo, por análisis de Scatchard, véase Munson & Pollard, Anal. Biochem., 107:220, 1980.

60  
[0107] Después de identificar que las células de hibridoma producen anticuerpos neutralizantes de la especificidad y afinidad deseadas, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y hacerse crecer por procedimientos convencionales. Medios de cultivo adecuados para este fin incluyen medio Eagle modificado por Dulbecco o medio RPM1-1640. Además, las células de hibridoma pueden hacerse crecer *in vivo* como tumores de ascitis en un animal.

[0108] Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido ascítico o suero por procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía en hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

**[0109]** El ácido nucleico que codifica los anticuerpos monoclonales de la presente memoria se aísla fácilmente y se secuencian usando procedimientos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos. Las células de hibridoma de la presente memoria son una fuente preferida de ácido nucleico que codifica los anticuerpos o fragmentos de los mismos. Una vez aislado, el ácido nucleico se liga a vectores de expresión o de clonación, que a continuación se transfieren en células huésped, que pueden cultivarse de manera que los anticuerpos monoclonales se producen en el cultivo de células huésped recombinantes.

**[0110]** Los hibridomas capaces de producir anticuerpo con características de unión deseadas se encuentran en el alcance de la presente memoria, ya que son células huésped que contienen anticuerpos que codifican ácidos nucleicos (incluyendo fragmentos de anticuerpos) y que son capaces de su expresión. La presente memoria también describe procedimientos de producción de los anticuerpos que incluyen hacer crecer una célula que puede producir el anticuerpo en condiciones en las que el anticuerpo se produce, y preferiblemente se secreta.

**[0111]** Los anticuerpos según la presente memoria pueden modificarse en varias formas. De hecho, el término "anticuerpo" debería interpretarse como que cubre cualquier sustancia de unión que tiene un dominio de unión con la especificidad requerida. Por tanto, la presente memoria cubre fragmentos de anticuerpos, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos que incluyen moléculas sintéticas y moléculas cuya forma imita a la de un anticuerpo permitiendo que se una a un antígeno o epítipo, aquí un ligando de carbohidrato como se define en este documento.

**[0112]** Ejemplos de fragmentos de anticuerpos que pueden unirse a un antígeno u otro componente de unión son el fragmento Fab que está constituido por los dominios VL, VH, Cl y CH1; el fragmento Fd que está constituido por los dominios VH y CH1; el fragmento Fv que está constituido por los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo; el fragmento dAb que está constituido por un dominio VH; regiones CDR aisladas y fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra. También están incluidos fragmentos Fv monocatenarios.

**[0113]** Un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal según la presente memoria puede someterse a mutación genética u otros cambios. Se entenderá adicionalmente por aquellos expertos en la materia que un anticuerpo monoclonal puede someterse a las técnicas de tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos, anticuerpos humanizados o moléculas quiméricas que conservan la especificidad del anticuerpo original. Tales técnicas pueden implicar introducir ADN que codifica la región variable de inmunoglobulina, o las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), de un anticuerpo con las regiones constantes, o regiones constantes más regiones estructurales, de una inmunoglobulina diferente. Véanse, por ejemplo, los documentos EP 0 184 187 A, GB 2 188 638 A o EP 0 239 400 A. La clonación y la expresión de anticuerpos quiméricos se describen en los documentos EP 0 120 694 A y EP 0 125 023 A.

## **Sección experimental**

### ***Ejemplo 1 - Nanopartículas de Au-Fe***

**[0114]** Se creó un procedimiento de síntesis de gliconopartículas magnéticas covalentemente unidas a ligandos. A modo de ejemplo, se prepararon neoglicoconjugados 1 y 2 derivatizados con tiol de dos oligosacáridos significativos, el disacárido no antigénico maltosa (Glcα(1→4)Glcβ1-OR) y la lactosa antigénica (Galβ(1→4)Galβ1-OR), para funcionalizar *in situ* nanopartículas magnéticas (Figura 3, esquema 1). La síntesis de los disulfuros 1 y 2 se llevó a cabo por glicosidación de los derivados de maltosa y lactosa convenientemente protegidos con 11-acetiltio-undecanol y 11-acetiltio-3,6,9-trioxa-undecanol, respectivamente [12]. Ambos enlazadores se han usado para probar la influencia de su naturaleza hidrófoba o hidrófila en las propiedades del material completo. Los compuestos 1 y 2 se aislaron como formas de disulfuro y se usaron en esta forma para la preparación de gliconopartículas protegidas de oro-hierro. Las gliconopartículas solubles en agua **1-AuFe** (*malto-AuFe*) y **2-AuFe** (*lacto-AuFe*) se obtuvieron en mezclas de metanol/agua usando síntesis de una etapa. FeCl<sub>3</sub> y HAuCl<sub>4</sub> en una relación 1:4 se redujeron con NaBH<sub>4</sub> en presencia de los disulfuros **1** ó **2**. La protección del núcleo de metal con las monocapas de neoglicoconjugado produce nanoagrupaciones altamente estables y biofuncionales. Se han purificado por medio de filtración centrífuga y se han caracterizado por RMN <sup>1</sup>H, UV-vis, ICP, TEM, EDX y SQUID.

**[0115]** Los análisis de hierro de la partícula, llevados a cabo por medio de espectrometría de emisión atómica por plasma inductivamente acoplado (ICP), indicaron el 0,27% y el 2,81% de contenido de hierro para 1-AuFe y para 2-AuFe, respectivamente. Estos datos se corresponden con una relación promedio de Au:Fe de 5:0,1 y 5:1 respectivamente.

**[0116]** La Figura 1 muestra las curvas de magnetización de enfriamiento de campo cero y de enfriamiento de campo obtenidas a partir de las nanopartículas *lacto-AuFe* (A) y *malto-AuFe* (B) por medio del dispositivo de interferencia de cuantos superconductores (SQUID) entre 5k y 300k en un campo de 500Oe. A partir de las

mediciones magnéticas se deduce que está presente tanto un comportamiento superparamagnético como ferromagnético entre 5k y 300k. Las mediciones con SQUID confirman el carácter superparamagnético de las gliconanopartículas que tienen una temperatura de bloqueo ( $T_B$ ) inferior a 5K (Fig. 1), que sería de esperar para una nanopartícula magnética de 2 nm de diámetro. El componente superparamagnético se observa claramente a partir de a) el ajuste parcial de la dependencia térmica experimental de la magnetización a la ley de Curie-Weiss; b) la dependencia parcial del bucle de histéresis de la relación entre el campo aplicado y la temperatura (H/T); y c) la diferencia entre las curvas de ZFC y FC.

**[0117]** La Figura 2 muestra micrografías electrónicas de transmisión (izquierda) e histogramas de la distribución de tamaño del núcleo (derecha) para las nanopartículas *lacto*-AuFe (A) y *malto*-AuFe (B). Cada punto negro se corresponde con una única partícula. Los puntos están regularmente separados por los ligandos (neoglicoconjugado) unidos al núcleo y forman monocapas ordenadas.

**[0118]** La TEM se registró a una energía del haz de electrones de 200 kV en un microscopio Philips CM200.

**[0119]** En el caso de la muestra 2-AuFe (*lacto*-AuFe), las gliconanopartículas están dispersas, son esféricas y homogéneas. Se evaluó que el diámetro medio de la agrupación de oro/hierro era 2 nm. Se han encontrado unas pocas partículas aisladas con un tamaño de aproximadamente 10 nm en algunas regiones de la red, pero estas partículas no se han incluido en el histograma. En el caso de la muestra 1-AuFe (*malto*-AuFe), la gliconanopartícula presenta una distribución bimodal del tamaño de partícula, como se indica por el histograma correspondiente (Fig. 2B). Se han encontrado partículas con un diámetro medio de la agrupación de oro/hierro de aproximadamente 2,5 nm e inferior a 1,5 nm. Es digno de mención la formación espontánea de cadenas alineadas en regiones extendidas de la red, que indica una fuerza magnetostática adicional (Fig. 2B). Este comportamiento podría atribuirse a fuerzas magnéticas dipolo-dipolo o a tunelaje cuántico entre las nanopartículas. La disposición alineada no se observó en las micrografías obtenidas a partir de los nanopuntos de **2-AuFe**, aunque se observa una monocapa altamente ordenada.

### Preparación

**[0120] MaltoC<sub>11</sub>SauFe:** Se añadió una disolución de FeCl<sub>3</sub> (2 mg; 0,013 mmol; 0,25 equiv) en agua (0,5 ml) a una disolución de disulfuro 1 (80 mg; 0,075 mmol; 3 equiv) en MeOH (11,5 ml) seguido de la adición de una disolución de HAuCl<sub>4</sub> (17 mg; 0,05 mmol; 1 equiv) en agua (2 ml). Entonces se añadió NaBH<sub>4</sub> 1 M (52 mg; 1,38 mmol; 27,5 equiv) en pequeñas porciones con agitación rápida. La suspensión negra formada se agitó durante 2 h adicionales y el disolvente se eliminó a vacío. Las gliconanopartículas son insolubles en MeOH, pero solubles en agua.

**[0121] LactoEG<sub>4</sub>SauFe:** Se añadió una disolución de FeCl<sub>3</sub> (1 mg; 0,0065 mmol; 0,25 equiv) en agua (0,25 ml) a una disolución de disulfuro 2 (70 mg; 0,07 mmol; 5,5 equiv) en MeOH (12 ml) seguido de la adición de una disolución de HAuCl<sub>4</sub> (8 mg; 0,025 mmol; 1 equiv) en agua (1 ml). Entonces se añadió NaBH<sub>4</sub> 1 M (26 mg; 0,69 mmol; 27,5 equiv) en pequeñas porciones con agitación rápida. La suspensión negra formada se agitó durante 2 h adicionales y el disolvente se eliminó a vacío. Las gliconanopartículas son insolubles en MeOH, pero solubles en agua.

**[0122] Purificación:** La purificación se realizó por filtración centrífuga. El producto bruto se disolvió en agua (~15 ml) NANOpure y la disolución se cargó en un dispositivo de filtro centrífugo (CENTRIPLUS YM30, MICROCON, MWCO= 30000) y se sometió a centrifugación (3000 x g, 40 min). El residuo de gliconanopartículas oscuro se lavó con MeOH y agua y el procedimiento se repitió varias veces hasta que el material de partida ya no pudo detectarse por cromatografía en capa fina (CCF). El residuo se disolvió en agua y se centrifugó varias veces para eliminar materiales insolubles. La disolución transparente se liofilizó y los productos obtenidos estuvieron libres de sales y de material de partida (ausencia de señales de disulfuro e iones Na<sup>+</sup> en espectroscopia de RMN <sup>1</sup>H y <sup>23</sup>Na).

**[0123] Caracterización:** El examen de TEM de las muestras se llevó a cabo a 200 KV (microscopio Philips CM200). Una única gota (20 µl) de las disoluciones acuosas de las gliconanopartículas de Au/Fe se colocó sobre una rejilla de cobre recubierta de una película de carbono. La rejilla se dejó secar al aire durante varias horas a temperatura ambiente. Las distribuciones del tamaño de partícula de las agrupaciones de Au/Fe se evaluaron a partir de varias micrografías usando un analizador de obtención de imágenes automático.

**[0124]** El análisis de EDX se realizó con un equipo Philips DX4 unido al microscopio. El análisis de ICP se realizó por Agriquem S.L. siguiendo el protocolo de PEC-009. Se obtuvieron espectros de UV mediante un espectrofotómetro de UV/vis Perkin Elmer Lambda 12. Los espectros de RMN <sup>1</sup>H se adquirieron en espectrómetros Bruker DRX-500 y los desplazamientos químicos se facilitan en ppm ( $\delta$ ) con respecto a D<sub>2</sub>O.

**[0125] 1-AuFe: TEM:** diámetro promedio del núcleo metálico, 1,5 y 2,5 nm. ICP: 0,27% de Fe

UV (H<sub>2</sub>O):  $\lambda = 500$  nm, resonancia de plasmones superficiales RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 5,32 (s, 1H, H-1'), 4,37 (s, 1H, H-1), 4,00-3,30 (m, 13H), 2,70 (s, 2H, CH<sub>2</sub>S), 1,85-1,20 (m, 17H)

**[0126] 2-AuFe:** TEM: diámetro promedio del núcleo metálico, 2 nm.

ICP: 2,81% de Fe

UV (H<sub>2</sub>O):  $\lambda = 500$  nm, resonancia de plasmones superficiales RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 4,49 (da, 1H, H-1'), 4,40 (sa, 1H, H-1), 4,10-3,30 (m, 23H), 2,92 (m, 0,5H).

### Ejemplo 2 - Nanopartículas de Au magnéticas

**[0127]** Se prepararon gliconopartículas de oro (GNP) solubles en agua estabilizadas con monocapas autoensambladas (SAM) de diferentes moléculas de carbohidrato mediante la reducción química de un precursor de sal metálica en disolución acuosa en presencia de un exceso de neoglicoconjugados derivatizados con tiol. El procedimiento de preparación de muestras usó como punto de partida el Penadés y col. [11] [19] que produce GNP de oro en las que la agrupación metálica se ha protegido y funcionalizado al mismo tiempo con la molécula orgánica. La formación de enlaces covalentes Au-S aísla la agrupación metálica, previniendo su crecimiento (diámetro del núcleo  $\approx 2$  nm) y confiere a las nanoagrupaciones estabilidad excepcional en disolución.

**[0128]** En este ejemplo, los inventores informan de la observación experimental de histéresis magnética hasta temperatura ambiente en gliconopartículas de oro con diámetros promedio de 1,4 y 1,5 nm. Aumentando la relación de tiol:oro en el procedimiento de Penadés pueden obtenerse muestras de GNP con diámetro inferior a 1,5 nm. Esto se ilustra por la preparación y las propiedades magnéticas de Au-GNP obtenidas usando el neoglicoconjugado de maltosa 1 como especie enlazadora de tiol (Figura 4).

**[0129]** Preparación de gliconopartículas de oro *malto*-Au:

Una disolución acuosa de ácido tetracloroáurico (HAuCl<sub>4</sub>, 0,018 mmol) y un exceso de neoglicoconjugado de disulfuro 1 (0,2 mmol) se redujo con borohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>, 22 equiv) a temperatura ambiente. Inmediatamente se formó una suspensión marrón. La suspensión se agitó durante aproximadamente dos horas, luego el disolvente se eliminó y las gliconopartículas (GNP) se purificaron lavando con agua y filtración centrífuga (CENTRIPLUS, Mr 30000, 1 h, 3000xg). El residuo en el filtro se disolvió en agua y se liofilizó. Las GNP se caracterizaron por microscopía electrónica de transmisión (TEM), y espectroscopía de RMN <sup>1</sup>H y UV-visible, plasma de acoplamiento inducido (ICP) y análisis elemental. TEM: diámetro promedio y; número de átomos de Au, 1,5 nm y 79, respectivamente. UV-VIS (H<sub>2</sub>O):  $\lambda = 520$  nm. ICP: 28% de Au. Análisis elemental calculado para (C<sub>23</sub>H<sub>43</sub>O<sub>11</sub>S)<sub>n</sub>Au<sub>n</sub> (n = 79): C 38,18; H 5,98; S 4,40; Au 27,18. Hallado: C 39,5; H 6,07; Au 28,0.

**[0130]** La Figura 4 muestra en a) el esquema de síntesis para las GNP *malto*-Au y las micrografías de TEM correspondientes para las GNP *malto*-Au y los histogramas de distribución del tamaño de partícula correspondientes para las muestras; y en b) también se muestran los espectros de RMN <sup>1</sup>H en D<sub>2</sub>O y en DMSO-d<sub>6</sub>. Las GNP *malto*-Au presentan en todos los casos una estrecha distribución del tamaño de partícula con un tamaño promedio de 1,5 nm o menos. En la Figura 5 se muestra la micrografía electrónica de alta resolución (HRTEM) que indica la estructura fcc de las GNP *malto*-Au protegidas con tiol.

**[0131]** La magnetometría con el dispositivo de interferencia de cuántos superconductores (SQUID) indicó comportamiento ferromagnético incluso hasta temperatura ambiente. El bucle de histéresis medido a 5K presenta un campo coercitivo de 120 Oe. Se encontró que la temperatura de bloqueo, obtenida a partir de la dependencia térmica de la coercividad, era 395K, que se corresponde con una constante de anisotropía eficaz de 10 meV/átomo que es similar a la observada en un único átomo de Co sobre superficie de platino (III) [20]. La magnetización no cumplió la ley de Curie-Weiss, pero mostró una dependencia de la T mucho más lenta. Se derivó un momento magnético atómico de aproximadamente 0,003  $\mu_B$  por átomo de Au de mediciones magnéticas a baja T.

**[0132]** La Figura 6 muestra los bucles de histéresis medidos a 5K para GNP de oro *malto*-Au protegidas con tiol. De la Figura 5 es evidente que el procedimiento de magnetización de gliconopartículas protegidas con tiol presenta comportamiento similar ya que los materiales ferromagnéticos típicos describen bucles de histéresis incluso a temperatura ambiente. Además, se observó que las muestras no se saturan a ninguna temperatura. Se miden valores de remanencia de aproximadamente la mitad del valor de magnetización a 1T, que implica que los átomos, además de las GNP, mantienen un momento magnético permanente y que el sistema de GNP de oro está constituido por un ensamblaje de momentos magnéticos de orientación aleatoriamente distribuida.

**[0133]** Podría argumentarse si el comportamiento observado es debido o no a la presencia de impurezas ferromagnéticas. El análisis de plasma inductivo acoplado (ICP) indicó que la cantidad de impurezas de Fe (0,007% en peso) en *malto*-Au es muy bajo para explicar los valores de magnetización obtenidos. A pesar de ese análisis se han preparado muestras de GNP de Fe *malto*-Au que contienen el 0,2% en peso de hierro para caracterizar la influencia del Fe sobre el comportamiento magnético. La Figura 6 muestra los bucles de histéresis medidos a 5K



para ambos conjuntos de GNP. Es evidente que la presencia de cantidades elevadas de hierro (impurezas ferromagnéticas) en las nanopartículas **malto-AuFe** reduce el comportamiento ferromagnético a esta temperatura, mientras que el bucle de histéresis todavía sigue para muestras de **malto-Au**.

5 **[0134]** Como las GNP están dispersas, las interacciones entre partículas sólo pueden ser de naturaleza magnetostática. La distancia promedio entre núcleos de oro se determina por la longitud de dos moléculas consecutivas del neoglicoconjugado de maltosa 1 (6 nm). Como el momento magnético permanente de cada partícula es muy bajo, el campo magnético que actúa sobre una GNP por una única GNP vecina es inferior a 10 Oe. Por tanto, puede omitirse la influencia de los campos de dispersión.

10 **[0135]** Como el Au en masa es diamagnético, el comportamiento ferromagnético puede ser debido a la combinación de tanto el tamaño como los efectos de unión [21]. La discreta estructura de energía electrónica [22], la presencia de defectos de apilamiento [23], además del porcentaje extremadamente alto ( $\geq 80\%$ ) de átomos de la superficie [24] unidos covalentemente a S, pueden ser la posible causa de la aparición de ferromagnetismo.

15 **[0136]** En conclusión, se ha mostrado (Figura 6) que gliconopartículas de oro muy pequeñas protegidas con tiol presentan un magnetismo permanente localizado a diferencia de la característica de diamagnetismo metálica de otras nanopartículas de oro no protegidas con tiol u oro en masa. Esta observación señala que la unión tiol-oro induce en gliconopartículas de oro momentos magnéticos permanentes probablemente asociados a los orificios d adicionales localizados próximos a los enlaces de Au. Esto sugiere la aplicación tecnológica de las nanopartículas de la presente memoria para la grabación magnética. Además, la solubilidad en agua y la marca biológica de estas GNP amplifican enormemente su aplicación en el campo biológico.

### **Ejemplo de referencia 3 - Nanopartículas de Au-Gd (III)**

25 **[0137]** La gliconopartícula (GNP) de oro puede complejarse con Gd (III) y otros lantánidos para dar un nuevo agente de contraste. Los ligandos neoglicoconjugados presentes en las GNP (60 a 100 moléculas) son el grupo quelante.

30 **[0138] Preparación de gliconopartículas lactoEG<sub>4</sub>-Au(Gd):** A una disolución de la gliconopartícula de oro (20,0 mg) correspondiente en agua (1 ml) se añadió una disolución de GdCl<sub>3</sub> (0,5 M, 1,08 ml). La mezcla se agitó en ausencia de luz durante 20 h. La disolución se filtró por centrifugación (MICROCON YM30, 13000 rpm, 8 min). El residuo se lavó (8 x 0,5 ml, metanol/agua, 1/3). Las nanopartículas se disolvieron en agua y se liofilizaron para dar 17,5 mg de nanopartículas violetas oscuras. TEM: diámetro promedio 2,5 nm. EDX: Gd 6,8%; Au 33,2% atómico.

35 **[0139] Determinación de relaxividades:** Los tiempos de relajación de RMN <sup>1</sup>H T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> (37°C, pH 7,2) de los protones del agua en disolución acuosa se midieron a 1,5 Tesla en un espectrómetro de RMN Bruker Minispec. Los valores de T<sub>1</sub> se determinaron por el procedimiento de recuperación de la inversión y los valores de T<sub>2</sub> se determinaron por la secuencia de Carr-Purcell-Maiboom-Gill. Se prepararon disoluciones de las nanopartículas **lacto-Au(Gd)** a cinco concentraciones diferentes (0,01, 0,1, 1, 10, 100 µg/ml) en tampón Hepes con 150 mM de NaCl. Las relaxividades se calcularon a partir de las diferencias en las tasas de relajación longitudinal y transversal (1/T<sub>1(2)</sub>) de los protones del agua en presencia y ausencia de las gliconopartículas, y la concentración de Gd(III) se expresó en mM. Las Figuras 7 y 8 muestran los resultados.

45 **[0140]** En conclusión, en los ejemplos descritos en este documento, los inventores han desarrollado una metodología simple para preparar nanopartículas superparamagnéticas solubles en agua covalentemente unidas a oligosacáridos antigénicos. La metodología puede extenderse a la preparación de nanopartículas híbridas que incorporan carbohidratos y otras moléculas. Las interacciones carbohidrato-receptor pueden dirigir las gliconopartículas magnéticas a células diana y tejidos permitiendo su marcado selectivo. Esto demuestra que este tipo de gliconopartículas magnéticas polivalentes complementa las nanopartículas magnéticas bioactivas apenas disponibles [9] [10] [17]. En consecuencia, la fácil preparación y purificación, su pequeño tamaño del núcleo y su estabilidad y solubilidad en condiciones fisiológicas de nanopartículas de la presente memoria convierten estas herramientas en posibles candidatos para aplicaciones de diagnóstico, reconocimiento de tumores [15], hipertermia [16] y obtención de imágenes de resonancia magnética [17].

55 **Referencias**

**[0141]**

60 [1] Niemeyer, C.M. Angew. Chem. Int. Ed. 2001, 40, 4128-4158.  
 [2] Bergemann, C.; Muller-Schulte, D.; Oster, J.; Brassard, L.; Lübbe, A.S. J. Magn. Magn. Mater. 1999, 194, 45.  
 [3] Whitesides, G.M.; Kazlauskas R.J.; Josephson L. Trends Biotechnol. 1983, 1, 144-148.  
 [4] Sun, S.; Murray, C.B.; Weller, D.; Folks, L.; Moser, A. Science 2000, 287, 1989.  
 [5] a) Shafi, K.V.P.M.; Gedanken, A.; Prozorov, R. Adv. Matter, 1998, 10, 590-593. b) Fried, T.; Shemer, G.;

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

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composición que comprende nanopartículas magnéticas para utilizar como agente de contraste en un método de diagnóstico de obtención de imágenes de resonancia magnética de un paciente, en la que las nanopartículas tienen núcleos de átomos metálicos, siendo los átomos metálicos de dichos núcleos seleccionados entre únicamente átomos de oro, platino, plata o cobre, teniendo los núcleos un diámetro inferior a 2,5 nm, en la que los núcleos están unidos covalentemente a un conjunto de ligandos, por lo menos uno de los cuales comprende un grupo carbohidrato.
- 10 2. Composición para utilizar en un método, según la reivindicación 1, en la que el núcleo tiene un diámetro inferior a 2,0 nm y el núcleo está formado de átomos de oro.
- 15 3. Composición para utilizar en un método, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que los ligandos están unidos al núcleo a través de un grupo sulfuro.
4. Composición para utilizar en un método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las nanopartículas son solubles en agua.
- 20 5. Composición para utilizar en un método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la composición es un coloide.
6. Composición para utilizar en un método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el ligando carbohidrato comprende un polisacárido, un oligosacárido o un grupo monosacárido.
- 25 7. Composición para utilizar en un método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las nanopartículas comprenden además un péptido; una molécula de ADN o ARN; y/o un glicanoconjugado.
8. Composición para utilizar en un método, según la reivindicación 7, en la que el glicanoconjugado es un glicolípido o una glicoproteína.
- 30 9. Composición para utilizar en un método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha obtención de imágenes es la obtención de imágenes de los pulmones del paciente o para monitorizar la recuperación miocárdica.
- 35 10. Composición para utilizar en un método, según la reivindicación 9, en la que dicha obtención de imágenes es la obtención de imágenes en el diagnóstico de asma o enfisema.
- 40 11. Utilización de una composición, estando dicha composición definida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en un método de obtención de imágenes de resonancia magnética de un paciente.

Figura 1

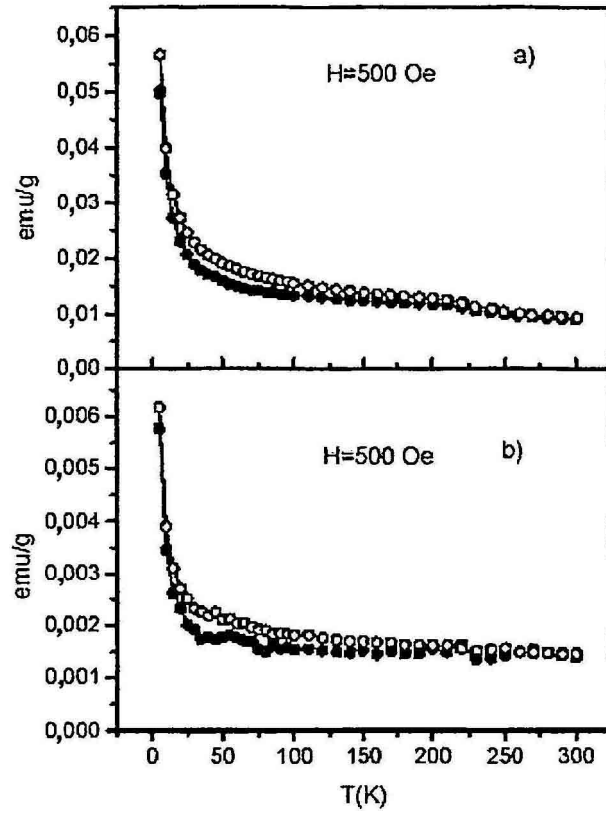


Figura 2A

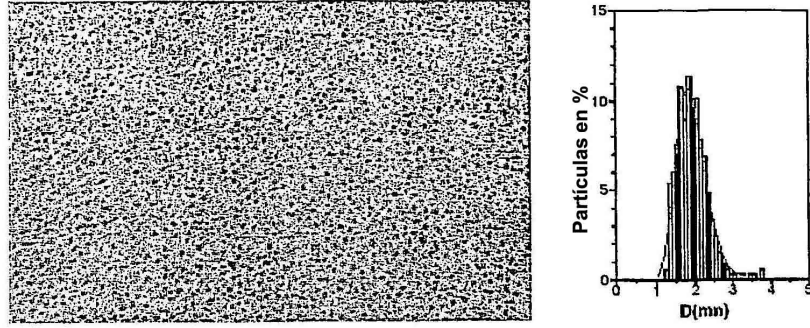


Figura 2B

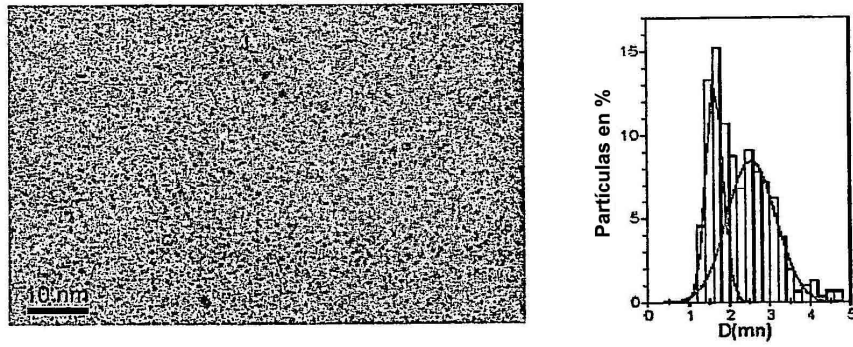


Figura 3

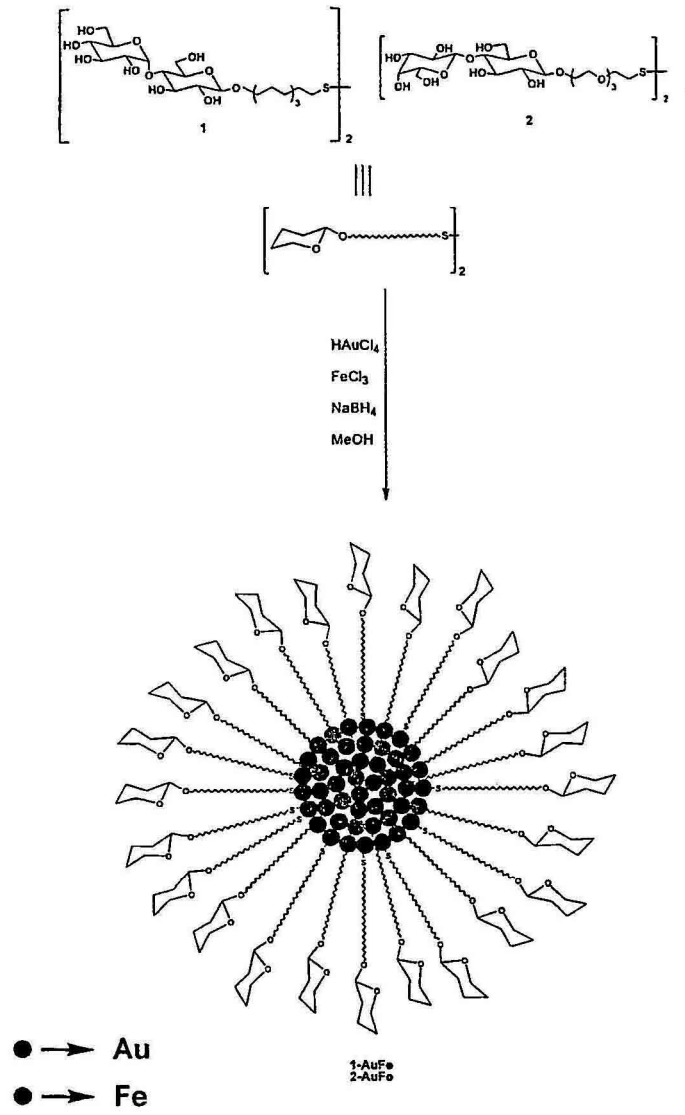


Figura 4A

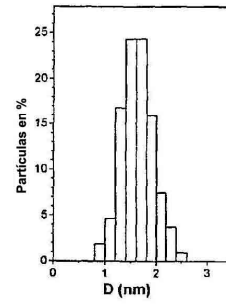
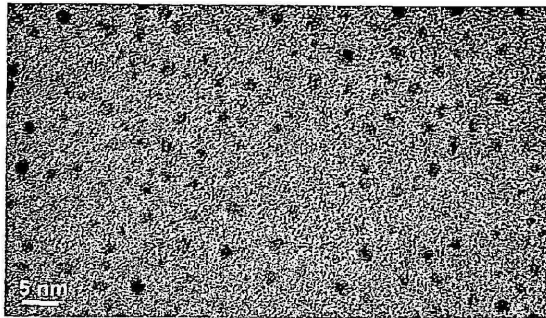
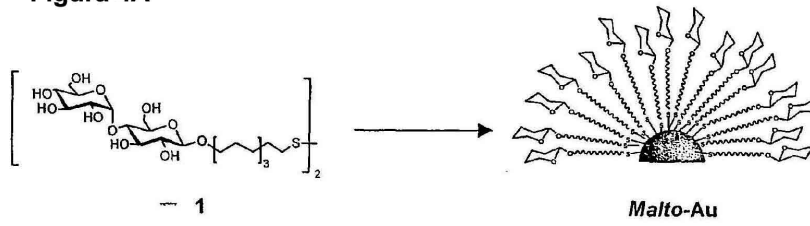


Figura 4B

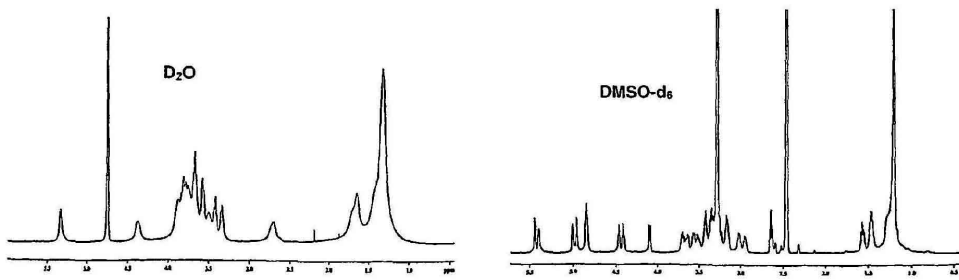


Figura 5

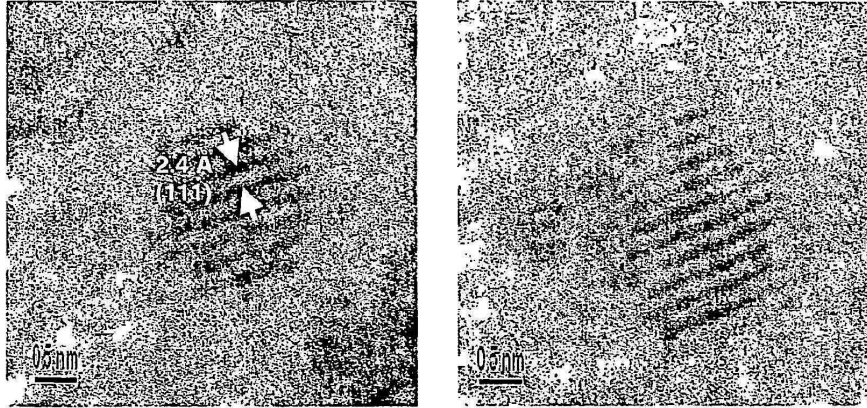




Figura 6

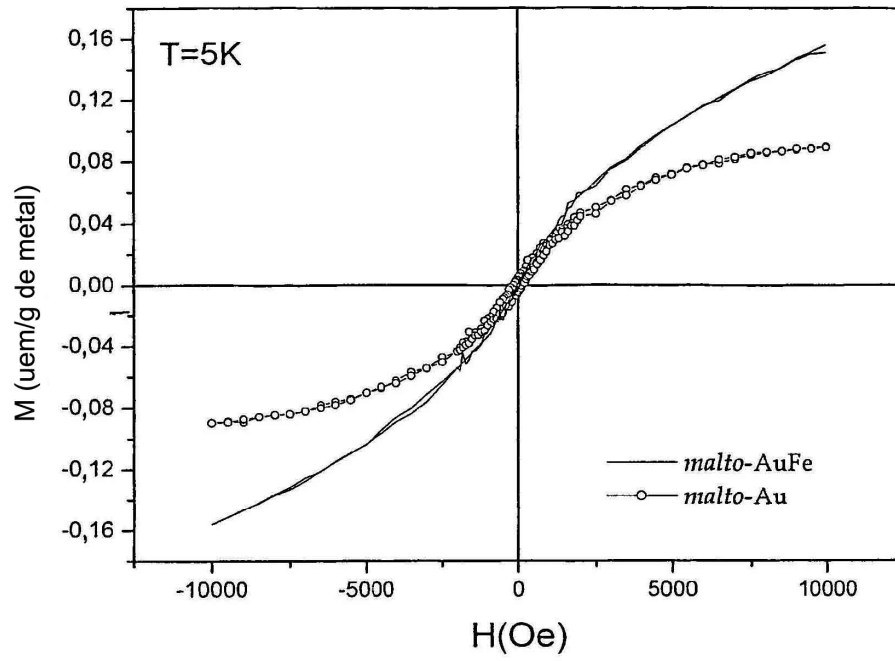


Figura 7A

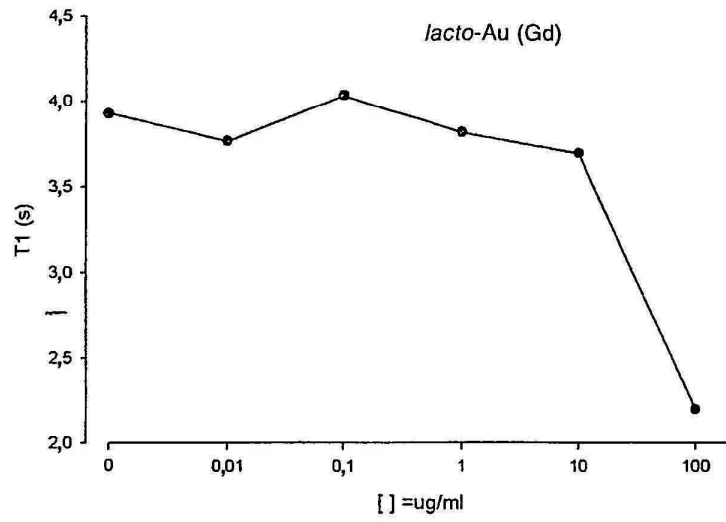
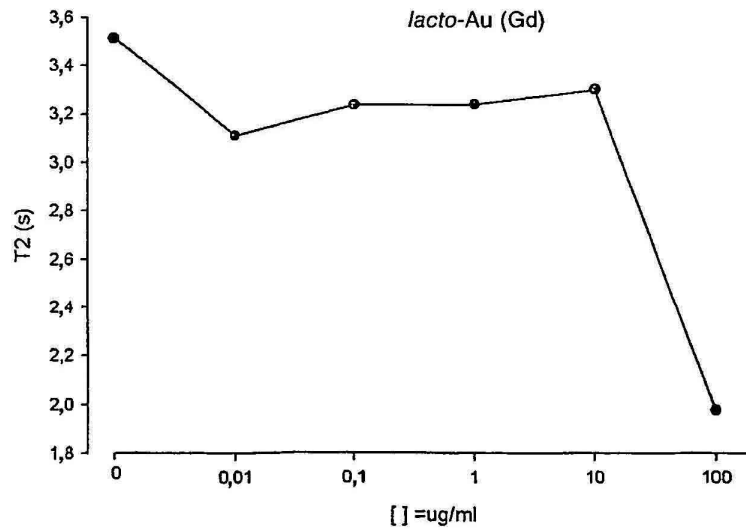
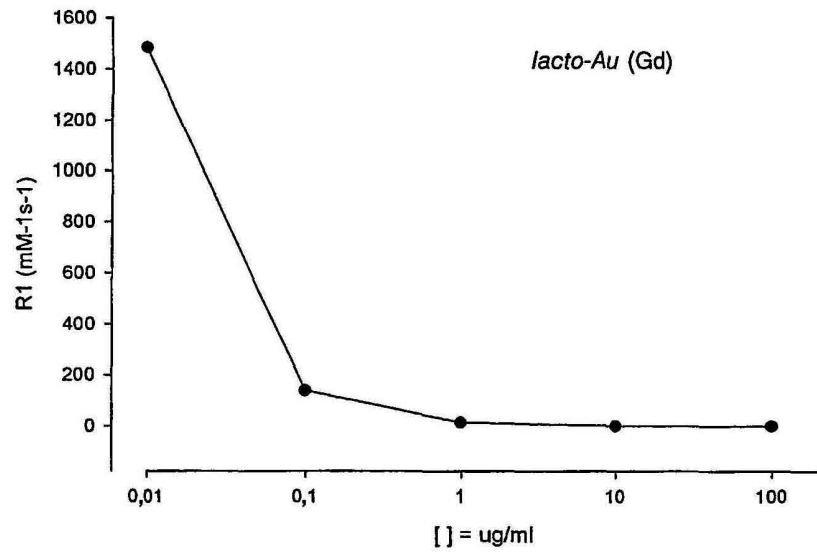


Figura 7B



**Figura 8A**



**Figura 8B**

