

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 480 240**

51 Int. Cl.:

**B82Y 15/00** (2011.01)  
**C07D 249/16** (2006.01)  
**C07D 498/08** (2006.01)  
**G01N 33/58** (2006.01)  
**C07D 207/00** (2006.01)  
**B82B 3/00** (2006.01)  
**C07D 235/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2009 E 09169655 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014 EP 2161239**

54 Título: **Nanocristales semiconductores**

30 Prioridad:

**08.09.2008 FR 0856030**

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

**25.07.2014**

73 Titular/es:

**COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE ET  
AUX ÉNERGIES ALTERNATIVES (100.0%)  
BÂTIMENT "LE PONANT D" 25, RUE LEBLANC  
75015 PARIS, FR**

72 Inventor/es:

**TEXIER-NOGUES, ISABELLE y  
BERNARDIN, AUDE**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 480 240 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**

## Nanocristales semiconductores

El campo de la invención es el de los nanocristales semiconductores, en particular fluorescentes también denominados "quantum dots" o puntos cuánticos.

- 5 La presente invención pretende principalmente proponer un nuevo método útil para el injerto, en particular de moléculas orgánicas, biomoléculas poliméricas, dendrímeras, complejos metálicos o también proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, lípidos y anticuerpos en la superficie de estos nanocristales.

Los nanocristales semiconductores son unas partículas muy interesantes respecto a las propiedades conferidas por su núcleo semiconductor.

- 10 Están dotados simultáneamente de una fluorescencia intensa y de una baja velocidad de fotoblanqueamiento. Permiten un ajuste de su longitud de onda de emisión por medio de su tamaño y/o la composición de su núcleo semiconductor. Poseen una banda ancha de excitación que permite excitar simultáneamente varios nanocristales a la misma longitud de onda (multiplexado facilitado).

- 15 Estas propiedades, que les confieren unas ventajas significativas con respecto a los fluoróforos orgánicos, se aprovechan en aplicaciones muy diversas.

Así, los nanocristales semiconductores son utilizados por sus propiedades ópticas y/o electrónicas (redox, y/o de conducción eléctrica) para la fabricación de sensores, de células fotovoltaicas, etc.

Por otra parte, son ampliamente utilizados en el campo de la biología, en particular como trazadores para la formación de imágenes, en particular ópticas, o como agentes de fototerapia.

- 20 Los nanocristales semiconductores son generalmente sintetizados en medio disolvente orgánico en el que existen en forma estabilizada por unos ligandos, generalmente unas fosfinas, unos óxidos de fosfina, o unas cadenas grasas que llevan a su extremo una función amina, ácido carboxílico, o tiol. Estos ligandos de estabilización permiten controlar el crecimiento de las nanopartículas durante su síntesis.

- 25 Sin embargo, los nanocristales obtenidos al final de estas síntesis convencionales no parecen ser utilizables tal cual para numerosas aplicaciones.

Así, para aplicaciones biológicas, es deseable conferir a estos nanocristales, naturalmente no hidrosolubles, una solubilidad en medio acuoso.

- 30 Además, según las aplicaciones consideradas, puede ser necesario acoplarlos a moléculas orgánicas, a complejos metálicos, a biomoléculas, etc., y por lo tanto disponer de nanocristales portadores de funciones reactivas propicias para la realización de estos acoplamientos.

Dos modos de funcionalización principales son actualmente retenidos para acceder a nanocristales conformes a una y/u otra de las dos exigencias antes citadas.

- 35 El primer modo de funcionalización se basa en un intercambio con los ligandos de estabilización, es decir los ligandos orgánicos quelantes utilizados durante la síntesis de nanocristales en disolvente orgánico. Se sustituyen estos ligandos de estabilización por unos ligandos orgánicos quelantes bifuncionales, que comprenden por un lado un grupo químico que presenta una afinidad fuerte para la superficie de los nanocristales y, por otro lado un grupo químico que favorece una buena solubilidad de los nanocristales, en agua o en tampón acuoso, y que es funcionalizable por una molécula de interés.

- 40 Estos ligandos orgánicos quelantes de sustitución pueden ser, por ejemplo, unos tioles, unos aniones carboxilatos (procedentes de ácidos grasos en particular), unos fosfatos, unos fosfonatos, unas fosfinas, unas aminas, unos carboditioatos, tales como el ácido mercapto-acético, el ácido oleico, unas cadenas poli(etilenglicol) funcionalizadas en su(s) extremo(s) por estos mismos grupos. Se pueden emplear igualmente unos ligandos que presentan dos o más de estos mismos grupos a fin de favorecer aún más, por efecto entrópico, la interacción entre el ligando y la nanopartícula, como, por ejemplo, el ácido dihidrolipoico (2 funciones tioles) y unas fosfinas en forma de oligómeros.
- 45 Según una variante de realización, esta primera capa de ligandos orgánicos bifuncionales así formada puede ser protegida injertando de manera covalente un polímero orgánico, sobre el cual se injertarán finalmente las moléculas de interés.

- 50 El segundo modo de funcionalización utiliza, por su parte, unas moléculas o polímeros anfífilos. La parte hidrófoba del ligando o del polímero interactúa con la parte hidrófoba de los ligandos de estabilización de origen de los nanocristales, y la parte hidrófila sirve para estabilizar dichos nanocristales en tampón acuoso.

La parte hidrófoba puede estar, por ejemplo, constituida de una o varias cadenas hidrocarbonadas, o de anillos aromáticos.

Tales ligandos o polímeros anfífilos pueden ser, por ejemplo:

- unas moléculas anfífilas, como por ejemplo unos ácidos grasos, unas cadenas grasas (de C6 o más) funcionalizadas por unos grupos hidrófilos, tales como por ejemplo amina, fosfato, sulfato, etc.

- unos polímeros orgánicos anfífilos, y

- 5 - unos fosfolípidos como, por ejemplo, la fosfatidil-etanolamina (PE), la fosfatidilcolina (PC) o unos polímeros tales como PEG-PE/PC (PEG = poli(etilenglicol), PEG-PE = PE funcionalizada por una cadena PEG), susceptible de auto-ensamblarse en micelas.

10 Estos dos métodos de funcionalización, apropiados para formar una capa de solubilización acuosa en la superficie de los nanocristales, tienen por lo tanto respectivamente como ventaja complementaria permitir la introducción de funciones reactivas (esencialmente aminas, tioles y ácidos carboxílicos, para los nanocristales comerciales) propicios para el injerto ulterior del nanocristal considerado con un material anexo (proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, lípidos, anticuerpos, oligosacáridos, complejos metálicos, polímeros conductores o para la óptica no lineal, superficies, bolas de sílice, células fotovoltaicas, etc.).

15 Los métodos clásicos de injerto empleados sobre los nanocristales semiconductores y que aprovechan las funciones reactivas presentes en la superficie de su capa de solubilización son principalmente los siguientes:

- acoplamiento entre ácidos carboxílicos activados (frecuentemente en forma de NHS) y aminas
- acoplamiento entre tioles y maleimidias, y
- acoplamiento entre carbonilos y oxiaminas.

20 Estos métodos permiten conjugar, entre otros, proteínas, ácidos nucleicos, anticuerpos, oligosacáridos, complejos metálicos, a los nanocristales semiconductores para diferentes aplicaciones.

Desafortunadamente, este modo de funcionalización no es siempre satisfactorio. En efecto, en función de la estructura de las moléculas injertadas, es posible realizar conjuntamente unas reacciones indeseables con las aminas/tioles/ácidos carboxílicos presentes.

25 Para suplir este inconveniente, se han aplicado recientemente con éxito unas reacciones de cicloadición denominadas de "química clic" entre azidas y alquinos para la funcionalización de los nanocristales (1).

30 Así, *Binder et al.* divulga una funcionalización de nanocristales semiconductores que se basa en el intercambio de los ligandos de estabilización de origen de estos nanocristales con unas fosfinas, que llevan o bien unas azidas, o bien unos alquinos terminales, con el objetivo de realizar consecutivamente unas cicloadición 1,3-dipolares. Estas cicloadiciones son realizadas bien por vía térmica (95°C) en el tolueno o por "química clic" en el THF, en presencia de una base, de un ligando y de Cu(I). Los productos de cicloadición esperados son obtenidos en los dos casos, y la formación de los triazoles se demuestra por el seguimiento en infrarrojo de la desaparición de la banda característica de las azidas a 2100 cm<sup>-1</sup>.

35 Desafortunadamente, los nanocristales semiconductores obtenidos por "química clic" pierden casi todas las propiedades de fluorescencia. La explicación propuesta es un enfriamiento debido a la presencia residual de iones Cu(I). La utilización de la "química clic" clásica (es decir, catalizada con Cu(I)) para la modificación de los "quantum dots", no permite por lo tanto conservar las propiedades de fluorescencia nativas.

Con el objetivo de superar este inconveniente, se ha propuesto librarse de la presencia del cobre activando los alquinos por unos grupos aceptores de electrones. Sin embargo, estos compuestos son entonces susceptibles de sufrir unas reacciones de Michael y por lo tanto de llevar a la formación de productos distintos que los esperados.

40 Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de un método simple y selectivo para realizar el injerto de material en la superficie externa de nanocristales semiconductores sin afectar significativamente a su poder fotoluminiscente y más particularmente fluorescente.

La presente invención pretende precisamente proponer un nuevo procedimiento de funcionalización de nanocristales semiconductores conformes a estas exigencias.

45 Así, según uno de sus aspectos, la presente invención se refiere a un procedimiento útil para modificar en la superficie un nanocristal semiconductor que comprende al menos las etapas que consisten en:

- disponer de un nanocristal semiconductor cuya capa de revestimiento orgánica está provista, en la superficie externa del nanocristal, de al menos un grupo G1 reactivo según una reacción de cicloadición de tipo "química clic", y

- llevar dicho nanocrystal con un material anexo, provisto en la superficie de al menos un grupo G2 complementario del grupo G1 enfrente de dicha reacción "química clic", en condiciones propicias para la interacción de dichos grupos G1 y G2,

5 caracterizado por que dichos grupos G1 y G2 son respectivamente una azida y un radical cicloalquinilo forzado o a la inversa.

En el sentido de la presente invención, la expresión "dichos grupos G1 y G2 son respectivamente una azida y un radical cicloalquinilo forzado o a la inversa" significa que el grupo G1 es una azida y el grupo G2 un radical cicloalquinilo forzado o que el grupo G1 es un radical cicloalquinilo forzado y el grupo G2 una azida.

10 Según otro de sus aspectos, la invención se refiere a un nanocrystal semiconductor, en particular fluorescente cuya capa de revestimiento orgánica está provista, en la superficie externa del nanocrystal, de al menos un radical cicloalquinilo forzado y reactivo frente a una azida según una reacción de cicloadición de tipo "química clic".

Según también otro de sus aspectos, la presente invención pretende un nanocrystal semiconductor en particular fluorescente cuya capa de revestimiento orgánica está injertada en la superficie con al menos un material, en particular un sustrato y/o al menos una molécula de interés, obtenido según el procedimiento de la invención.

15 Tal sustrato se puede seleccionar en particular entre superficies de tipo metálico (oro, plata, platino, etc.) semiconductor (silicio, germanio, etc.), óxido (alúmina, SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, etc.), orgánico tales como, por ejemplo, plástico, polímero o gel.

20 Los inventores han constatado así que la elección de un cicloalquino forzado a título de grupo complementario de una azida con fines de modificación de nanocrystal fluorescentes semiconductores por una reacción de tipo "química clic" permite dar satisfacción al conjunto de las exigencias antes citadas.

Ciertamente, se conoce que las azidas reaccionan muy rápidamente en presencia de dobles enlaces forzados en los compuestos cíclicos. En particular, el documento WO 2006/050262 aprovecha esta aceleración de la reacción debida a la tensión del anillo para realizar una cicloadición entre azida y ciclooctino con fines de modificaciones químicas de células en un organismo vivo.

25 El documento de la técnica anterior Vundyalá *et al.* (Tetrahedron Letters, 2008, 29:6386) describe la formación de oligómeros oligo(p-fenileno vinileno)s (OPV) funcionalizados por la biotina, a partir de una reacción de cicloadición catalizada al Cu(I) de tipo "química clic", entre un oligómero OPV funcionalizado por alcino y un derivado biotina-PEG funcionalizado por azida. Por otra parte, se precisa la posibilidad de injertar mediante los sitios de unión de la biotina, el compuesto obtenido de un "quantum dot" recubierto de estreptavidina con el propósito de conducir a una red de quantum dots unidos entre sí por unos OPVs.

30 Así, este documento no dice absolutamente nada en cuanto a la realización de un cicloalquino forzado a título de grupo complementario de una azida, conforme al procedimiento de la presente invención, y para la resolución del problema técnico de la invención, a saber la obtención de nanocrystal fluorescentes injertados en la superficie de un sustrato o de una molécula de interés, que sigue teniendo una fluorescencia satisfactoria.

35 Sin embargo, en conocimiento de los inventores, esta cicloadición de tipo "química clic" de una azida sobre un cicloalquino inducido no se ha aprovechado nunca para la modificación en la superficie de nanocrystal fluorescentes. Asimismo, la funcionalización de la capa de revestimiento orgánica en la superficie de nanocrystal con al menos un radical cicloalquinilo forzado no se ha considerado jamás para permitir la obtención de una manera simple y suave de nanocrystal fluorescentes injertados en la superficie, bien a un sustrato o bien a una molécula de interés, y que siguen estando sin embargo dotados de una fluorescencia satisfactoria.

40 El procedimiento objeto de la invención es ventajoso por varias razones.

En primer lugar, permite la conjugación de moléculas de interés, o de biomoléculas, en la superficie de nanocrystal semiconductores, en particular fluorescentes, en condiciones suaves y biocompatibles.

La ausencia de base permite mantener un pH que asegura la estabilidad de los nanocrystal en fase acuosa.

45 La ausencia de cobre (I) permite evitar el fenómeno de extinción de la fluorescencia de los nanocrystal semiconductores fluorescentes.

No es necesario añadir aditivos, tales como unos politriazoles que permitan una autocatálisis de la reacción estabilizando el cobre (I).

50 Finalmente, la funcionalización se puede realizar en medio acuoso y a temperatura ambiente, es decir condiciones particularmente apreciadas en el plano industrial, y por otra parte que se muestran por lo tanto compatibles con el injerto de moléculas de interés frágiles, como los ácidos nucleicos y ciertas proteínas.

Otras características y ventajas de la invención aparecerán mejor a partir de la descripción siguiente.

Nanocristales semiconductores

Los nanocristales pueden ser definidos como unos objetos cristalinos "nanométricos", es decir que su tamaño es generalmente inferior a 150 Å y preferentemente está comprendido en el intervalo de 12 a 150 Å.

5 Los nanocristales considerados según la invención son unos nanocristales inorgánicos con capa de revestimiento orgánica.

El tamaño del núcleo cristalino inorgánico es generalmente inferior a 100 nm, y preferentemente comprendido entre 1 y 25 nm.

Los nanocristales semiconductores están generalmente constituidos por al menos un metal, un óxido metálico y/o al menos un compuesto semiconductor.

10 Los nanocristales están, por ejemplo, constituidos por al menos un metal.

El metal puede ser cualquiera, pero está generalmente seleccionado entre los metales de transición, los metales de tierras raras, los metales de los grupos IIA, IVa y VA de la tabla periódica de los elementos, y sus aleaciones, y las mezclas de estos metales y aleaciones.

15 Preferentemente, el metal se selecciona entre el aluminio, el cobre, la plata, el oro, el indio, el hierro, el platino, el níquel, el molibdeno, el titanio, el tungsteno, el antimonio, el paladio, el zinc, el estaño, sus aleaciones, y mezclas de estos metales y aleaciones.

Preferentemente, el metal es el oro.

20 Los nanocristales pueden también estar constituidos por al menos un óxido metálico, como por ejemplo un óxido de hierro, de titanio, de aluminio, de platino, de gadolinio o de hafnio. Preferentemente, los nanocristales son unos óxidos de hierro incluyendo en particular la magnetita, maghemita, el óxido de gadolinio o el óxido de hafnio.

Los nanocristales pueden estar constituidos por al menos un compuesto semiconductor. El compuesto semiconductor puede ser un semiconductor de fórmula AB en la que A representa un metal o un metaloide en estado de oxidación +II y B representa un elemento en estado de oxidación -II.

25 A se selecciona generalmente entre Mg, Ca, Sr, Ba, Zn, Cd, Hg, Sn, Pb y sus mezclas, y B se selecciona generalmente entre O, S, Se, Te y sus mezclas.

Unos ejemplos de compuestos A(II)B(VI) son MgS, MgSe, MgTe, CaS, CaSe, CaTe, SrS, SrSe, SrTe, BaS, BaSe, BaTe, ZnO, ZnS, ZnSe, ZnTe, CdS, CdSe, CdTe, HgS, HgSe, HgTe, SnS, SnSe, SnTe, PbS, PbSe, PbTe y las mezclas de los mismos.

30 El compuesto semiconductor puede también ser un semiconductor de fórmula CD (C(III) D(V)) en la que C representa un metal o un metaloide en estado de oxidación +III y D representa un elemento en estado de oxidación -III.

C se selecciona generalmente entre Ga, In, y sus mezclas, y D se selecciona generalmente entre Sb, As, P, N, y sus mezclas.

35 Unos ejemplos de estos compuestos semiconductores C(III)D(V) son GaAs, GaSb, GaN, InGaAs, InN, InGaN, InP, InAs, InSb, y sus mezclas.

Es asimismo posible utilizar unos compuestos semiconductores del grupo IV tal como el silicio o el germanio.

Se puede igualmente utilizar una mezcla de los compuestos AB, CD y de semiconductores del grupo IV.

40 En una forma de realización de la invención, el nanocristal semiconductor tiene una estructura núcleo/concha(s) ("core/shell" en inglés), estando dicho núcleo constituido por un nanocristal, tal como se ha descrito antes, constituido de al menos un metal y/o al menos un compuesto semiconductor mientras que la(las) concha(s) está(n) cada una constituida(s) de una capa de un metal y/o de al menos un compuesto semiconductor que comprende al menos un metal.

Este núcleo tiene por ejemplo un diámetro de 10 a 250 Å mientras que la(las) concha(s) tiene(n) un grosor de 3 a 30 Å. Cuando el nanocristal no comprende concha(s), este tiene generalmente un diámetro de 15 a 150 Å.

45 La capa de revestimiento orgánica tiene generalmente un grosor de 5 a 100 Å.

Todas las combinaciones son posibles para los materiales que forman el núcleo por un lado y la(las) concha(s) por otro, pero, preferentemente, el núcleo es de un primer compuesto semiconductor, mientras que la concha que rodea dicho núcleo (en el caso de una sola concha) o la primera concha que contiene el núcleo en el caso en el que el

núcleo está rodeado de varias conchas, es de un segundo compuesto semiconductor distinto del primer compuesto semiconductor (que forma el núcleo).

Los primer y segundo compuestos semiconductores se seleccionan entre los compuestos semiconductores ya descrito anteriormente.

- 5 Preferentemente, el núcleo es de un primer compuesto semiconductor de tipo A(II)B(VI) descrito anteriormente, tal como CdSe o un compuesto C(III)D(V) descrito anteriormente, tal como InP, mientras que la concha que rodea el núcleo o la primera concha que rodea el núcleo es de un segundo compuesto de tipo A(II)B(BI) distinto del primer compuesto semiconductor seleccionado por ejemplo entre ZnSe, ZnS y CdS.

10 En el caso de las múltiples conchas, dos conchas sucesivas son generalmente de compuestos semiconductores diferentes.

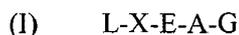
Así, en el caso de las múltiples conchas, los materiales que forman las conchas se pueden seleccionar entre todas las combinaciones posibles de los compuestos citados anteriormente, por ejemplo estos compuestos se pueden seleccionar entre ZnSe, CdS y ZnS. Por ejemplo, se podrá tener una primera concha de ZnSe o de CdS y una segunda concha de ZnS.

- 15 Como se ha precisado anteriormente, los nanocristales considerados según la invención poseen una capa de revestimiento orgánico de solubilización específica.

Capa de revestimiento orgánico

20 Los nanocristales semiconductores considerados según la invención poseen una capa de revestimiento orgánico modificado que está provista, en la superficie externa del nanocristal, de al menos un grupo G1 reactivo según una reacción química clic.

Más precisamente, esta capa comprende al menos un ligando específico que responde a la fórmula general (I):



en la que:

25 - L es un ligando quelante, que se puede seleccionar en particular entre la fosfina, unos óxidos de fosfina, o unas cadenas grasas que tienen a sus extremos una función amina, ácido carboxílico, tiol, un grupo 1,1-ditiolato (-C(S)S') o un grupo 1,1-diselenoato (-C(Se)Se'),

- E es un grupo espaciador orgánico que puede permitir una transferencia de carga o bien ser aislante,

30 - X es el producto de reacción de una función reactiva presente en el ligando L con una función reactiva complementaria presente en el grupo espaciador orgánico E tales como, por ejemplo, tiol/maleimida, amina/ácido carboxílico activado o carbonilo/oxiamina,

- A representa un enlace simple o un grupo seleccionado entre -CONH-, -NHCO-, -OCH<sub>2</sub>CONH-, -NHCOCH<sub>2</sub>O-, -O-, -S-, y

- G es un radical azida o cicloalquinilo forzado.

35 En el sentido de la presente invención, la expresión "cicloalquinilo forzado" se extiende a los heterocicloalquinilos. Más particularmente, se trata de un anillo de 7, 8 u 9 eslabones.

Según un modo preferido de la invención, el grupo cicloalquinilo es un grupo ciclooctinilo.

40 La tensión aplicada sobre el grupo cicloalquinilo puede ser aumentada de diversas maneras, por ejemplo mediante la utilización de heteroátomos, el grado de insaturación o la deformación debida a la torsión, la utilización de grupos aceptores de electrones, etc. Los derivados correspondientes son también cubiertos bajo el término de "cicloalquinilo forzado".

45 Así, el cicloalquinilo forzado conforme a la invención puede ser un compuesto en el que uno o varios átomos de carbono del anillo cicloalquinilo, con la exclusión de los dos átomos de carbono unidos por un triple enlace, está sustituido con uno o varios grupos aceptores de electrones, por ejemplo un grupo halo (bromo, cloro, fluro, yodo), nitro, un grupo ciano o un grupo sulfona. Cuando el grupo aceptor de electrones es un grupo nitro, ciano o sulfona, el grupo aceptor de electrones no está directamente unido al anillo cicloalquinilo.

Como otro grupo susceptible de estar presente en el cicloalquinilo, se pueden citar, de manera no exhaustiva, los grupos carboxilo, amina (por ejemplo alquilamina (por ejemplo alquilamina inferior), arilamina), éster (por ejemplo

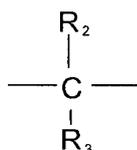
alquiléster (por ejemplo alquiléster inferior, benciléster), ariléster, ariléster sustituido), tioéster, sulfonilhalido, alcohol, tior, éster succinimidilo, isotiocianato, yodoacetamida, maleimida, hidrazina, etc.

Según una variante preferida, E responde a la fórmula siguiente:



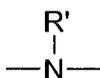
5 en la que R<sub>1</sub> representa:

- \* un enlace simple;
- un grupo



10 en el que R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> representan independientemente un hidrógeno, un radical alquilo, un radical arilo, un radical alcoxi, un halógeno;

- \* un grupo



en el que R' representa un hidrógeno, un radical alquilo, un radical arilo, un radical alcoxi, un halógeno;

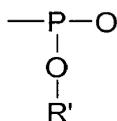
- \* un grupo

15



en el que R' tiene el significado ya dado anteriormente;

- \* un grupo



en el que R' tiene el significado ya dado anteriormente;

- 20
- \* -O-;
  - \* -S-;
  - \* -Se-;

25

y R representa un grupo alquileo lineal o ramificado que tiene de 1 a 30 átomos de carbono, preferentemente de 1 a 8; estando uno o varios átomos de carbono de dicho grupo alquileo eventualmente sustituidos con uno o varios heteroátomos seleccionados entre O, N, S, P y Si; comprendiendo dicho grupo alquileo además eventualmente uno o varios dobles y/o triples enlaces tales como unos dobles y/o triples enlaces carbono-carbono; estando dicho grupo alquileo además eventualmente sustituido con uno o varios grupos seleccionados entre los halógenos, tales como el cloro, el bromo, el yodo y el flúor, los heterociclos, los radicales arilo, hidroxilo, alcoxi, amino, acilo, carboxamida; =O, -CHO, -CO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>, -NHSO<sub>3</sub>H, sulfonamida; monoalquilamino, trialquilamonio, o también con

30

un radical dialquilamino, en el que los dos grupos alquilo pueden formar, conjuntamente con el átomo de nitrógeno de dicho grupo dialquil(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)amino, al que están unidos, un anillo que puede ser interrumpido con uno o varios átomos de nitrógeno, de oxígeno o de azufre, y los grupos Z; o R representa un heterociclo, un radical arilo, un radical arilo condensado sobre uno o más otros ciclos arilo y/o ciclos alquilo o heterociclo, un radical cicloalquilo, un radical cicloalquilalquilo, un radical alquilcicloalquilo, un radical arilalquilo, un radical alquilarilo, un radical

heterocicloalquilo, un radical alquil-heterocicloalquilo.

5 El grupo E puede ser ventajosamente una cadena poli(etilen)glicol (PEG) que permite mejorar la solubilidad del compuesto, o cualquier otro polímero, dendrímeros, oligómeros, hidrogeles que permiten por ejemplo encapsular unos nanocristales semiconductores fluorescentes en unos materiales, geles o formulación (materiales plásticos para la óptica y la electrónica, emisión de agentes de fototerapia, por ejemplo).

El grupo E puede también ser una pequeña molécula orgánica que permite aportar la función reactiva complementaria, por ejemplo la etilendiamina, el ácido glicólico, la cisteamina, o cualquier otra molécula orgánica que permita aportar unos ácidos/aminas/tioles.

10 El grupo E puede ser un grupo hidrocarbonado que comprende una o varias insaturaciones, por ejemplo del tipo alquénico. Un ejemplo de tal grupo puede ser un grupo alquileo, tal como se ha definido anteriormente, interrumpido por una o varias insaturaciones alquénicas. Cuando el grupo E comprende al menos dos insaturaciones, este puede conferir a los compuestos una capacidad para reticularse.

15 El grupo E puede también ser un grupo hidrocarbonado que comprende uno o varios grupos aromáticos. Se puede citar, por ejemplo, un grupo que comprende unos grupos aromáticos conjugados con unos grupos lineales insaturados, tal como un grupo que resulta del encadenamiento de una unidad fenileno-vinileno. Estos grupos contribuyen a conferir propiedades ópticas no lineales.

20 Se puede citar igualmente un grupo que comprende unas unidades pirrolo y/o tiofeno. Estos grupos contribuyen a conferir al material unas propiedades de conducciones electrónicas. Se puede citar, por ejemplo, un grupo que comprende uno o varios aromáticos sustituidos con uno o varios grupos aromáticos, tal como un grupo que comprende un encadenamiento de unidades quinonas o de unidades diazoicas. Estos grupos contribuyen a conferir al compuesto que los posee unas propiedades de foto/electroluminiscencia.

La obtención de los anteriores nanocristales destinados a ser utilizados en la primera etapa del procedimiento según la invención depende claramente de las competencias del experto en la técnica.

25 Según una primera variante de obtención, los nanocristales ya provistos en la superficie de una capa de ligandos quelantes, pero no conformes a la invención, se ponen en presencia, generalmente en solución, con unos compuestos ligandos ya funcionalizados con al menos un radical azida o cicloalquinilo forzado, y el conjunto se mantiene en contacto durante un tiempo satisfactorio para realizar en la superficie de los nanocristales un intercambio al menos en parte de los ligandos quelantes de origen con los compuestos ligandos funcionalizados con al menos un radical azida o cicloalquinilo forzado.

30 Según una segunda variante, puede proceder directamente a la funcionalización de los ligandos quelantes que forman la capa externa de nanocristales con las unidades cicloalquino forzado o azida.

Los materiales que comprenden una azida conveniente para la presente invención, así como los métodos de preparación de los materiales que comprenden la azida conveniente para la presente invención son también bien conocidos por el experto en la técnica.

35 Procedimiento

40 La presente invención propone por lo tanto un procedimiento útil para modificar en la superficie unos nanocristales por medio de una reacción de cicloadición [3+2] de tipo "química clic" entre una entidad azida y una entidad cicloalquinilo forzado, estando una de estas dos entidades, preferentemente el cicloalquinilo, presente en la superficie externa de la capa de revestimiento orgánico de los nanocristales a injertar, y estando la otra unida a un material anexo destinado a ser fijado en la superficie de nanocristales.

Como se destaca de lo anterior, la invención aprovecha la importante deformación del ángulo de unión del grupo acetileno en el grupo cicloalquinilo forzado, que asegura la tensión del anillo. Esta desestabilización del estado fundamental frente al estado de transición procura a la reacción una aceleración muy importante en comparación con los alquinos no forzados.

45 El grupo azida y el grupo cicloalquinilo forzado, llevados respectivamente por cada uno de los materiales en presencia, a saber el nanocristal o el material anexo, interactúan para formar un producto final conjugado que comprende un anillo fusionado azida/cicloalquino.

La reacción se obtiene ventajosamente sin catalizador.

50 Se puede realizar ventajosamente a temperatura ambiente y en medio acuoso. La energía de activación necesaria para la reacción es proporcionada por el grupo azida y el grupo cicloalquinilo forzado.

El procedimiento según la invención puede comprender al final de su segunda etapa, una etapa suplementaria durante la cual los nanocristales provistos de una capa de revestimiento orgánico modificado según la invención (I) (siendo dichos nanocristales eventualmente precipitados, separados, lavados y después secados) son sometidos a

una irradiación por una luz, preferentemente una luz ultravioleta (UV).

En otras palabras, los nanocristales son sometidos a una exposición a la luz, preferentemente la luz ultravioleta durante una duración dada, generalmente de uno o algunos minutos hasta una o varias horas, por ejemplo de un minuto a 10 horas.

- 5 Esta irradiación o exposición conlleva un proceso fotoquímico que mejora la eficacia de la fotoluminiscencia.

Injerto en la superficie de los nanocristales

En el sentido de la presente invención, el "injerto" cubre las dos reacciones siguientes, a saber:

- el "anclaje", que se refiere a la inmovilización de un compuesto, en este caso un nanocristal en la superficie de un sustrato, y

- 10 - el término "acoplamiento", que describe la reacción entre al menos un grupo funcional terminal de un primer compuesto, en particular un nanocristal, y al menos un grupo funcional complementario, llevado por un segundo compuesto, en particular una molécula de interés.

Según una variante de realización, el procedimiento según la invención se realiza con fines de anclaje de nanocristales en la superficie de un material de tipo sustrato.

- 15 Por ejemplo, un soporte sólido o semisólido, en particular un soporte conveniente para una utilización como chip de ácidos nucleicos (ADN, ARN, oligonucleótidos), de proteínas, de azúcar, de células o como fotosensibilizador para las células fotovoltaicas, o como marcador óptico de bolas de sílice (para los chips en suspensión).

El procedimiento según la invención comprende generalmente llevar un grupo azida presente en el sustrato a un grupo cicloalquilo forzado, presente a nivel del nanocristal.

- 20 Según otra variante de realización, el procedimiento según la invención se realiza para acoplar la superficie externa de los nanocristales semiconductores con una o más moléculas de interés.

Como ejemplo de moléculas de interés, se pueden citar también los marcadores, los colorantes, los fluoróforos (cumarinas, fluoresceína, fluorescinas modificadas, rodaninas, iguaninas, boro-dipirrometeno, oxazinas y otros), las toxinas (incluyendo las citotoxinas), los linkers, los activos terapéuticos, cosméticos, fitosanitarios, los miembros de un par de ligante específico, los péptidos, los aminoácidos y los residuos de aminoácido, los polipéptidos (incluyendo los péptidos y las proteínas), los azúcares y los residuos de azúcar, los fotosensibilizadores tales como, por ejemplo, la eosina, la rosa de Bengala, las ftalocianinas, las clorinas, las bacterioclorinas, las porfirinas tales como, por ejemplo, la tetrakis [;meso(4-etinilfenil)porfirina, la 1,1 0-(4-etinilfenil)5,15-(4-mesitil)porfirina y la 1-(4-etinilfenil)5,10,15-(4-mesitil)porfirina) cuya presencia sobre una superficie es particularmente útil en el campo de la electrónica molecular y de la fototerapia; unos compuestos que presentan una isomería cis-trans tales como los derivados de los diariletilenos, de los espiropiranos, de las spiroxazinas, de las fulgidas o de los azobenceno cuya presencia sobre una superficie es particularmente útil para la fabricación de interruptores moleculares fotocontrolados.

- 35 Las moléculas de interés pueden ser de origen natural o producidas de manera sintética o recombinante, y pueden ser aisladas, purificadas o también presentes en el medio nativo de la molécula no modificada sobre la que se basa la molécula diana que comprende generalmente una azida, por ejemplo, en la superficie o en el interior de una célula.

Cuando la molécula diana es un polipéptido, el polipéptido puede estar compuesto de aminoácidos D, L o de los dos, y puede además ser modificado, ya sea de manera natural, sintética o recombinante, a fin de incluir en el otros grupos. Por ejemplo, el polipéptido diana puede ser una lipoproteína, una glicoproteína o cualquier otra proteína modificada.

- 40 Los procedimientos y nanocristales según la invención tienen múltiples aplicaciones, ya sea en la investigación o en el diagnóstico.

Las aplicaciones de investigación comprenden también el descubrimiento de un medicamento de unas aplicaciones de detección/cribado: como cualquier agente de contraste, la invención permite la visualización de moléculas de interés (receptor, glucosa, antígeno, etc.) o de mecanismos biológicos (endocitosis, neoangiogénesis, apoptosis, actividades enzimáticas, etc.) y permite por lo tanto la identificación de dianas terapéuticas.

Permite también hacer un seguimiento del efecto de un tratamiento medicamentoso (por ejemplo citotóxico, inhibidor de una enzima, etc.) o la detección de tumores (por medio de marcadores específicos).

- 50 Como otras aplicaciones de interés, se pueden citar el estudio de las características funcionales y físicas de un receptor, la proteómica, la metabolómica, etc.

## Referencia bibliográficas

(1) Binder, W. H.; Sachsenhofer, R.; Straif, C. J.; Zirbs, R., Journal of Materials Chemistry 2007, 17, (20), 2125-2132.

Los ejemplos y las figuras siguientes son presentados a título ilustrativo y no limitativo del campo de la invención.

5 Figura 1: refleja los rendimientos cuánticos de los QDots modificados por "química clic" considerados en el ejemplo 2.

Figura 2: Ilustra el principio de la incorporación metabólica de Ac<sub>4</sub>ManNAz y su transformación en ácido siálico portador del grupo N<sub>3</sub>, el cual se encuentra después incorporado en los proteoglicanos expresados sobre las membranas celulares y permite el marcado en una segunda etapa por una reacción clic con los QDots-ciclooctinas.

## Ejemplos

10 Ejemplo 1:

Síntesis y caracterizaciones de un nanocrystal fluorescente modificado por una unidad ciclooctinilo

## 1- Síntesis del ciclooctino

## a) Síntesis del 8,8-dibromobicyclo[5.1.0]octano

15 En un matraz seco y bajo argón se introducen 3,65 g de ciclohepteno (es decir 38 mmoles) y después 8,52 g de *t*-BuOK (es decir 76 mmoles, 2 equ.) y 9 ml de pentano destilado previamente. La solución amarillo crema se agita vigorosamente y se coloca en un baño de hielo/sal. Después, se añaden gota a gota 4,9 ml de bromoformo (es decir 57 mmoles, 1,5 equ.). Durante las primeras adiciones, se observa una liberación gaseosa bastante violenta, después a medida que se lleva a cabo la adición, la solución se vuelve ocre marrón. Durante la adición, se han añadido aproximadamente 5 ml de pentano para permitir una agitación correcta de la solución. Una vez completada la adición, la mezcla se deja volver a temperatura ambiente durante toda la noche, bajo argón y agitación vigorosa.

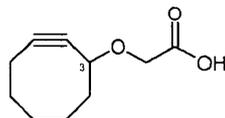
20 Se añaden después aproximadamente 50 ml de agua y el pH se neutraliza con HCl 1M. Las fases orgánica y acuosa son separadas; la fase acuosa se extrae con 3x20 ml de pentano y la fase pentano se lava con 3x20 ml de agua. La fase orgánica se seca después sobre MgSO<sub>4</sub> y el disolvente se evapora a vacío. Se obtiene un aceite amarillo anaranjado con una masa *m* = 10,814 g.

25 El producto se purifica después mediante una simple filtración sobre sílice con, como eluyente, ciclohexano/AcOEt 5%. Se obtiene un aceite incoloro de masa total 9,100 g después de la purificación, es decir un rendimiento del 90%.

## b) síntesis del 2-bromo-cicloocteno-3-glicolato de metilo

30 A una solución de 8,8-dibromobicyclo[5.1.0]octano (2,5 g, es decir 9,3 mmoles) y de glicolato de metilo (6,35 ml, es decir 83,9 mmoles) disueltos en 5 ml de tolueno anhidro en un matraz seco, bajo Ar y protegido de la luz por una película de aluminio, se añaden 3,85 g de perclorato de plata (es decir 18,6 mmoles). La reacción se agita durante 1h30 a temperatura ambiente, después las sales de plata se filtran sobre sinterizado y se lavan con AcOEt. La solución se concentra a vacío para dar un aceite viscoso marrón que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (2-15% AcOEt en el ciclohexano) para obtener el producto en forma de aceite amarillo de masa *m* = 1,6 g, es decir 65% de rendimiento.

## 35 c) síntesis del ácido ciclooct-1-in-3-glicólico



A 250 mg de 2-bromo-cicloocteno-3-glicolato de metilo (es decir 0,90 mmoles) se añade una solución de metilato de sodio a 0,5M en el metanol. La mezcla se agita durante 2 días a temperatura ambiente.

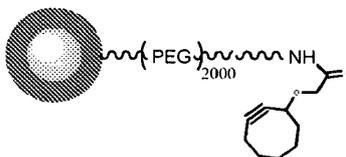
40 La reacción se acidifica con HCl 1M y después se extrae con AcOEt, se seca sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporan los disolventes. El producto se purifica sobre gel de sílice con AcOEt y se obtiene en forma de aceite amarillo de masa 120 mg, es decir 80% de rendimiento.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): δ(ppm) 1,3-2,3 (m, 10H); 4,45 (d, *J*<sub>9,9'</sub> = 17 Hz, 1H, H<sub>9</sub>); 4,50 (m, 1H, H<sub>3</sub>); 4,58 (d, *J*<sub>9,9'</sub> = 17 Hz, 1H, H<sub>9'</sub>);

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz): δ (ppm)

Masa: ESI<sup>+</sup> m/z

## 2. Síntesis del nanocrystal modificado aminoPEG-ciclooctino



5 El nanocrystal de partida es el quantum dot comercializado por la compañía Invitrogen bajo la denominación de QDots ITK545.

Antes de la reacción, los QDots ITK 545 son transferidos del tampón borato del almacenado en el PBS ("phosphate buffered saline" 0,01 M con 0,154 M de NaCl a pH 7,4).

10 Para ello, se filtran 75  $\mu$ l de solución a 8  $\mu$ M sobre unos filtros Microcon<sup>®</sup> durante 5 minutos a 5000 g (por centrifugación), y después se aclaran con el mismo volumen de PBS por centrifugación durante 5 minutos a 3000 g, y se resuspenden en 75  $\mu$ l de PBS (1000 g durante 3 minutos, dando la vuelta al filtro)

Se añaden 0,5 mg de EDC (N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida) y 10  $\mu$ l de una solución de ciclooctino en el DMSO (0,11 mg, es decir 10 equivalentes por función, 100 funciones por nanopartícula) en los 75  $\mu$ l de PBS que contienen el QDots ITK545. Se agita el conjunto a temperatura ambiente, protegido de la luz durante 5 horas.

15 El producto se purifica después sobre una columna de exclusión estérica GL25 (Healthcare GE), previamente equilibrada con PBS. El producto se recupera en una fracción que se concentra después sobre filtros Micricon<sup>®</sup> a 3000 g durante 5 minutos, y se resuspende en 75  $\mu$ M de PBS a 1000 g durante 3 minutos.

20 Una electroforesis realizada sobre gel de agarosa al 1%, en un tampón TBE pH 8,3 (depósito de 10  $\mu$ l de una solución diluida a la 10<sup>a</sup>), 20 minutos a 100 V permite poner en evidencia la modificación de la superficie de los nanocrystal; en efecto, el compuesto modificado por unos grupos ciclooctinos migra de forma diferente en comparación con el producto de partida.

Asimismo, unos espectros de absorción grabados a 488 nm sobre un espectrofotómetro CARY 300 scan de Varian, y unos espectros de fluorescencia grabados a 488 nm sobre un espectrofotómetro LS50B de Perkin Elmer muestran que las propiedades ópticas de los QDots no están modificadas por el acoplamiento de los grupos ciclooctinos en la superficie.

25 El rendimiento cuántico es del 108% con respecto al producto de partida, medido en el PBS.

### Ejemplo 2

Comparación del injerto de un azúcar sobre unos Qdots-alquinos lineales y unos Qdots-ciclooctinos preparados según el ejemplo 1

#### 1. Síntesis y caracterización de los QDots-alquinos lineales

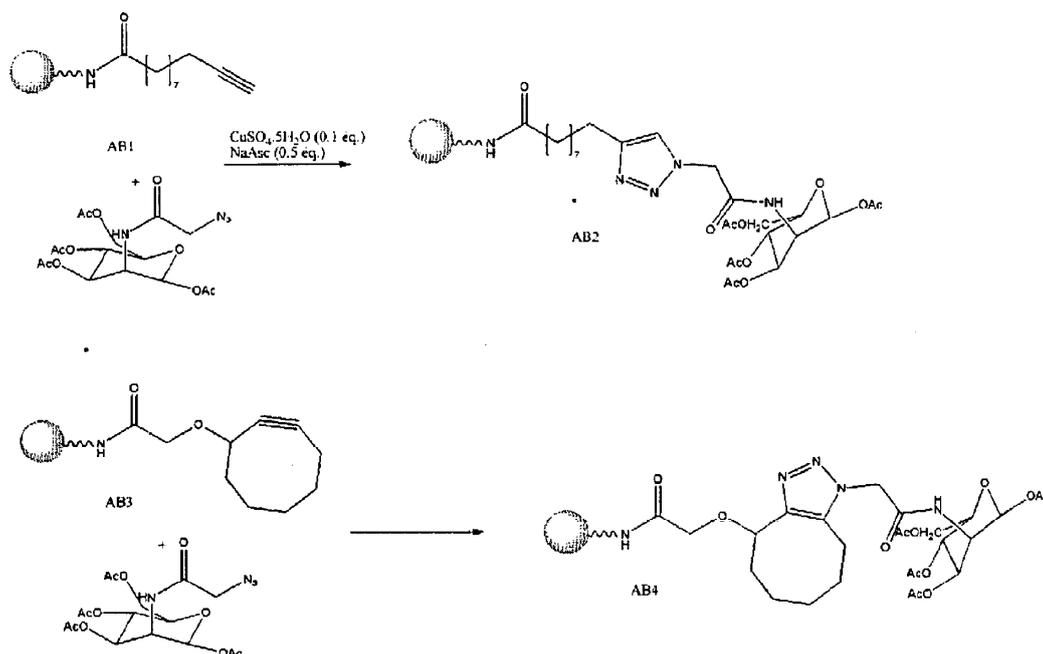
30 Antes de la reacción, los QDots ITK 525 aminoPEG de Invitrogen son transferidos del tampón borato de almacenamiento en el PBS: para ello, se filtran 60  $\mu$ l de solución a 8  $\mu$ M sobre unos filtros Microcon<sup>®</sup> durante 5 minutos a 5000 g (por centrifugación), y después se aclaran con el mismo volumen de PBS por centrifugación durante 5 minutos a 3000 g, y se resuspenden en 60  $\mu$ l de PBS (1000 g durante 3 minutos, con el filtro dado la vuelta).

35 Se añaden 0,5 mg de EDC y 5  $\mu$ l de una solución de ácido undecinoico en DMSO (0,087 mg, es decir 10 equivalentes por función, 100 funciones por nanopartícula). El conjunto se agita a T<sub>a</sub>, protegido de la luz durante 1 h. Después, el producto se purifica sobre una columna de exclusión estérica G25 (Healthcare GE), previamente equilibrada con PBS. El producto se recupera en una fracción que se concentra después sobre filtros Micricon<sup>®</sup> a 3000 g durante 5 minutos, y se resuspende en 60  $\mu$ M a 1000 g durante 3 minutos.

40 Los QDots se caracterizaron por electroforesis sobre gel y sus propiedades ópticas se determinaron según el protocolo descrito en el ejemplo 1.

#### 2. Comparación del injerto de un azúcar sobre QDots-alquinos lineales y Qdots-ciclooctinos

El acoplamiento de un azúcar que lleva una azida se realizó paralelamente sobre los Qdots-alquinos lineales y sobre los QDots-ciclooctinos sintetizados según los dos esquemas de reacción respectivos siguientes.



- acoplamiento "clic" clásico entre QD-alquinos lineales y  $\text{Ac}_4\text{ManNAz}$ :

5 A una solución de 20% L de QDots en PBS se añaden 5  $\mu\text{l}$  de una solución de  $\text{Ac}_4\text{ManNAz}$  en el DMSO (10 equ. por función reactiva) y 2  $\mu\text{l}$  de una solución  $\text{CuSO}_4$  1 mM/ascorbato de sodio 5 mM ) (0,1 equ.). El conjunto se agita a temperatura ambiente durante 3h, y después los QD se purifican sobre filtros Microcon por aclarado con PBS (1 aclarado o 5 aclarados) a 3000 g durante 3 minutos. Los QDots se caracterizan después por electroforesis sobre gel y se determinan sus propiedades ópticas.

- acoplamiento entre QD-ciclooctino y  $\text{Ac}_4\text{ManNAz}$ :

10 A una solución de QDots en PBS (20  $\mu\text{l}$ ) se añade una solución de  $\text{Ac}_4\text{ManNAz}$  en el DMSO (5  $\mu\text{l}$ , 10 equ. por función reactiva). Después, el conjunto se agita a temperatura ambiente durante 3h; después se purifican los QD sobre filtros Microcon por aclarado con PBS (1 aclarado) a 3000 g durante 3 minutos. Los QDots obtenidos son después caracterizados por electroforesis sobre gel y se determinan sus propiedades ópticas.

15 Los productos de acoplamiento obtenidos se caracterizan en términos de espectro de fluorescencia según el protocolo descrito en el ejemplo 1, y parece claramente que el rendimiento cuántico de los Qdots-alquinos lineales está muy ampliamente disminuido, mientras que el de los Qdots-ciclooctino modificados sigue siendo elevado con respecto al producto de partida.

La figura 1 muestra los rendimientos cuánticos de los QDots modificados por "química clic".

20 Además, el enfriamiento debido a la presencia de  $\text{Cu(I)}$  es irreversible: incluso después de varios ciclos de filtración sobre filtro Microcon<sup>®</sup>/aclarado con PBS, el rendimiento cuántico del producto AB2 no vuelve al nivel del producto de partida (este último disminuye incluso debido a este tratamiento).

Ejemplo 3:

Funcionalización de láminas de vidrio

Los QDots-ciclooctinos sintetizados, tales como se describe en el ejemplo 1, son utilizados para realizar una reacción de cicloadición sobre superficie de vidrio funcionalizada por unas azidas.

25 Unas gotas de la solución de QDots de partida y de QDot-ciclooctinos son incubadas a temperatura ambiente en PBS durante 1h, después las láminas se aclaran y las láminas se observan con el escaner GeneTacIV bajo excitación a 488 nm. Se observa poca señal no específica (sedimentación parcial de las nanopartículas) mientras que la señal específica es claramente más intensa y dependiente de la concentración.

Ejemplo 4:

30 Marcado celular *in vivo*

Los QDots-ciclooctinos sintetizados tales como se describen en el ejemplo 1 son utilizados para realizar un marcado celular. El objetivo es realizar imágenes de la incorporación metabólica de ácidos siálicos modificados por unas azidas en las superficies membranas de células CHO en cultivo.

- 5 La figura 2 ilustra el principio de la incorporación metabólica de  $Ac_4ManNAz$  y su transformación en ácido siálico portador del grupo  $N_3$ , el cual se encuentra después incorporado en los proteoglicanos expresados en las membranas celulares y permite el marcado en una segunda etapa por una reacción clic con los QDots-ciclooctinos.

La incorporación de una manosamina modificada por la azida ( $Ac_4ManNAz$ ) durante 3 días se reveló después por incubación durante 4h a  $4^\circ C$  con la sonda QDot-ciclooctinos, y después se observó por microscopía de fluorescencia.

- 10 Un control negativo se obtiene por incorporación idéntica de una manosamina que no lleva la modificación azida ( $Ac_4ManNAc$ ). Los núcleos de las células se marcaron por DAPI. Un marcado muy claro de las membranas es visible en el caso de la incubación con los Qdot-ciclooctinos, que permite validar la utilización de tales objetos para la formación de imágenes.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento útil para modificar en superficie un nanocrystal semiconductor que comprende al menos las etapas que consisten en:
- 5 - disponer de un nanocrystal semiconductor cuya capa de revestimiento orgánico está provista, en la superficie externa del nanocrystal, de al menos un grupo G1 reactivo según una reacción de cicloadición de tipo "química clic", y
- llevar dicho nanocrystal con un material anexo provisto en la superficie de al menos un grupo G2 complementario del grupo G1 frente a dicha reacción de "química clic", en condiciones propicias para la interacción de dichos grupos G1 y G2,
- 10 caracterizado por que dichos grupos G1 y G2 son respectivamente una azida y un radical cicloalquinilo forzado, o a la inversa.
2. Procedimiento según la reivindicación anterior, en el que la capa de revestimiento orgánico de dicho nanocrystal semiconductor comprende al menos un ligando específico que responde a la fórmula general (I):
- $$(I) \quad L-X-E-A-G$$
- 15 en la que:
- L es un ligando quelante,
- E es un grupo espaciador orgánico,
- X es el producto de reacción de una función reactiva presente en el ligando L con una función reactiva complementaria presente en el grupo espaciador orgánico de dos funciones reactivas,
- 20 - A representa un enlace simple o un grupo seleccionado entre -CONH-, -NHCO-, -OCH<sub>2</sub>CONH-, -NHCOCH<sub>2</sub>O-, -O-, -S-, y
- G es un radical azida o cicloalquinilo forzado.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que el grupo G1 presente en la capa de revestimiento orgánico de dicho nanocrystal semiconductor es un radical cicloalquinilo forzado.
- 25 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el radical cicloalquinilo forzado es un radical ciclooctinilo.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho nanocrystal semiconductor tiene una estructura núcleo/concha(s), estando dicho núcleo constituido por un nanocrystal constituido de al menos un metal y/o al menos un compuesto semiconductor, mientras que la(las) concha(s) está(n) cada una constituida(s)
- 30 de una capa de un metal y/o de al menos un compuesto semiconductor que comprende al menos un metal.
6. Procedimiento según la reivindicación anterior, en el que el núcleo es de un primer compuesto semiconductor de tipo A(II)B(VI) en el que A representa un metal o un metaloide en estado de oxidación +II y B representa un elemento en estado de oxidación -II, tal como CdSe, o un compuesto C(III)D(V) en el que C representa un metal o un metaloide en estado de oxidación +III y D representa un elemento en estado de oxidación -III tal como InP, mientras
- 35 que la concha que rodea el núcleo o la primera concha que rodea el núcleo, es de un segundo compuesto semiconductor de tipo A(II)B(VI) diferente del primer compuesto semiconductor, seleccionado entre ZnSe, ZnS y CdS.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la reacción se realiza a temperatura ambiente y en medio acuoso.
- 40 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el material anexo es un sustrato seleccionado entre superficies de tipo metálicos, semiconductores, óxidos, tales como alúminas, SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub> y orgánicos.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el material anexo es una molécula de interés.
- 45 10. Procedimiento según la reivindicación anterior, en el que la molécula de interés se selecciona entre los marcadores, los colorantes, los fluoróforos, los linkers, los activos terapéuticos, cosméticos, fitosanitarios, los miembros de un par ligante específico, los péptidos, los aminoácidos, cosméticos, fitosanitarios, los miembros de un par ligante específico, los péptidos, los aminoácidos, y los residuos de aminoácido, los polipéptidos, los azúcares y

los residuos de azúcar, los fotosensibilizadores, las porfirinas de los compuestos que presentan una isomería cis-trans, tales como los derivados de los diariletlenos, de los espiropiranos, de las spiroxazinas, de las fulgidas o del azobenceno.

5 11. Nanocristal semiconductor cuya capa de revestimiento orgánico está provista, en la superficie externa del nanocristal, de al menos un radical cicloalquinilo forzado y reactivo frente a una azida según una reacción de cicloadición de tipo "química clic".

12. Nanocristal semiconductor según la reivindicación anterior, cuya capa de revestimiento de solubilización comprende al menos un ligando específico que responde a la fórmula general (I):



10 en la que:

- L es un ligando quelante,

- E es un grupo espaciador orgánico,

- X es el producto de reacción de una función reactiva presente en el ligando L con una función reactiva complementaria presente en el grupo espaciador orgánico,

15 - A representa un enlace simple o un grupo seleccionado entre -CONH-, -NHCO-, -OCH<sub>2</sub>CONH-, -NHCOCH<sub>2</sub>O-, -O-, -S-, y

- G es un radical cicloalquinilo forzado.

13. Nanocristal según la reivindicación 11 ó 12, en el que el radical cicloalquinilo forzado es un radical ciclooctinilo.

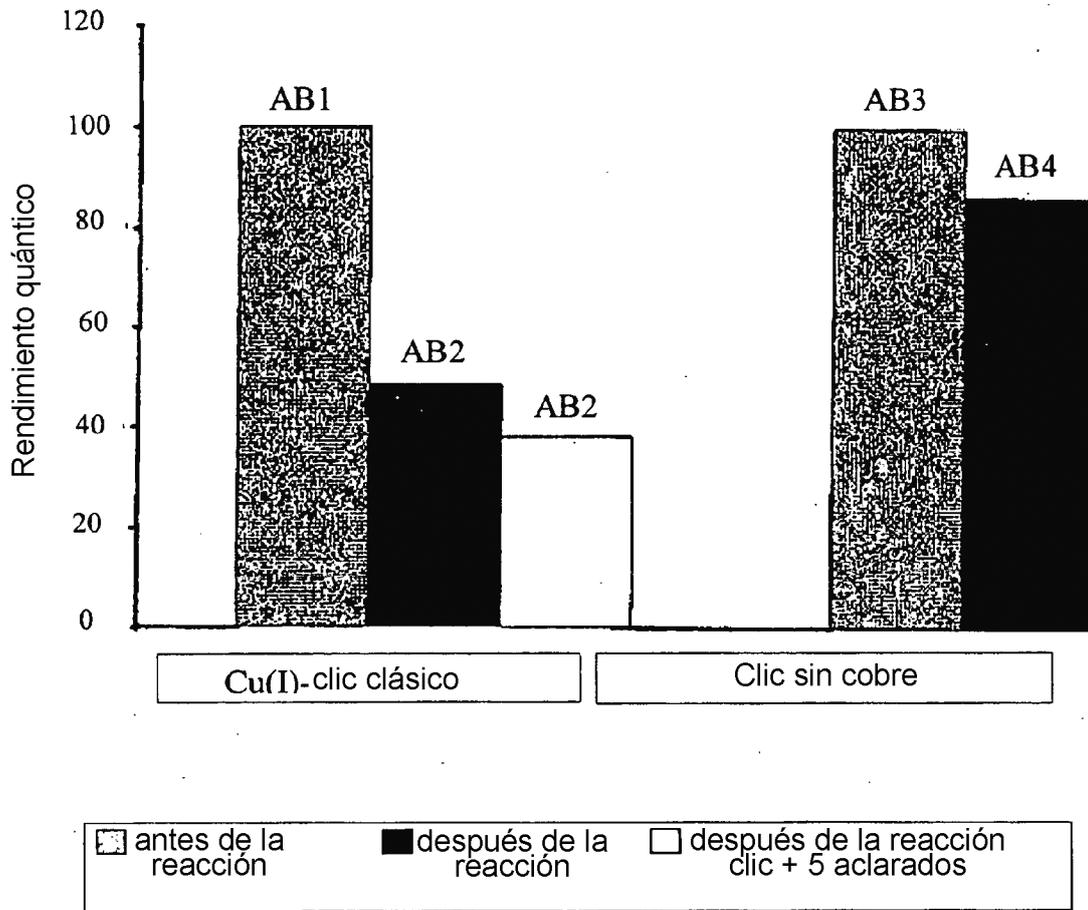


Figura 1

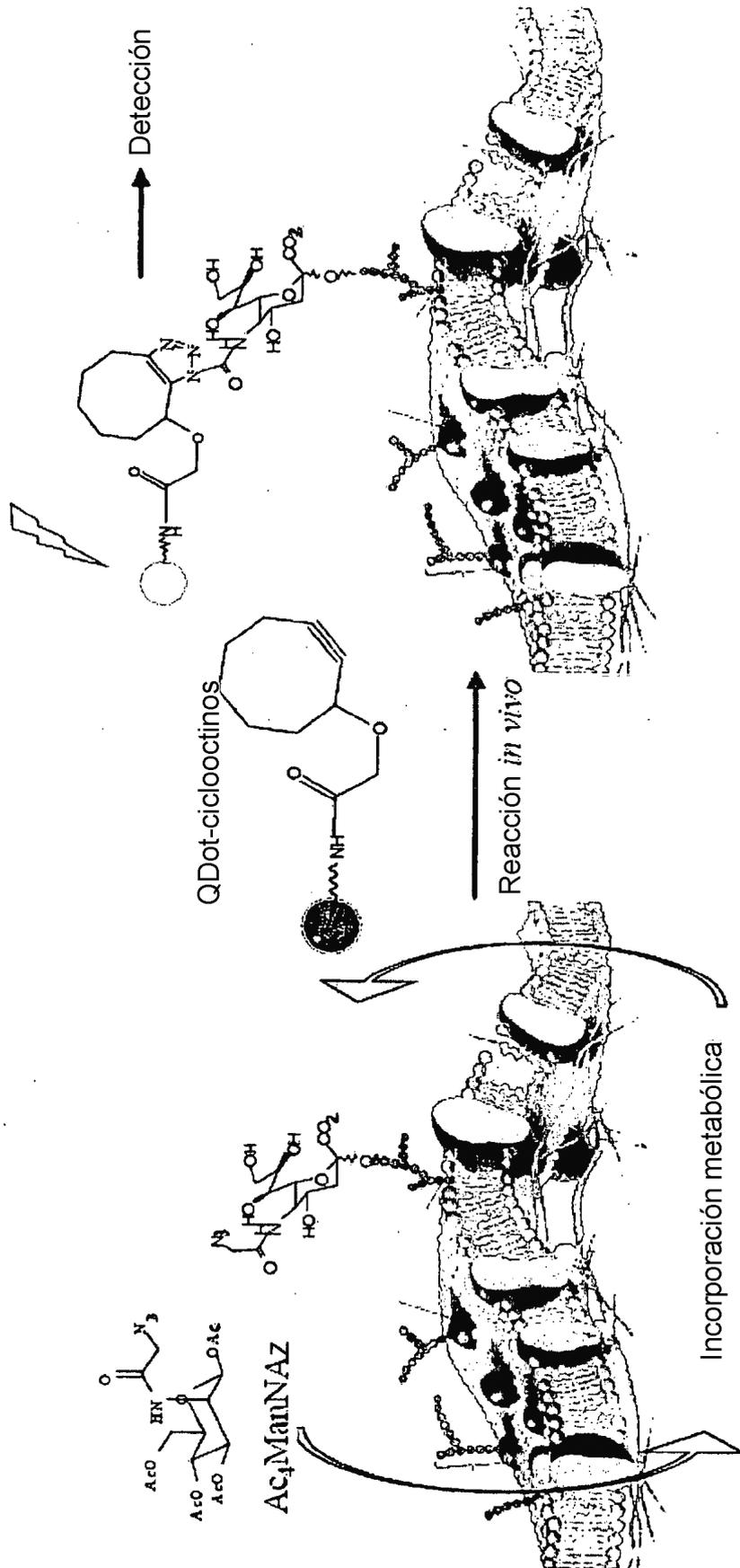


Figura 2