

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 998**

51 Int. Cl.:

A61K 47/50 (2007.01)

A61K 49/00 (2006.01)

C09K 11/02 (2006.01)

C09K 11/88 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2005 E 05025022 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017 EP 1787659**

54 Título: **Nanopartículas fluorescentes**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.08.2017

73 Titular/es:

**EXCHANGE IMAGING TECHNOLOGIES GMBH
(100.0%)
Prinz-Christians-Weg 16
64287 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:

**LAARMAN, SVEN;
ZELLER, KATHRIN;
MITTMANN, KARIN y
BLOCK, CHRISTOPH**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 627 998 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 fluorescentes

La invención se refiere a nanopartículas fluorescentes con una aplicabilidad particular como diagnóstico *in vivo*, en particular como agente de contraste para la discriminación de diferentes tipos de tejidos.

- 5 Para multitud de enfermedades es de importancia decisiva un diagnóstico tan temprano y significativo como sea posible, para la elección así como la determinación y conducción de las medidas médicas necesarias. Esto es válido sobre todo para una multiplicidad de tipos de tumores, para cuya determinación y terapia (incluyendo posibles disecciones) es esencial la discriminación entre tejidos sanos y cancerígenos. De acuerdo con ello, la recuperación o incluso la supervivencia de un paciente depende de manera determinante de si y en qué medida, el
- 10 médico tratante y/o el cirujano pueden diferenciar entre diferentes tipos de tejidos.

Para el mejoramiento del diagnóstico y de las medidas medicinales, ya en el pasado se desarrollaron agentes de contraste, con cuya ayuda pueden hacerse visibles funciones y estructuras en el cuerpo mediante procedimientos de formación de imágenes. Estos procedimientos son usados entre otros para la detección focalizada de modificaciones celulares asociadas con el cáncer.

- 15 Así por ejemplo Hsu et al. (2004) ("A far-red fluorescent contrast agent to image epidermal growth factor receptor expression", *Photochemistry and Photobiology*, 79 (3): 272-279) han desarrollado un agente de contraste con especificidad molecular, a base de un fluoróforo orgánico como marcador para la transformación carcinogénica temprana. Para ello aquí se explota la sobreexpresión asociada con tumores del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR, *epidermal growth factor receptor*), para identificar tejidos modificados en la cavidad bucal
- 20 mediante un conjugado de anticuerpo anti-EGFR que tiene fluorescencia roja (Alexa660).

En general, es una desventaja de los fluoróforos orgánicos, su metabolización en el cuerpo, en la cual se inactiva o degrada el fluorocromo. La metabolización contrarresta con ello la elevada intensidad de marcación necesaria para el diagnóstico. Con el aumento en el tiempo de residencia del fluoróforo orgánico *in vivo*, se agrava este problema y representa una notable dificultad en particular en la marcación de células en capas más profundas de tejidos.

- 25 Además, en particular los fluoróforos orgánicos que emiten longitudes de onda más largas tienen la desventaja de que se reduce su rendimiento cuántico por el proceso de conjugación química. Además, los fluoróforos orgánicos son muy susceptibles frente al fotoblanqueamiento ("*photo bleaching*"), lo cual puede conducir a una sustancial pérdida de fluorescencia ya después de una breve irradiación. Debido a ello, un agente de contraste a base de estos fluoróforos exhibe una muy baja fuerza de fluorescencia y muy baja estabilidad para largas duraciones de
- 30 excitación, para ser adecuado para la detección/marcación de células en las capas más profundas de los tejidos ("formación de imágenes de tejidos profundos"). Así, se desprende del estudio de Hsu et al. (2004) que el conjugado Alexa660 exhibe una profundidad de penetración de máximo 0,5 mm, de modo que ya no es posible de manera útil una detección de la fluorescencia.

- 35 Otra posibilidad conocida para la marcación por fluorescencia de modificaciones celulares consiste en el uso de los denominados puntos cuánticos (QDs), los cuales son nanopartículas fluorescentes con un tamaño de unos pocos nanómetros, cuyo núcleo consiste en materiales semiconductores como CdSe, CdTe, InP o similares.

El documento WO2005/001889 desvela el uso de puntos cuánticos no pasivados, para la localización de un objetivo *in vivo*.

- 40 Sin embargo, los QD conocidos muestran en su uso en sistemas biológicos el denominado fenómeno de "parpadeo", es decir las nanopartículas cambian entre un estado fluorescente y uno no fluorescente. Este fenómeno hace imprácticos los puntos cuánticos, en particular para la aplicación *in vivo*. Además, el "parpadeo" puede denotar también una descomposición del núcleo de la nanopartícula, debido a lo cual su cadmio tóxico puede ser liberado en el cuerpo. Esto es particularmente desventajoso puesto que los puntos cuánticos se acumulan en el cuerpo, por ejemplo en el hígado o en el bazo.

- 45 De acuerdo con ello, la presente invención basa el objetivo en preparar nanopartículas fluorescentes, que exhiban una particular aplicabilidad para el uso como diagnóstico, en particular como agente de contraste *in vivo*.

- El objetivo se logra de acuerdo con la reivindicación principal. Las formas ventajosas de realización son objetivo de las reivindicaciones subordinadas o bien de reivindicaciones secundarias separadas. Las nanopartículas de acuerdo con la invención pueden ser usadas tanto *in vitro* como también *in vivo* para la marcación específica de
- 50 estructuras o funciones biológicas elegidas.

Las nanopartículas de acuerdo con la invención comprenden por lo menos tres estructuras, es decir un núcleo inorgánico, que está cubierto con una capa de pasivación la cual a su vez porta ligandos específicos, en la que los

ligandos específicos pueden ser también parte de la capa de pasivación. Estos conducen a la unión específica de la nanopartículas a la molécula diana ("diana") del sistema biológico. El núcleo inorgánico de las nanopartículas de acuerdo con la invención, con la capa de pasivación que lo circunda exhibe un diámetro hidrodinámico de no más de 15, preferiblemente no más de 10 nm. De modo particular se prefieren diámetros termodinámicos de no más de 8 nm o no más de 5 nm.

La capa de pasivación es conveniente sobre todo para el objetivo de aumentar la intensidad de fluorescencia así como la estabilidad química y física del núcleo inorgánico. Los núcleos inorgánicos cubiertos con la capa de pasivación se caracterizan por un rendimiento cuántico de por lo menos 10 %, ventajosamente por lo menos 30, 50 o incluso 70 %. Al respecto, se entiende por rendimiento cuántico la relación de la cantidad de luz emitida por una muestra a la cantidad de luz absorbida por la muestra. La capa de pasivación exhibe de manera ventajosa un espesor de no más de 1 nm. El diámetro del núcleo pasivado aumenta en este caso en no más de 2 nm.

De manera ventajosa, las nanopartículas están dotadas en cada caso aún con modificadores, en particular para el mejoramiento de la compatibilidad con el ambiente biológico. Preferiblemente, el aumento del radio hidrodinámico por el uso de modificadores no supera 2 nm. El espesor de la capa de pasivación y los modificadores depende en cada caso también de las relaciones mutuas de ambas estructuras y de la relación con el núcleo inorgánico.

Debido a la limitación de tamaño, las nanopartículas de acuerdo con la invención exhiben una particular aplicabilidad para el uso como diagnóstico en pacientes vivos. De este modo, mediante la reducción de tamaño se alcanza un aumento en la velocidad de difusión y la profundidad de penetración en el tejido. Esto permite una dispersión uniforme y rápida de las nanopartículas en el ambiente biológico así como una penetración tan amplia como es posible en tejido (por ejemplo un tumor) después de una aplicación local. Así mismo, las nanopartículas de acuerdo con la invención permiten una aplicación sistémica, que también puede ocurrir mediante una inyección. También es posible una aplicación local, por ejemplo tópica.

Formas de realización particularmente ventajosas de las nanopartículas de acuerdo con la invención exhiben un diámetro hidrodinámico de no más de 8, de modo particular preferiblemente de no más de 4 nm. Las nanopartículas de este orden de tamaño pueden ya ser excretadas en los riñones, de modo que no se acumulan en el cuerpo o lo hacen claramente menos. Con ello, las nanopartículas de acuerdo con la invención reducen notablemente el problema de la toxicidad a largo plazo, asociada presumiblemente con los puntos cuánticos conocidos.

En otra forma de realización ventajosa, las nanopartículas de acuerdo con la invención emiten un espectro de fluorescencia entre 600 y 700 nm, de modo particular preferiblemente de 600 a 650 nm, en particular preferiblemente 620 a 650 nm. Este espectro de emisión tiene como ventaja la transmisión tan alta como es posible en los tejidos, debido a una sólo baja absorción por la hemoglobina y otras sustancias que absorben luz en el sistema vivo (incluyendo agua). La luz de estas longitudes de onda es bien para el ojo humano todavía perceptible, de modo que es posible la identificación por el médico tratante del tejido marcado, sin otras costosas ayudas técnicas para la detección (por ejemplo cámaras CCD). Esto es ventajoso en particular en la aplicación nanopartículas de acuerdo con la invención como agente de contraste durante una intervención quirúrgica, para la discriminación del tejido (por ejemplo) cancerígeno y saludable.

Es de particular ventaja cuando el núcleo inorgánico de las nanopartículas de acuerdo con la invención consiste esencialmente en semiconductores. Dependiendo de su tamaño individual y/o composición, estos núcleos emiten luz en diferentes colores, pero absorben en todo el ancho de banda en el mismo intervalo del espectro de luz (intervalo UV a VIS). Debido al elevado "desplazamiento de Stokes", los espectros de excitación y emisión son muy diferentes, lo cual hace posible un estímulo sencillo y simultáneo de diferentes puntos cuánticos. Ellos exhiben espectros de emisión estrechos y simétricos, que no se traslapan o bien lo hacen sólo levemente. Otras propiedades positivas, que son de gran importancia en particular para la mejora de la penetración profunda y la marcación *in vivo*, representan el elevado rendimiento cuántico de hasta 80% y la elevada fotoestabilidad.

A partir del documento WO2005/001889 se conocen puntos cuánticos que pueden representar los núcleos inorgánicos de las nanopartículas de acuerdo con la invención. De acuerdo con ello, es un núcleo inorgánico de una aleación de por lo menos dos semiconductores, que están distribuidos de manera homogénea o presenta para el interior de la aleación en cada caso un gradiente de concentración. Respecto a la divulgación de la naturaleza y la fabricación de estos puntos cuánticos, se remite al documento WO2005/001889 citado anteriormente. Los núcleos pueden desviarse en su tamaño en cada caso en 5 %.

De acuerdo con ello, el núcleo inorgánico de las nanopartículas de acuerdo con la invención puede comprender una aleación de por lo menos dos semiconductores, en las que el núcleo exhibe una composición homogénea y está caracterizado por una "energía de brecha de banda", que no es lineal respecto a la relación molar de los dos semiconductores. De modo alternativo, el núcleo puede estar constituido de manera no homogénea, en el que la

concentración del primer semiconductor se eleva gradualmente desde el centro del núcleo hasta la superficie del núcleo y la concentración de segundo semiconductor se reduce gradualmente desde el centro del núcleo hasta su superficie.

5 De modo similar es válido para ambos núcleos que por lo menos uno de los semiconductores es un semiconductor de grupo II - grupo VI o un semiconductor del grupo III - grupo V (la definición de grupos corresponde a los grupos del sistema periódico de elementos). Por ejemplo, la aleación puede ser elegida de entre el grupo de las siguientes aleaciones: CdSeTe, CdSSe, CdSTe, ZnSeTe, Zn-CdTe, CdHgS, CdHgTe, InGaAs, InGaP, GaAlAs, In-GaN. Estos núcleos pueden portar además un recubrimiento de materiales inorgánicos como por ejemplo semiconductores (por ejemplo ZnS). Esta capa adicional es conocida por los expertos como "tapa" o "concha".

10 Los semiconductores del grupo II - grupo VI y grupo III - grupo V son conocidos en general y contienen por ejemplo $CdS_{1-x}Se_x$, $CdS_{1-x}Te_x$, $CdSe_{1-x}Te_x$, $ZnSe_{1-x}Te_x$, $Zn_{1-x}Cd_xTe$, $Cd_{1-x}Hg_xS$, $Cd_{1-x}Hg_xTe$, $In_{1-x}Ga_xAs$, $Ga_{1-x}Al_xAs$ e $In_{1-x}Ga_xP$. Preferiblemente se usan los semiconductores $CdSe_{1-x}Te_x$, $CdS_{1-x}Te_x$, $ZnSe_{1-x}Te_x$, $Zn_{1-x}Cd_xTe$, $Cd_{1-x}Hg_xS$, $Cd_{1-x}Hg_xTe$, $In_{1-x}Ga_xAs$, $In_{1-x}Ga_xP$, en los que x es una fracción de 0 a 1.

15 La relación molar de los semiconductores puede adoptar cualquier relación. Sin embargo, si es el caso que la aleación comprende CdSSe, se prefiere una aleación con la fórmula molecular $CdS_{1-x}Se_x$. En el caso en que la aleación incluya CdSTe, se prefiere una aleación con la fórmula molecular $CdS_{1-x}Te_x$. En el caso en que la aleación incluya ZnSeTe, se prefiere una aleación con la fórmula molecular $ZnSe_{1-x}Te_x$. En el caso en que la aleación incluya ZnCdTe, se prefiere una aleación con la fórmula molecular de sólo CdTe. En estos datos, en cada caso x es una fracción entre 0 y 1.

20 Estos núcleos inorgánicos preferidos de las nanopartículas de acuerdo con la invención pueden ser fabricados con las siguientes etapas: (i) la preparación de una primera solución bajo condiciones que hacen posible la formación de nanocristales, (ii) preparación de una segunda solución, que comprende un precursor del semiconductor con una relación molar bajo una condición que no hace posible una formación de nanocristales, (iii) adición de la segunda solución a la primera solución, lo cual hace posible una formación de nanopartículas, y (iv) modificación de las condiciones que detienen/suspenden el crecimiento de los nanocristales y su formación. El procedimiento para la fabricación de los núcleos es representado en el documento WO 2005/001889, al cual se hace referencia respecto a la divulgación de la fabricación de estas formas de realización preferidas del núcleo inorgánico de las nanopartículas de acuerdo con la invención.

25 En una forma alternativa de realización, el núcleo inorgánico puede consistir esencialmente en una agrupación de metales nobles, la cual comprende preferiblemente entre 2 y 27 átomos de metales nobles. En una forma preferida de realización, el metal noble fue elegido de entre un grupo consistente en oro, plata, cobre, platino, paladio, osmio, iridio, rutenio y rodio. La agrupación puede exhibir cargas variables.

30 Estos núcleos tienen como ventaja que, debido a su fuerte absorción y emisión, son fácilmente detectables como los denominados "nanopuntos" individuales, con una débil excitación de lámpara de mercurio. Las nanopartículas de acuerdo con la invención con este núcleo son usadas de manera ventajosa como etiquetas fluorescentes de molécula individual y de masas.

35 En el sentido de la presente invención, el concepto "metal noble" se refiere a un grupo de elementos elegidos de entre un grupo consistente en oro, plata y cobre y el grupo de los metales de platino (PGM) platino, paladio, osmio, iridio, rutenio y rodio. En formas preferidas de realización de la presente invención, los metales nobles se eligen de entre el grupo consistente en oro, plata y cobre. En una forma de realización preferida de modo particular, el metal noble es plata u oro.

40 El concepto "agrupación" se refiere a una unión de 2-27 átomos de un metal. Entre otras, se conocen agrupaciones del ámbito de la catálisis química, de la cerámica, de la tecnología de semiconductores y las ciencias de materiales. Por ello, su fabricación es familiar para los expertos. El documento WO2004/003558 describe entre otras, la fabricación de agrupaciones de metales nobles y contiene además extensos datos de literatura adicionales. En particular se manifiesta la fabricación de nanoagrupaciones de metales nobles, que están asociados con moléculas orgánicas. Al respecto, se entiende el concepto asociación como toda forma de unión, independientemente de la naturaleza química o física de la unión (así por ejemplo enlace covalente, no covalente, electrostático o de van-der-Waals). Respecto a la fabricación de las nanoagrupaciones como núcleos de las nanopartículas de acuerdo con la invención, se hace referencia al documento WO2004/003558.

45 Las nanopartículas de acuerdo con la invención exhiben una capa de pasivación, que aumenta la intensidad de la fluorescencia y mejora la estabilidad química y física del núcleo inorgánico. Con ello, las nanopartículas emiten luz preferiblemente con un rendimiento cuántico mayor a 10 %, preferiblemente mayor a 50 %.

Las nanopartículas de acuerdo con la invención exhiben en un ambiente acuoso a 4 °C preferiblemente una

estabilidad al almacenamiento de por lo menos 12 meses y son estables preferiblemente en un intervalo de pH de pH 5 a pH 10, es decir muestran desviaciones menores 50 % respecto a su característica espectral específica como rendimiento cuántico, ubicación del máximo de emisión, ancho medio del espectro de emisión. Las partículas preferidas muestran desviaciones inferiores a 10 % respecto a esta característica espectral específica.

- 5 También, bajo condiciones biológicas o bien *in vivo* muestran por un espacio de tiempo de por lo menos tres días, esencialmente una constancia/estabilidad de las propiedades del núcleo (incluyendo la capa de pasivación que lo circunda). Las partículas preferidas muestran una constancia/estabilidad tal por un espacio de tiempo de 7 a 14 días hasta varias semanas, en las que en el sentido de la invención se entiende como constancia una desviación/modificación de una o todas las propiedades mencionadas anteriormente, de 50 %. De modo particular
10 preferiblemente, las partículas muestran una desviación/modificación inferior a 10 %.

La capa de pasivación contiene por lo menos un compuesto que está en capacidad de coordinar átomos metálicos o iones metálicos, por ejemplo iones de zinc, mercurio o cadmio. Este compuesto puede ser una base Lewis o un compuesto insaturado cíclico o lineal, con electrones resonantes. Como compuesto insaturado cíclico puede ser también un heterociclo o bien un heteroaromático. En una forma preferida de realización, los grupos insaturados o
15 conjugados se encuentran en una posición terminal respecto a la estructura de la molécula. Además, la capa de pasivación puede exhibir un agente de entrecruzamiento o el compuesto insaturado cíclico o lineal puede actuar también como agente de entrecruzamiento.

Los compuestos que coordinan átomos metálicos o iones metálicos se pueden unir de manera funcional mediante formación de quelatos, coordinación o propiedades donantes de electrones de bases Lewis, a núcleos inorgánicos
20 fluorescentes y de modo correspondiente exhibir fracciones/grupos conjugados. Estas moléculas pueden contener además fracciones, que promueven solubilidad o humectabilidad en soluciones acuosas de los núcleos, que están recubiertos con ellas.

Estas moléculas o compuestos pueden comprender un sistema de anillo homogéneo o heterogéneo (heterocíclico) con uno, dos o más anillos unidos (o también condensados). son sistemas heteroaromáticos preferidos por
25 ejemplo tiazoles, derivados de tiazol, oxazoles, derivados de oxazol, pirroles, derivados de pirrol incluyendo oligómeros de polipirrol dotados o no dotados, tiofenos, derivados de tiofeno incluyendo politiofenos dotados y no dotados, furanos, derivados de furano, piridina y derivados de piridina, pirimidina y sus derivados, pirazinas, derivados de pirazina, triazina y derivados de triazina, triazoles, derivados de triazol, ftalocianinas y derivados de ftalocianina, porfirina y derivados de porfirina. Estos compuestos pueden comprender hidrocarburos insaturados
30 (olefínicos) o sus derivados de amina, fósforo u oxígeno, que pueden incluir acetileno, propino y aleno, pero no están limitados a estos. Se prefiere que la molécula exhiba una densidad suficiente de electrones p o pi, para participar en la formación de productos de adición o en la resonancia sobre la superficie del núcleo de semiconductor.

El compuesto heteroaromático es preferiblemente un componente de imidazol. Además, preferiblemente se añade como agente de entrecruzamiento un compuesto de alquifosfina.
35

Con el concepto "componente de imidazol" se entiende en el sentido de esta descripción una molécula heterocíclica o heteroaromática, que contiene por lo menos un grupo imidazol (incluyendo derivados de imidazol), y que está disponible para la formación del núcleo inorgánico o la capa de pasivación con un metal como cadmio, zinc, galio o un catión metálico o un sustrato que contiene tal catión. En esta relación, preferiblemente por lo
40 menos un grupo imidazol debería estar en una posición terminal respecto a la estructura de la molécula. El componente de imidazol se une en su forma funcional al anillo, el cual contiene orbitales moleculares deslocalizados, en el nanocristal fluorescente. Usualmente los nitrógenos del anillo de imidazol sirven como ligando de coordinación, para unir de manera funcional un ion metálico como cadmio o zinc.

En una forma de realización, el componente de imidazol comprende grupos funcionales reactivos como uno o dos aminoácido(a), por ejemplo histidina, carnosina, anserina, baleina, homocarnosina, histidilfenilalanina, ciclohistidilfenilalanina, 5-amino-4-imidazolcarboxamida, histidilleucina, 2-mercaptoimidazol, boc-histidina, hidrazida, histinol, 1-metilhistidina, 3-metilhistidina, imidazolisina, ornitina que contiene imidazol (por ejemplo 5-metilimidazol), alanina que contiene imidazol (por ejemplo (beta)-(2-imidazolil)-l(alfa)alanina), carzinina, histamina. Estas moléculas a base de histidina o aminoácidos que contienen imidazol pueden ser sintetizados según
50 procedimientos conocidos en general.

Bajo el concepto "alquifosfina" se entiende en el sentido de la invención, una molécula que exhibe por lo menos un grupo fosfina (incluyendo sus derivados) para la unión o la formación de quelatos de un no metal como Se, S u otro no metal o de sustratos que contienen tales átomos y que suministra por lo menos un grupo funcional (por ejemplo hidroxilo, amino, tiol, carboxilo, carboxamido, etc.) para la reacción con moléculas adyacentes.

Preferiblemente por lo menos una agrupación de fosfina debería estar localizada en una posición terminal referida
55

a la estructura de la molécula. La parte de fosfina sirve como ligando de coordinación, para unir de manera funcional un no metal o ion como Se o S, con un núcleo fluorescente o un compuesto de la capa protectora.

5 En una forma preferida de realización, el compuesto que contiene alquifosfina involucra uno, dos o varios grupos fosfina acoplados mutuamente (por ejemplo en forma de polímero), que pueden incluir compuestos de hidroximetilfosfina o similares, pero no están limitados a estos. Los compuestos que contienen alquifosfina pueden ser sintetizados según procedimientos conocidos en general. Como se conoce además, los compuestos que contienen alquifosfina pueden exhibir además uno o varios grupos funcionales adicionales (por ejemplo hidroxilo, amino, tiol, carboxilo, carboxamido, etc.). Son ejemplos de derivados los derivados de hidroximetilfosfina, amidas o ésteres, en tanto la formación de derivados con las funciones aquí descritas de la alquifosfina sea compatible como recubrimiento.

10 De modo particular se prefieren tris-(hidroximetil)-fosfina y ácido β -[tris-(hidroximetil)fosfino]-propanoico, para recubrir el núcleo inorgánico fluorescente de las nanopartículas de acuerdo con la invención. En general se sabe que los compuestos entrecruzados que contienen alquifosfina tienen adicionalmente la posibilidad de unirse de manera funcional a átomos y/o iones metálicos como Zn o Cd. A este respecto, isocianatos o alquifosfina acrilatos con grupos funcionales pueden ser útiles además como agentes de entrecruzamiento para ligandos y formación de productos de adición con núcleos fluorescentes.

15 El efecto de pasivación y la capa de pasivación presentes de acuerdo con la invención son base de la protección de los átomos superficiales de cadmio o zinc o similares, mediante la formación de complejos con los compuestos heteroaromáticos o heterociclos (preferiblemente con el componente de imidazol) y la protección de los átomos contrarios (Se o S o similares) mediante la formación de complejos con los compuestos que contienen alquifosfina.

20 La capa de pasivación de las nanopartículas de acuerdo con la invención es conocida a partir del documento US 2004/0247861 A1. En este documento de divulgación se describe la fabricación de núcleos inorgánicos cubiertos con la capa de pasivación, por ejemplo de puntos cuánticos. Por ello, para propósitos de la divulgación de la fabricación de la capa de pasivación usada de acuerdo con la invención y el núcleo inorgánico recubierto con ella, se hace referencia al documento US 2004/0247861.

25 Las moléculas de la capa de pasivación pueden exhibir o portar además grupos químicos, para unir moléculas diana y células y realizar entrecruzamiento (ligandos específicos). En la presencia de reactivos correspondientes como $ZnSO_4$ y Na_2S , estas moléculas o compuestos pueden formar con las moléculas sobre el núcleo fluorescente, una capa de pasivación ("tapa" o "concha"). Estos reactivos pueden unirse de manera funcional también a átomos o iones sobre la superficie del nanocrystal fluorescente, de modo que esta capa de pasivación adicional puede formarse también inmediatamente sobre la superficie del núcleo.

30 En una forma ventajosa de realización, las nanopartículas de acuerdo con la invención pueden exhibir adicionalmente modificadores, que pueden consistir en partes orgánicas y/o inorgánicas. Ellos sirven para mejorar la compatibilidad, efectividad y/o solubilidad de las nanopartículas en un líquido o un medio de suspensión, en particular en el ambiente fisiológico. Esta modificación de superficie es ventajosa sobre todo, para alcanzar una adsorción no específica tan baja como sea posible y elevada compatibilidad en sistemas biológicos, en particular en el cuerpo humano.

35 Una posibilidad es la modificación de la superficie con el polietilenglicol (PEG) ya aprobado para determinadas aplicaciones medicinales, en particular en formas de bajo peso molecular, para mantener un bajo tamaño total de la nanopartículas. Esto puede aumentar tanto la compatibilidad biológica de las nanopartículas así como su tiempo de circulación en la sangre y también la eficiencia de absorción en las células. Mediante la combinación de una capa de PEG de bajo peso molecular con otras sustancias como vitaminas, como por ejemplo ácido fólico, puede lograrse una baja absorción de las nanopartículas en macrófagos, puesto que debido a la con ello reducida adsorción de proteína en las nanopartículas, se hace difícil un reconocimiento de las nanopartículas por el sistema inmune.

40 El recubrimiento con monosacáridos, di o trisacáridos hasta los polisacáridos de bajo peso molecular a partir de uno o diferentes monosacáridos, representa otra posibilidad para la modificación ventajosa de superficie mediante uso de modificadores. Como un tipo de realización es posible una modificación por ejemplo con poliglucosa, en la cual puede usarse dextrano, que está aprobado en medicina como sustituto de la sangre. Muestra una buena compatibilidad biológica/tolerancia. Otra forma de realización es el uso de formas (D-/L-) estereoisoméricas de los sacáridos, para contrarrestar una posible degradación.

45 Otra forma de realización es el uso como modificadores, de vitaminas hidrofílicas con compatibilidad biológica, como por ejemplo tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina, cobalamina, ácido pantoténico, ácido ascórbico y ácido fólico. De este modo por ejemplo el ácido fólico puede conducir a una unión preferida de nanopartículas sobre

células de cáncer. Esta vitamina muestra sólo una baja inmunogenicidad y con ello una elevada compatibilidad biológica. Mediante la unión al receptor de ácido fólico que está en la membrana se facilita una introducción de las nanopartículas.

5 Así mismo, es posible la modificación de la superficie con vitaminas lipofílicas como retinol, colecalfierol, tocoferol y filoquinona. De este modo, por ejemplo la vitamina E puede conducir a una elevada absorción celular de nanopartículas.

10 Ácidos grasos, como por ejemplo ácidos 1-octadeceno o 18-metileicosanoico y sus derivados, pueden aumentar la solubilidad y estabilidad de los coloides y disponen de un grupo funcional carboxilo terminal, que puede ser usado para la subsiguiente unión de ligandos específicos. Por ello, es sensato incorporar ácidos grasos como modificadores.

15 Otra forma de realización de la modificación de superficie es un recubrimiento con polialcoholes, como por ejemplo dietilenglicol (DEG), que pueden reducir particularmente bien la adsorción no específica de proteína. Igual es válido para politetrafluoroetileno (PTFE, teflón), en particular en sus formas de bajo peso molecular, debido al cual puede alcanzarse una reducida adsorción de proteína. El politetrafluoroetileno es usado frecuentemente en aplicaciones cardioquirúrgicas.

20 Así mismo, puede realizarse una modificación de superficie con uno o varios aminoácidos que ocurren de modo natural, entre los cuales se cuentan tanto los aminoácidos proteinogénicos como también los no proteinogénicos, así como aminoácidos sintéticos. Al respecto, pueden usarse ambos estereoisómeros (formas D- y L). Los di-, tri-, tetra- hasta polipéptidos pequeños de los aminoácidos mencionados anteriormente estimulan escasamente el sistema inmune y son con ello así mismo adecuados para una delgada capa de compatibilidad. Al respecto, pueden ser secuencias de aminoácidos artificiales como también secuencias de proteínas biológicas. Los péptidos descendientes de proteínas naturales como por ejemplo las fitoquelatinas pueden ser usados así mismo para la modificación de la superficie. Una modificación de superficie con péptido Tat y péptidos que contienen péptido Tat es otra posibilidad, para poner a disposición nanopartículas para el uso en aplicaciones de biomedicina. El péptido Tat es una molécula efectiva, para llevar por ejemplo nanopartículas de oro a través de la membrana celular hasta el núcleo.

30 Otra forma de realización de los posibles modificadores es la construcción de un recubrimiento de fosforilcolina. La fosforilcolina reduce una posible adsorción específica de proteína, como por ejemplo en lentes de contacto. Debido a sus propiedades no trombogénicas una modificación con fosforilcolina puede ser bien usada en sistemas biológicos y se distingue por una elevada estabilidad de largo plazo.

Puesto que el polilactato tiene compatibilidad biológica, ésta sustancia es usada en múltiples aplicaciones medicinales. En particular, formas de bajo peso molecular del polilactato son otra posibilidad de la modificación de superficie de las nanopartículas de acuerdo con la invención. Al respecto, pueden usarse ambos estereoisómeros (forma D-/L), para reducir una posible biodegradación.

35 Aparte de las modificaciones de superficie mencionadas, es posible una unión que puede escindirse de manera proteolítica, de proteínas no específicas a las nanopartículas. Esto puede causar un aumento de la compatibilidad biológica/tolerancia. En el sitio diana puede ocurrir una escisión de proteína grande, con liberación de las nanopartículas pequeñas en el tejido. Así mismo, puede ocurrir la escisión después del correspondiente tiempo de residencia. Al respecto son adecuadas de manera preferida proteínas ampliamente difundidas como por ejemplo transferrina, lactoferrina, ceruloplasmina, elastina y albúmina, aparte de otras proteínas, que reducen una adsorción no específica. De este modo por ejemplo un recubrimiento de superficie, de combinaciones de polipéptidos con elastina puede impedir la formación indeseada de trombos y con ello aumentar la compatibilidad biológica de las nanopartículas.

45 La proteína principal del suero, albúmina, pueden reducir interacciones no específicas con membranas de plasma. Adicionalmente, las correspondientes nanopartículas modificadas retienen la capacidad para formar interacciones específicas con células diana mediante unión simultánea de un ligando específico a la superficie de la partícula. Un recubrimiento con albúmina de suero puede conducir a un tiempo de circulación en la sangre esencialmente más largo, al impedir una rápida absorción por macrófagos después de la administración intravenosa, comparado con el caso de nanopartículas no recubiertas.

50 Aparte de los recubrimientos no específicos bosquejados anteriormente, las nanopartículas de acuerdo con la invención portan una marcación selectiva con ligandos específicos para la célula diana, por ejemplo están conjugadas con proteínas, anticuerpos, péptidos o, de modo particular preferiblemente, con dominios de proteína, fragmentos de anticuerpo u otras moléculas orgánicas pequeñas, de alta afinidad, que se unen por ejemplo a estructuras específicas de células de tumor u otros objetivos.

La combinación de diámetro hidrodinámico reducido, el cual conduce a las mencionadas elevadas velocidades de difusión y de perfusión, junto con las ya descritas propiedades y mejoramientos y la elevada intensidad de fluorescencia, sobre todo en el intervalo de luz del rojo visible da a las nanopartículas de acuerdo con la invención un diagnóstico sencillo, de múltiples usos para una discriminación selectiva y exacta de formas de tejido *in vivo*.

5 Estas posibilidades en combinación con marcadores biológicos específicos para tejidos sirven sobre todo para diferenciar tejidos anormales, (pre)cancerosos de tejidos normales, lo cual durante una intervención operativa soporta una evaluación visual para la disección más precisa de tumores. Las nanopartículas que pueden usarse de acuerdo con la invención sirven con ello como agente de contraste.

10 De acuerdo con la presente invención, las nanopartículas pueden ser usadas bien sea como diagnóstico, teranóstico y/o terapéutico *in vitro* o *in vivo*. Para ello pueden administrarse localmente (por ejemplo intratumoral, intramuscular o en tejidos/órganos disponibles para operaciones) o también de modo sistémico (por ejemplo intravenoso). La administración local/tópica puede ser provista como líquido, solución para atomización, gel, espuma, crema, parche activo. Esto puede ser preferido en particular en el tratamiento/diagnóstico de órganos huecos. También es posible una ingestión oral, por ejemplo como jugo o en forma de comprimidos o cápsulas.

15 Igualmente es posible una inhalación (por ejemplo atomizado). Está provista una aplicación anal mediante supositorios. En una variante, las nanopartículas pueden ser implantadas en forma de depósito.

Las nanopartículas pueden ser usadas como diagnóstico sobre todo en intervenciones quirúrgicas. Así mismo, pueden usarse en procedimientos mínimamente invasivos (por ejemplo endoscopia, laparoscopia). Es sensata una combinación con procedimientos que forman imagen como PET, MRT, CT etc.

20 Pueden ser objetivo de las investigaciones todos los tejidos/órganos disponibles del paciente, sobre todo la piel, órganos huecos (por ejemplo en el tracto gastrointestinal, -urogenital, -respiratorio) o también zonas disponibles externas de los órganos de los sentidos y también el sistema cardiovascular.

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

25

En tanto las nanopartículas pueden usarse para propósitos de terapia de acuerdo con la invención, al menos algunos de los ligandos de nanopartículas pueden portar moléculas efectoras o principios activos, es decir representan efectores. Al respecto, un efector es un ligando con una función elegida. De modo ventajoso, las nanopartículas portan tanto ligandos específicos para la localización focalizada de la nanopartícula en el cuerpo o bien en el tejido, como también un ligando con molécula efectora.

30

El efector puede permanecer unido a las nanopartículas o puede ser escindible o separable o liberable. Por ejemplo, el efector puede ejecutar su función mediante una activación/desactivación de un receptor, un enmascaramiento de estructuras (superficies), la activación del sistema inmune ("cebado"), la modulación de rutas de señal, la activación o inactivación de una enzima, la terapia de genes (por ejemplo mediante suministro dirigido de plásmidos o siARN), el suministro dirigido de toxinas/quimioterapéuticos/citoestáticos o el efecto estimulante sobre por ejemplo metabolismo, formación de hormonas, entre otros. También es posible la protección de las células, por ejemplo células B que producen insulina.

35

Ejemplo de realización:

40 Experimento *in vivo*: experimento animal con tumores xenoinjertos HT29 en ratones imberbes con inyección intratumoral de complejos anticuerpo de acuerdo con la invención

En un experimento *in vivo* en ratones con tumores xenoinjertos se mostró una "diana de tumor" específico de conjugados de anticuerpo de acuerdo con la invención. Para ello en ratones imberbes (sin timo y por ello inmunosuprimidos) se inyectaron de modo subcutáneo células cancerosas de intestino grueso humano de la línea de células HT29, que formaron tumores sólidos después de un periodo de crecimiento de 3 semanas.

45 Para una marcación selectiva del tumor se preparó un complejo de anticuerpo de acuerdo con la invención, o bien un conjugado de neutravidina de acuerdo con la invención, con un anticuerpo monoclonal biotilado unido a él. Este anticuerpo monoclonal está dirigido contra el transportador de glucosa 1 (GLUT1) de antígeno asociado con tumor ubicado en la membrana, el cual se expresa en muchas formas de carcinoma colorectal humano.

50 Después de inyección intratumoral de los complejos, los tumores fueron reconocidos visualmente ya bajo excitación UV fluorescente roja. Después de hasta 48 h luego de inyección pudieron detectarse los complejos de acuerdo con la invención en criocortes producidos de los tumores.

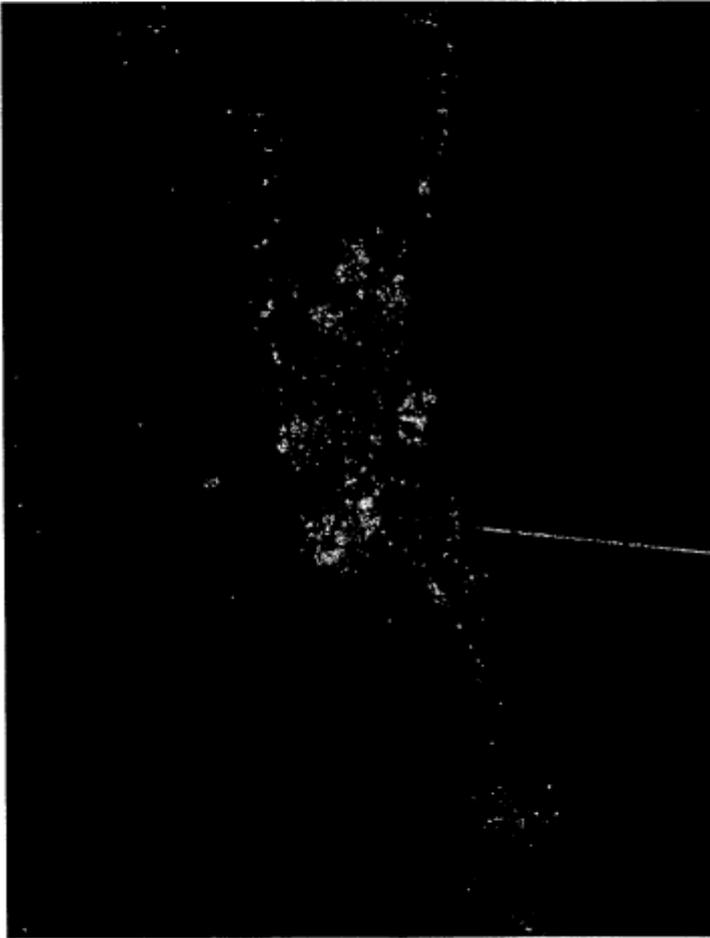
REIVINDICACIONES

- 5 1. Nanopartículas fluorescentes que contienen un núcleo inorgánico, una capa de pasivación que contiene un componente de imidazol y ligandos específicos para una molécula diana, con un diámetro hidrodinámico del núcleo inorgánico con la capa de pasivación de no más de 15 nm, preferiblemente de no más de 10 nm, de modo particular preferiblemente de no más de 5 nm, para el uso como marcación en el diagnóstico de tejidos para discriminar diferentes tipos de tejidos en intervenciones quirúrgicas, endoscópicas o mínimamente invasivas, presentando las nanopartículas una emisión inferior a 700 nm.
2. Nanopartículas fluorescentes de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizadas porque** las nanopartículas son aplicadas o inyectadas de manera sistémica, local o tópica.
- 10 3. Nanopartículas fluorescentes de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizadas porque** el núcleo inorgánico comprende una aleación de un primer semiconductor y un segundo semiconductor, en donde la concentración del primer semiconductor aumenta gradualmente desde el centro del núcleo hasta su superficie y la concentración del segundo semiconductor desciende gradualmente desde el centro del núcleo a su superficie.
- 15 4. Nanopartículas fluorescentes de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizadas porque** por lo menos uno de los semiconductores es un semiconductor del grupo II-grupo VI o un semiconductor del grupo III-grupo V.
5. Nanopartículas fluorescentes de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4, **caracterizadas porque** el núcleo comprende una aleación elegidas de entre el grupo de las siguientes aleaciones: CdSeTe, CdSSe, CdSTe, ZnSeTe, ZnCdTe, CdHgS, CdHgTe, InGaAs, GaAlAs, InGaN, InGaP, CdSe o CdTe.
- 20 6. Nanopartículas fluorescentes de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizadas porque** el componente de imidazol comprende uno o más compuestos elegidos del siguiente grupo: histidina, carnosina, anserina, baleina, homocarnosina, histidilfenilalanina, ciclohistidilfenilalanina, 5-amino-4-imidazolcarboxamida, histidilleucina, 2-mercaptoimidazol, boc-histidina, hidrazida, histinol, 1-metilhistidina, 3-metilhistidina, imidazolisina, ornitina que contiene imidazol (por ejemplo 5-metilimidazol), alanina que contiene imidazol (por ejemplo (beta)-(2-imidazolil)-(alfa)alanina), carzinina, histamina, que por su parte pueden estar sustituidas con grupos reactivos (por ejemplo amino, tiol, carboxilo o carboxamida).
- 25 7. Nanopartículas fluorescentes de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizadas porque** la capa de pasivación comprende alquifosfina y/o un derivado de alquifosfina.
- 30 8. Nanopartículas fluorescentes de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores **caracterizadas porque** las nanopartículas exhiben compuestos adicionales elegidos de entre el grupo de los siguientes compuestos: polietilenglicol, monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, polisacáridos de bajo peso molecular, vitaminas hidrofílicas, vitaminas lipofílicas, ácidos grasos, polialcoholes, teflón, aminoácidos, péptidos o proteínas no específicos, fosforilcolina, polilactato así como derivados de los compuestos mencionados.



Fig 1

Señal roja (conjugado de neutravidina y anticuerpo biotinilado contra proteína de membrana GLUT1) Es reconocible unión específica en células HT-29, aunque no en células murinas (no se logra marcación homogénea de la totalidad del tumor).



Fj.2

Señal roja (conjugado de neutravidina y anticuerpo biotinilado contra proteína de membrana GLUT1) Es reconocible unión específica en células HT-29 en el ambiente inmediato de ductos intratumorales, aunque no en células murinas (no se logra marcación homogénea de la totalidad del tumor).