

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 499**

51 Int. Cl.:

B82Y 5/00	(2011.01)	A61K 31/513	(2006.01)
B82Y 15/00	(2011.01)	A61K 31/555	(2006.01)
A61K 38/48	(2006.01)	A61K 33/24	(2006.01)
G01N 33/50	(2006.01)	B82Y 40/00	(2011.01)
C08G 85/00	(2006.01)	A61K 47/52	(2007.01)
A61K 49/00	(2006.01)		
A61P 35/00	(2006.01)		
A61K 9/16	(2006.01)		
A61K 31/337	(2006.01)		
A61K 31/4745	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.08.2014 PCT/IB2014/063729**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2015 WO15019297**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2014 E 14834890 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 3030516**

54 Título: **Síntesis de nanomateriales metal-semiconductores de tipo núcleo-corteza**

30 Prioridad:

07.08.2013 ZA 201305925

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

26.10.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF ZULULAND (100.0%)
24 Main Road
3886 KwaDlangezwa, ZA**

72 Inventor/es:

**REVAPRASADU, NEERISH y
DUNPALL, REKHA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 639 499 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

Síntesis de nanomateriales metal-semiconductores de tipo núcleo-corteza

INTRODUCCIÓN

5 Esta invención se refiere a un método para la síntesis de nanomateriales semiconductores, de tipo núcleo/corteza, y más particularmente a la síntesis de nanopartículas de núcleo/corteza de oro-telururo de cinc que son adecuados para, entre otros, su uso como portadores de fármacos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Durante la última década, se ha realizado un esfuerzo sustancial en la preparación de semiconductores de escala nanométrica de banda ancha II-IV (grupo 12 a 16) a la luz de sus propiedades electrónicas y ópticas. Y. Li, en *Advanced Materials* 1999, 11, No 10, 847 – 850, describió un método para producir tales semiconductores, en forma de nanovarillas semiconductoras de ZnTe. El método comprendía un procedimiento solvotérmico y un tratamiento térmico subsiguiente usando Zn y Te como los reactivos, con hidrazina ($N_2H_4 \cdot H_2O$) como disolvente.

15 En la solicitud de patente Europea EP 2405037 A1, con fecha de prioridad de 12 de septiembre de 2005, se describe otra nanopartícula. Esta nanopartícula comprendía un núcleo de material semiconductor, una primera capa, que comprende un primer material semiconductor proporcionado sobre el núcleo, y una segunda capa, que comprende un segundo material semiconductor proporcionado sobre la primera capa, siendo el material semiconductor del núcleo diferente del primer material semiconductor, y siendo el primer material semiconductor diferente del segundo material semiconductor. El método incluyó efectuar la conversión de una composición precursora del núcleo de la nanopartícula al material del núcleo de la nanopartícula, depositar la primera capa sobre el núcleo, y después
20 depositar la segunda capa sobre la primera capa, comprendiendo la composición precursora del núcleo una primera especie precursora que contiene un primer ion a incorporar en el núcleo de la nanopartícula en crecimiento, y una segunda especie precursora distinta que contiene un segundo ion a incorporar en el núcleo de la nanopartícula en crecimiento, efectuándose la conversión en presencia de un clúster molecular en condiciones que permiten la siembra y el crecimiento del núcleo de la nanopartícula.

25 En la patente de los Estados Unidos de América 8.017.181 B2, con fecha de prioridad de 2 de mayo de 2006, se describe un método para preparar nanopartículas con una estructura de núcleo/corteza. Este método trató de proporcionar un procedimiento rápido y reproducible para preparar una nanopartícula de estructura de núcleo/corteza que es menos sensible a las fluctuaciones de las condiciones de reacción cuando se compara con los denominados métodos gota a gota convencionales. Este método para preparar nanopartículas de tipo
30 núcleo/corteza comprende en primer lugar la etapa de disolver un precursor de corteza en un disolvente para formar una disolución del precursor de corteza, y permitir entonces que la disolución del precursor de corteza se establezca a una temperatura suficientemente elevada para que el precursor de corteza haga crecer un sobrerrevestimiento sobre la superficie de una nanopartícula central, y en segundo lugar, la etapa de añadir la nanopartícula central en forma de polvo a la disolución del precursor de corteza estabilizada.

35 En la solicitud de patente de los Estados Unidos de América 2010/0283005 A1, con fecha de prioridad de 28 de septiembre de 2007, se describen otras nanopartículas de tipo núcleo/corteza y métodos para preparar tales partículas. Estas nanopartículas comprenden un núcleo que comprende él mismo un núcleo de un primer material y una capa que comprende un segundo material, en el que uno del primer y del segundo materiales es un material semiconductor, que incorpora iones del grupo 13 y grupo 15 de la Tabla Periódica, y el otro del primer y del segundo
40 materiales es un material de óxido metálico, que incorpora iones metálicos seleccionado de uno cualquiera de los grupos 1 a 12, 14 y 15, respectivamente, de la Tabla Periódica.

En la solicitud de patente de los Estados Unidos de América 2009/0212258 A1, con fecha de prioridad de 25 de febrero de 2008, se describen agentes encaperuzantes (del inglés "capping agent") para nanopartículas semiconductoras.

45 La solicitud de patente de los Estados Unidos de América 2009/0212258 A1 muestra que el tamaño de una nanopartícula semiconductor ayuda a determinar las propiedades eléctricas del material; que la energía de la banda prohibida puede ser inversamente proporcional al tamaño de la nanopartícula semiconductor como consecuencia de efectos del confinamiento cuántico; y que la gran relación de superficie específica a volumen de la nanopartícula afecta a las propiedades físicas y químicas de la nanopartícula.

50 El estado de la técnica muestra además que nanopartículas de un solo núcleo que incluyen un único material semiconductor tienen típicamente eficiencias cuánticas relativamente bajas. Estas eficiencias cuánticas bajas surgen aparentemente de recombinaciones de electrones con huecos nano radiativas que se producen en los defectos y en los enlaces abiertos (del inglés "dangling bonds" = valencias insatisfechas) en la superficie de la nanopartícula. El estado de la técnica muestra además que las nanopartículas de tipo núcleo/corteza incluyen típicamente un solo material central semiconductor que tiene una corteza de un segundo material semiconductor que crece epitaxialmente sobre la superficie del núcleo. El material de la corteza tiene habitualmente una banda prohibida más ancha y dimensiones de red similares a las del material semiconductor central. La intención de añadir la corteza
55

puede ser para eliminar defectos y enlaces abiertos de la superficie del núcleo, y cargar de ese modo a los portadores dentro del núcleo y lejos de los estados superficiales que pueden funcionar como centros para la recombinación no radiativa.

5 No obstante, las superficies de las nanopartículas de núcleo, de núcleo/corteza, y de núcleo-múltiples cortezas, pueden tener enlaces abiertos muy reactivos. Éstos se pueden pasivar encaperuzando los átomos de la superficie con moléculas de ligandos orgánicos que inhiben la agregación de las partículas, protegen a la partícula de su entorno químico circundante, y (al menos en el caso de nanopartículas de núcleo) proporcionan estabilización electrónica. El ligando encaperuzante puede ser el disolvente que se emplea en el crecimiento del núcleo y/o en el recubrimiento de las nanopartículas con la corteza. De cualquier manera, el ligando encaperuza la superficie de la nanopartícula al donar pares de electrones no compartidos a los átomos metálicos de la superficie de la nanopartícula.

15 Las nanopartículas se pueden sintetizar típicamente en presencia de un ligando lipófilo, que da como resultado nanopartículas que pueden ser solubles en medios no polares. Para disminuir o eliminar esta solubilidad, el ligando puede intercambiarse por un ligando diferente de mayor polaridad; sin embargo, el rendimiento cuántico de las nanopartículas disminuye como resultado.

20 Las nanopartículas semiconductoras resultantes pueden usarse en aplicaciones diferentes, en las que las nanopartículas se pueden excitar externamente mediante fotoexcitación, electroexcitación, u otra forma de excitación, conduciendo a la recombinación de electrones con huecos y a la emisión subsiguiente de fotones en forma de luz de una longitud de onda predeterminada, por ejemplo luz visible. El uso de nanopartículas funcionalizadas en la superficie en tales aplicaciones ha estado limitado hasta ahora, sin embargo, por la pérdida de rendimiento cuántico al funcionalizar la superficie.

25 Los compuestos y métodos descritos en la solicitud de patente de los Estados Unidos de América 2009/0212258 A1 se dirigen así a superar los problemas con métodos que existían en ese momento en la funcionalización de la superficie de nanopartículas semiconductoras que han impedido previamente el uso de nanopartículas funcionalizadas en la superficie en tales aplicaciones.

30 En la solicitud de patente PCT 2008/02388 se describen nanopartículas con mayor funcionalidad, tal como bifuncionalidad y multifuncionalidad, que comprenden nanopartículas de diferentes composiciones fusionadas entre sí formando heteroestructuras de nanopartículas entrelazadas. El objetivo de dicha solicitud es proporcionar tales materiales de nanopartículas y con propiedades ópticas más robustas y/o mejoradas. Estas nanopartículas comprenden un núcleo, compuesto de un primer material, y una capa, compuesta de un segundo material, en las que uno del primer y segundo materiales es un material semiconductor que incorpora iones del grupo 13 y grupo 15 de la Tabla Periódica, y el otro del primer y segundo materiales es un material de óxido metálico que incorpora iones metálicos seleccionados de uno cualquiera de los grupos 1 a 12, 14 y 15 de la Tabla Periódica.

35 En Chemical Society Review 2008, 37, 1896 – 1908, se describe el uso específicamente de nanopartículas de oro, y en particular en aplicaciones biológicas tales como marcado, administración, calentamiento y detección, junto con los mecanismos subyacentes y las características específicas de las nanopartículas de oro requeridas para tales aplicaciones. Incluso aunque el uso de nanopartículas de oro coloidal, debido a sus propiedades ópticas, se puede datar desde tiempos antiguos para aplicaciones tales como tinción de vidrio, y las investigaciones sobre coloides de oro se pueden datar hasta Faraday, el uso de nanopartículas de oro para aplicaciones biológicas se puede datar solamente desde finales de los años 1990, es decir, el descubrimiento de la bionanotecnología. Más particularmente, dado que la tecnología moderna permite la síntesis controlada y la funcionalización de materiales de tipo nanomateriales, la investigación en las propiedades particulares del oro coloidal, y la exploración de nuevas técnicas.

45 El estado de la técnica describe sustancialmente la síntesis de nanopartículas de oro en un intervalo relativamente amplio de nanómetros, tanto en disoluciones acuosas como en disolventes orgánicos. Típicamente, las sales de oro, tal como AuCl_3 , se reducen por adición de un agente reductor que conduce a la nucleación de los iones de Au a nanopartículas. De forma correspondiente, son necesarios agentes estabilizantes, y se adsorben o se unen químicamente a la superficie de las nanopartículas de Au. Estos agentes estabilizantes, o los denominados tensioactivos, están típicamente cargados para permitir que las nanopartículas igualmente cargadas se repelen entre sí para estabilizar coloidalmente las partículas.

55 El estado de la técnica muestra la síntesis de nanopartículas de oro en disoluciones acuosas llevada a cabo normalmente con ácido cítrico que sirve en primer lugar para reducir la sal de oro y poner en marcha la nucleación, y en segundo lugar, para estabilizar coloidalmente la partícula mediante sus cargas negativas a medida que se adsorbe a las partículas. El estado de la técnica también muestra la síntesis de nanopartículas de oro en disolventes orgánicos, usando diferentes agentes para reducir y para estabilizar la sal de oro. Cuando las partículas se dispersan frecuentemente en disolventes orgánicos, los agentes estabilizantes/tensioactivos, tales como aquellos basados en cadenas de alcanos hidrófobos, se unen a la superficie de la partícula de oro a fin de proporcionar estabilidad coloidal. El estado de la técnica muestra además el crecimiento de partículas de oro que comprenden geometrías esféricas, de varilla y similares a cortezas huecas.

Las nanopartículas de oro coloidal están rodeadas típicamente por una corteza de moléculas estabilizantes. Con uno de sus extremos, estas moléculas se adsorben o se enlazan químicamente a las superficies de oro, mientras que los otros extremos apuntan hacia las disoluciones y proporcionan estabilidad coloidal. Tras la síntesis de las nanopartículas de oro, las moléculas estabilizantes se pueden sustituir por otras moléculas estabilizantes en una reacción de intercambio de ligandos. Puesto que los restos tiol se unen con mayor afinidad a las superficies de oro, muy frecuentemente se usan ligandos modificados con tiol que se unen a la superficie de las partículas de Au (que se denominan también por varios grupos "clústeres protegidos con monocapa") mediante formación de enlaces de Au-azufre. El intercambio de ligandos está motivado por varios aspectos. Por ejemplo, el intercambio de ligandos permite la transferencia de partículas de Au desde una fase acuosa a una fase orgánica (y viceversa) mediante intercambio de tensioactivos hidrófilos por tensioactivos hidrófobos (y viceversa). De esta manera, eligiendo las moléculas de tensioactivo, es posible ajustar las propiedades de superficie de las partículas.

Para aplicaciones en disolución acuosa, se usan típicamente tensioactivos a base de tiol, con grupos carboxílicos en el otro extremo apuntando hacia las disoluciones. Estas moléculas proporcionan estabilidad coloidal debido a sus cargas negativas; además, también se pueden usar como puntos de anclaje para unir posteriormente moléculas biológicas. Como ligando, a menudo se usa poli(etilenglicol) (PEG), ya que PEG reduce la adsorción no específica de las moléculas a la superficie de las partículas, y proporciona estabilidad coloidal debido a que las partículas con cepillos de PEG sobre su superficie se repelen entre sí por razones estéricas. Varios grupos han usado otras técnicas de revestimiento de la superficie, tal como la imbibición de partículas en una corteza de sílice.

El estado de la técnica muestra además que las moléculas biológicas pueden unirse a nanopartículas de oro de varias maneras. Por ejemplo, si las moléculas biológicas tienen un grupo funcional que puede unirse a la superficie de oro, tal como tioles o secuencias peptídicas específicas, las moléculas biológicas pueden reemplazar algunas de las moléculas estabilizantes originales cuando se añaden directamente a la disolución de las partículas. En consecuencia, moléculas tales como oligonucleótidos, péptidos o PEG se pueden enlazar directamente a las nanopartículas de oro, y las técnicas de clasificación subsiguientes permiten incluso que se obtengan tales partículas de oro con un número exactamente definido de moléculas unidas por partícula. Como alternativa, las moléculas biológicas también se pueden unir a la corteza de moléculas estabilizantes alrededor de las nanopartículas de oro mediante química de bioconjugados. El protocolo más habitual es el enlazamiento de grupos amino en las moléculas biológicas con grupos carboxi en los extremos libres de moléculas estabilizantes usando EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodimida-HCl). Con las estrategias correspondientes, se pueden unir casi todos los tipos de moléculas biológicas a la superficie de las nanopartículas de oro.

Sin embargo, el estado de la técnica muestra que incluso aunque los procedimientos anteriores están relativamente bien consolidados, la bioconjugación de nanopartículas de oro todavía no es un ejercicio simple, y es necesaria la caracterización de conjugados sintetizados, en particular para descartar efectos de agregación o de unión no específica durante la reacción de conjugación. Más específicamente, en muchos protocolos de conjugación, el número de moléculas unidas por nanopartícula de oro es solamente una estimación aproximada, puesto que todavía no se ha establecido ningún método estándar para determinar la cobertura de la superficie de partículas modificadas con moléculas.

En la solicitud de patente de los Estados Unidos de América 2010/0059721 A1, con fecha de prioridad de 21 de julio de 2008, se describe un nuevo método para producir nanopartículas compatibles acuosas. El método se dirige a obviar o mitigar algunos de los retos en los métodos del estado de la técnica de entonces para producir nanopartículas compatibles acuosas. El método descrito usó un ligando de unión a nanopartículas, que incorpora un grupo de unión a las nanopartículas y un precursor de grupo solubilizante. El precursor de grupo solubilizante se convierte en un solubilizador que incorpora el grupo solubilizante para efectuar la unión del ligando de unión a las nanopartículas y producir de ese modo las nanopartículas compatibles acuosas. La conversión del precursor de grupo solubilizante se puede efectuar mediante varios métodos, por ejemplo poniendo en contacto el ligando de unión a las nanopartículas con una cantidad suficiente de un agente modificador del precursor, para convertir sustancialmente todos los precursores de grupo solubilizante presentes en el ligando de unión en grupos solubilizantes.

En DOI:10.1038/NNANO.2009.193 se describe la utilidad, en una variedad de aplicaciones, de combinar múltiples componentes discretos en nanopartículas multifuncionales individuales. Este estado de la técnica muestra que la retención de las propiedades ópticas y eléctricas únicas de cada componente tras la integración a nanoescala ha sido problemática, particularmente cuando se intentan combinar fluoróforos, tales como nanopartículas semiconductoras o los denominados puntos cuánticos (del inglés "quantum dots"), con materiales plasmónicos tales como oro a un nivel nanométrico, debido a que el oro y otros metales pueden suprimir la fluorescencia. Hasta ahora, la combinación de la fluorescencia de puntos cuánticos con oro plasmónicamente activo solamente se ha demostrado en superficies planas. Los autores combinaron las actividades fluorescente y plasmónica en una única nanopartícula controlando la separación entre una nanopartícula o núcleo de punto cuántico y una corteza de oro ultrafina, con precisión nanométrica a través de un ensamblaje capa a capa. El enfoque de química en húmedo proporciona una ruta general para depositar capas ultrafinas de oro sobre virtualmente cualquier nanoestructura discreta o superficie continua, y debería demostrarse útil para la formación de bioimágenes multimodales, para la interconexión con sistemas biológicos, para reducir la toxicidad, para modular campos electromagnéticos, y poner en contacto nanoestructuras.

En Angewandte DOI: 10:1002/anie.200806082 se describe un denominado método general para la síntesis de estructuras de núcleo/corteza y heteroestructuras de oro-sulfuro metálico. El método se refiere particularmente a la síntesis de estructuras de tipo núcleo/corteza y heteroestructuras de oro-sulfuro metálico dispersables en agua. Siguiendo un procedimiento similar, se han sintetizado con éxito estructuras híbridas hechas de nanocristales de Au de formas variables y semiconductores de sulfuros de metales de transición diferentes (ZnS, CdS, Ag₂S, NiS, y CuS).

Este estado del arte muestra que los métodos desarrollados previamente para la síntesis de nanoestructuras de metal-semiconductor incluyen el crecimiento selectivo de metales sobre las puntas y superficies de nanocristales de semiconductores, la fotodeposición de metales sobre nanovarillas de semiconductores, la difusión de metales en semiconductores, y el crecimiento de semiconductores en semillas de metales. Estos métodos implican a menudo el crecimiento en disolventes orgánicos, y por lo tanto producen nanoestructuras que no son adecuadas para la limpieza fotocatalítica y aplicaciones biológicas. Además, la mayoría de los productos obtenidos a partir de estos métodos son heteroestructuras. Antes de esta publicación, solamente se han dado a conocer unos pocos ejemplos de nanoestructuras de tipo núcleo/corteza de metal-semiconductor, aunque la geometría de núcleo/corteza puede maximizar el área interfacial y proporcionar así una plataforma para estudiar las interacciones de plasmón-excitón y las distribuciones de cargas. Además, con los métodos previos, el control de las formas y tamaños de los componentes de metales nobles sigue siendo un reto. Esta controlabilidad es muy importante para estudiar las interacciones de plasmón-excitón, e incluso particularizarlas para comportamientos de aplicación mejorados, debido a que las propiedades plasmónicas de los metales nobles dependen enormemente de sus formas y tamaños.

Además, en Nano Today (2010) 5, 213 – 230, se describe la funcionalización de nanopartículas con núcleos de materiales inorgánicos tales como metales nobles, magnéticos, sus aleaciones y óxidos, y semiconductores, así como su potencial para la aplicación en áreas de biomedicina, desde el diagnóstico hasta el tratamiento de enfermedades.

La publicación reconoció que los efectos de las nanopartículas deben ser predecibles y controlables, y deben proporcionar el resultado deseado con una citotoxicidad mínima. Los autores reconocieron que estos criterios se pueden satisfacer personalizando cuidadosamente la corteza de ligando, que permite la estabilización, la selección específica y el reconocimiento de especies bioquímicas. Por estas razones, la publicación se centró en la síntesis y biofuncionalización de nanopartículas de metales inorgánicos, semiconductores y magnéticas para aplicaciones biomédicas.

En Materials Letters 63 (2009) 2097 – 2099, el solicitante dio a conocer una ruta para obtener nanopartículas híbridas de Au-CdSe encaperuzadas con cisteína. En esa publicación, se discute la síntesis de materiales nanoestructurados de múltiples componentes, la combinación de dos nanomateriales para proporcionar una estructura modelo para comprender posteriormente las propiedades de las heteroestructuras, el hecho de que la combinación de un metal y un semiconductor como un solo material permite que las propiedades de ambos materiales parentales se acoplen en aplicaciones biomédicas potenciales, y el hecho de que el metal puede proporcionar el punto de anclaje para conexiones eléctricas y autoensamblaje. La mayoría de los estudios previos de estructuras de metal-semiconductor se basaron en la estructura de núcleo/corteza de metal/óxido depositando cortezas de óxido, tal como TiO₂, SnO₂, y SiO₂, sobre partículas metálicas de Ag y Au.

El solicitante señaló en la publicación anterior que Banin et al. ha realizado un trabajo exhaustivo sobre el crecimiento de puntas de oro en partículas de CdSe anisotrópicas. Variando la concentración de oro, observaron una transición desde el crecimiento a ambos lados hasta el crecimiento de oro a un lado. El crecimiento de partículas de oro se ha extendido a otros semiconductores tales como CdS, InAs y ZnO.

La síntesis de estas estructuras híbridas, ya sea en forma de aleaciones o de sistemas de núcleo/corteza, implica dos etapas. Inicialmente, las partículas del semiconductor se sintetizan a temperaturas elevadas en disolventes coordinantes convencionales tales como TOPO. Las partículas de oro se hacen crecer entonces en un procedimiento distinto sobre el semiconductor. Una alternativa a este procedimiento fue descrita por Wang et al., quienes sintetizaron nanopartículas de tipo núcleo/corteza de Au/CdSe usando un precursor de bialeación de Au-Cd. El precursor de Cd-Au y el seleniuro de trioctilfosfina (TOPSe) se termolisaron en una mezcla de hexadecilamina (HDA) y óxido de trioctilfosfina (TOPO), a temperaturas elevadas. Las propiedades ópticas del material cristalino resultante estaban entre las del núcleo de Au y las de la corteza de CdSe.

El solicitante dio a conocer además en otra parte la síntesis de nanopartículas de CdSe muy solubles en agua pasivadas con cisteína, sin el uso de ningún estabilizante adicional. El aminoácido cisteína se eligió para encaperuzar las nanopartículas de CdSe, ya que pasiva los estados superficiales de nanoclústeres de forma más eficaz que otros tioles, potenciando de ese modo sus propiedades de emisión. Estas nanopartículas bioconjugadas podrían ser de utilidad como marcadores para proteína, o ADN, reconocimiento de anticuerpos o antígenos específicos a través de medidas de emisión de luminiscencia, y el desarrollo potencial de biosensores. En este trabajo, el solicitante adaptó el método sintético para sintetizar partículas de tipo núcleo/corteza híbridas de Au-CdSe. De forma muy breve, una disolución de HAuCl₄, Se y NaBH₄ se mezcló simultáneamente en un matraz de tres bocas bajo nitrógeno. Bajo un control cuidadoso del pH, se añadió cisteína a la mezcla de reacción después de unos pocos minutos. Entonces se añadió una disolución de CdCl₂ después de 3-4 h, y la agitación se continuó toda

la noche en una atmósfera inerte. Las partículas de Au-CdSe resultantes se centrifugaron, se separaron, y se disolvieron en agua o acetona para análisis posterior.

El solicitante también describió la síntesis de nanopartículas de semiconductor tales como calcogenuros de cadmio en *Materials Letters* 81 (2012) 108-111. La síntesis es un foco importante de investigación en la síntesis de nanomateriales. Sin embargo, la toxicidad del cadmio ha sido un inconveniente que ha obligado a los investigadores a buscar materiales menos tóxicos tales como calcogenuros de cinc. Entre los calcogenuros de cinc, ZnTe es un semiconductor atractivo para diversas aplicaciones en dispositivos optoelectrónicos y termoeléctricos. Sin embargo, cuando se comparan con los análogos de sulfuros y seleniuros de cinc, hay un menor número de informes sobre la preparación de nanocristales de ZnTe. Algunas rutas para la síntesis de nanopartículas de ZnTe incluyen las rutas del proceso solvotérmico, de la ablación por láser pulsado, la molienda mecánica y el plasma de microondas.

El solicitante señaló que Jun et al. dio a conocer el uso de un precursor molecular monomérico, $[Zn(TePh)_2][TMEDA]$, para la síntesis “en un recipiente” de nanopartículas de ZnTe encaperuzadas con dodecilamina. El tamaño y la forma de las nanopartículas se controlaron mediante temperatura y los ligandos encaperuzantes. Recientemente se dio a conocer la síntesis de novarillas de wurtzita con relaciones de aspecto controlables. Las dimensiones de las partículas se controlaron adoptando politeluros activos como el precursor de telurio, junto con la variación de la concentración del precursor, la temperatura de la reacción y/o el tiempo de reacción. Aquí, el solicitante dio a conocer la síntesis de nanopartículas de ZnTe encaperuzadas con HDA mediante un método híbrido que emplea tanto química en disolución como termolisis a temperaturas elevadas. El trabajo es un estudio sobre un trabajo previo sobre CdTe y PbTe. El esquema simple es reproducible, y se puede aumentar fácilmente de escala para la producción industrial.

El uso de nanopartículas de Au que se hicieron crecer previamente o de cristales para la síntesis de nanoestructuras de oro-sulfuro metálico permite que se escojan racionalmente sus formas y tamaños, y de este modo sus propiedades plasmónicas.

El National Cancer Registry (NCR) y diversos institutos internacionales de investigación del cáncer proporcionan estadísticas que muestran un incremento en la prevalencia a nivel mundial de los pacientes con cáncer. La lucha contra el cáncer ha evolucionado hacia un enfoque multidisciplinar que implica médicos, químicos, ingenieros biomédicos y científicos de materiales. La quimioterapia es un tratamiento normalmente usado para el cáncer. Implica el uso de diversos fármacos citotóxicos que a menudo afectan tanto a células cancerosas como a células sanas. Este tratamiento da a menudo como resultado efectos secundarios adversos tales como pérdida del cabello y de peso, náusea, diarrea, caquexia cancerosa, infecciones oportunistas, y algunas veces incluso la muerte. El reto con el que se han enfrentado los investigadores es el diseño de fármacos quimioterapéuticos que no solamente sean específicos para el cáncer sino que también muestren una mayor eficacia terapéutica. Los nanosistemas avanzados, tales como nanopartículas de núcleo/corteza, tienen el potencial de apoyar esta aplicación si se diseñan apropiadamente. La síntesis de nanopartículas heteroestructuradas ha recibido recientemente mucha atención debido a su potencial en catálisis, electrónica y ciencias biomédicas. La combinación de dos tipos diferentes de material que funcionan como una única entidad puede conferir ventajas particulares tales como propiedades ópticas, eléctricas o estructurales mejoradas. Un reto a la hora de diseñar tales materiales surge de la determinación de la estructura de un sistema de dos componentes, y en la identificación de elementos de componentes de núcleo/corteza compatibles. La síntesis controlada de heterosistemas bimetálicos, tales como sistemas de núcleo/corteza de Pd/Pt o Ag/Au, es posible debido a la similitud relativamente estrecha entre las redes cristalinas de sus partes componentes, mientras que los sistemas de metal-semiconductor de tipo núcleo/corteza son más difíciles de sintetizar; sus estructuras cristalinas difieren debido a la gran falta de similitud entre las redes cristalinas. Ha habido unos pocos informes de nanoestructuras de tipo núcleo/corteza de metal-semiconductor. Como se describió anteriormente, Wang y colaboradores describieron un método general para la preparación de nanocristales de Au de diferentes formas y tamaños como material de partida para la síntesis de estructuras de tipo núcleo/corteza de Au-sulfuro de metal dispersables en agua. Salant et al. llevaron a cabo un trabajo complejo sobre el crecimiento de puntas de oro sobre partículas de CdSe anisotrópicas, que se usó para establecer una relación entre el patrón de crecimiento y la morfología que se desarrolla a partir de un núcleo estabilizado. Es más habitual la síntesis de heteroestructuras recubiertas de oro, con el núcleo compuesto de un material magnético tal como óxido de hierro.

Sin embargo, hay poco con respecto a la combinación de sistemas híbridos de metal-semiconductor y su aplicación en el suministro de fármacos para procedimientos médicos tales como el tratamiento de tumores.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un nuevo método para la síntesis de un nanomaterial metal-semiconductor, comprendiendo el método la adición de una sal de metal reducida a una disolución preparada de puntos cuánticos de telurio semiconductor encaperuzados con cisteína, que produce una disolución de nanopartículas de tipo núcleo/corteza de metal-telurio semiconductor encaperuzadas con cisteína.

Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona un nuevo método para la síntesis de nanomateriales metal-semiconductor, comprendiendo el método las etapas de:

reducir una sal metálica;

proporcionar una disolución de puntos cuánticos de telururo semiconductor encaperuzados con cisteína; y

añadir la sal metálica reducida a la disolución preparada de puntos cuánticos de telururo semiconductor encaperuzados con cisteína;

- 5 produciendo una disolución de nanopartículas de tipo núcleo/corteza de metal-telururo semiconductor encaperuzadas con cisteína.

Según un tercer aspecto de la invención, se proporciona un nanomaterial metal-semiconductor, que comprende nanopartículas de tipo núcleo/corteza de metal-telururo semiconductor encaperuzadas con cisteína.

- 10 Según un cuarto aspecto de la invención, se proporciona un sistema de suministro de fármacos de nanoescala, que comprende una nanopartícula de tipo núcleo/corteza de metal-telururo semiconductor encaperuzada con cisteína.

El metal puede ser oro, y el semiconductor puede ser telururo de cinc.

- 15 Según un quinto aspecto de la invención, se proporciona un nuevo método para la síntesis de nanomateriales de metal-semiconductor, comprendiendo el método la adición de una sal de oro reducida a una disolución preparada de puntos cuánticos de telururo de cinc encaperuzados con cisteína, que produce una disolución de nanopartículas de tipo núcleo/corteza de oro-telururo de cinc encaperuzadas con cisteína.

Según un sexto aspecto de la invención, se proporciona un nuevo método para la síntesis de un nanomaterial metal-semiconductor, comprendiendo el método las etapas de:

reducir una sal de oro;

- 20 añadir telururo reducido, sal de cinc y cisteína para formar una disolución de puntos cuánticos de telururo de cinc encaperuzados con cisteína; y

añadir la sal de oro reducida a la disolución preparada de puntos cuánticos de telururo de cinc encaperuzados con cisteína;

produciendo una disolución de nanopartículas de tipo núcleo/corteza de oro-telururo de cinc encaperuzadas con cisteína.

- 25 Según un séptimo aspecto de la invención, se proporciona un nanomaterial metal-semiconductor, que comprende nanopartículas de núcleo/corteza de oro-telururo de cinc encaperuzadas con cisteína, caracterizadas por tener un núcleo de oro y una corteza de telururo de cinc.

Según un octavo aspecto de la invención, se proporciona un sistema de suministro de fármacos de nanoescala que comprende una nanopartícula de tipo núcleo/corteza de oro-telururo de cinc encaperuzada con cisteína.

- 30 El sistema de suministro de fármacos puede caracterizarse por que al menos un ingrediente activo de un medicamento se une a la superficie de la estructura de núcleo/corteza, preferiblemente con un receptor específico para tumores, para el suministro dirigido de fármacos a tales tumores.

Las nanopartículas tienen preferiblemente diámetros de entre 4 y 40 nanómetros, preferiblemente entre 5 y 30 nanómetros, y en una realización, las nanopartículas tienen un diámetro de aproximadamente 30 nanómetros.

- 35 Las nanopartículas pueden ser nanopartículas de tipo núcleo/corteza de oro-telururo de cinc encaperuzadas con cisteína, solubles en agua, muy estables.

Las nanopartículas tienen preferiblemente propiedades ópticas mejoradas, caracterizadas por una espectroscopía de ultravioleta-visible (UV/Vis) a 538 nm y fotoluminiscencia (PL) en un intervalo de 400 a 420 nm, y preferiblemente, cuando se someten a difracción por rayos X, tanto Au como ZnTe muestran los picos característicos.

- 40 La corteza comprende preferiblemente ZnTe mezclado con cinc cúbico. El núcleo comprende preferiblemente Au cúbico.

- 45 La invención proporciona además una nanopartícula compuesta de un núcleo que comprende oro y una primera capa que comprende telururo de cinc proporcionada sobre el núcleo, preferiblemente en la que el telururo de cinc está encaperuzado (pasivado) con cisteína, más preferiblemente hidrocloreto de éster etílico de L-cisteína. En una realización, el núcleo consiste esencialmente en oro, y en una realización de la invención, el núcleo consiste en oro.

En una realización de la presente invención, la primera capa consiste esencialmente en telururo de cinc, y en una realización, la primera capa consiste en telururo de cinc.

La nanopartícula puede comprender además una segunda capa que comprende un fármaco quimioterapéutico

antimetabolito y/o antimetabólico, un marcador químico y/o un ligando celular, segunda capa la cual se proporciona sobre la primera capa. El fármaco quimioterapéutico antimetabolito y/o antimetabólico se puede seleccionar de oxaliplatino, cisplatino, irinotecán, paclitaxel, 5-fluorouracilo y docetaxel.

5 La nanopartícula se puede usar en terapia y/o en diagnóstico, particularmente terapia y/o diagnóstico de cáncer en un ser humano o animal. Tal uso puede incluir formación de bioimágenes, detección de tumores, y/o termodestrucción.

La nanopartícula puede tener un diámetro de entre 2 y 20 nanómetros.

10 La invención proporciona además un método para producir una nanopartícula como se describe aquí anteriormente, comprendiendo el método efectuar la conversión del material de precursor de núcleo de la nanopartícula, preferiblemente cloruro de oro, en oro, y depositar la capa de telururo de cinc sobre la capa de oro.

Como se describe anteriormente, el telururo de cinc está encaperuzado preferiblemente con cisteína.

La invención proporciona además un método para producir nanomateriales de metal-semiconductor, comprendiendo el método las etapas de:

- 15 a. reducir una sal de metal, preferiblemente cloruro de oro;
- b. proporcionar una disolución de puntos cuánticos de telururo de cinc encaperuzados con cisteína; y
- c. añadir la sal de metal reducida a la disolución preparada de puntos cuánticos de telururo de cinc encaperuzados con cisteína, para producir una disolución de nanopartículas de tipo núcleo/corteza de metal-telururo de cinc encaperuzadas con cisteína.

20 La invención también proporciona un sistema de suministro de fármacos de nanoescala que comprende una nanopartícula de tipo núcleo/corteza de oro-telururo de cinc encaperuzada con cisteína.

La invención se amplía al uso de la nanopartícula como se describe aquí anteriormente en el suministro de fármacos dirigido, en formación de bioimágenes, en detección de tumores y/o termodestrucción.

25 En esta memoria descriptiva, "puntos cuánticos" (del inglés "quantum dots") significa nanocristales hechos de materiales semiconductores que son suficientemente pequeños para mostrar propiedades mecánicas cuánticas. Específicamente, sus excitones están confinados en las tres dimensiones espaciales. Las propiedades electrónicas de estos materiales son intermedias entre aquellas de los semiconductores en grupo y las de las moléculas discretas.

30 Las características electrónicas de un punto cuántico están estrechamente relacionadas con su tamaño y forma. Por ejemplo, la banda prohibida en un punto cuántico, que determina el intervalo de frecuencias de la luz emitida, está relacionada de forma inversa con su tamaño. En aplicaciones de colorantes fluorescentes, la frecuencia de la luz emitida aumenta a medida que disminuye el tamaño del punto cuántico. Consecuentemente, el color de la luz emitida se desplaza del rojo al azul cuando el tamaño del punto cuántico se hace más pequeño. Esto permite que la excitación y emisión de puntos cuánticos sean muy ajustables. Puesto que el tamaño de un punto cuántico se puede ajustar cuando se obtiene, sus propiedades conductoras se pueden controlar de forma cuidadosa. Se pueden obtener ensamblados de puntos cuánticos que consisten en muchos tamaños diferentes, tales como nanopelículas de múltiples capas en gradiente, que demuestran un intervalo de propiedades de emisión deseables.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

40 Se describe una ruta en disolución para nanopartículas de núcleo/corteza de oro-teluro de cinc (Au-ZnTe) encaperuzadas con cisteína, biocompatibles, con potencial en aplicaciones biomédicas. Las propiedades ópticas de las nanopartículas de núcleo/corteza no muestran características de los componentes parentales individuales. Las propiedades de emisión ajustables de la corteza de semiconductor hacen al sistema útil para aplicaciones de formación de imágenes y de marcado biológico. Los estudios de formación de imágenes mediante microscopio electrónico de transmisión (TEM) muestran que las partículas son potencialmente esféricas, con tamaños del orden de 2-10 nm. El análisis elemental usando espectroscopía dispersiva de energías de rayos X (XEDS) en el microscopio electrónico de transmisión de barrido (STEM) apoya una morfología de tipo núcleo/corteza con Au en el núcleo de la partícula. El análisis de difracción de rayos X de polvo reveló Au y ZnTe cristalinos. Se investigó la biocompatibilidad y citotoxicidad de los núcleos/cortezas sobre una estirpe celular de adenocarcinoma de páncreas humano (PL45) usando el ensayo de viabilidad celular WST-1. Los resultados mostraron que los núcleos/cortezas no tuvieron efectos adversos sobre la proliferación celular o morfología de PL45. El análisis de las imágenes de TEM 45 confirmó la absorción y aislamiento celulares de las nanopartículas de núcleo/corteza en el citoplasma vía interacciones de membrana. Las propiedades de fluorescencia de los núcleos/cortezas de Au-ZnTe en los resultados de las estirpes celulares PL45 confirmaron el potencial formador de bioimágenes de las nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe. La importancia y novedad de esta investigación reside en la combinación de oro y telururo de cinc usada para producir un nanomaterial biocompatible, soluble en agua, que se puede explotar para 50

aplicaciones de suministro de fármacos dentro del campo de la oncología.

Cuando se usa oro como el componente de corteza, este muestra ciertas ventajas al desarrollar un papel directo en la capacidad de ajuste del tamaño y en la morfología de la nanopartícula heteroestructurada. La corteza de oro reduce la toxicidad del óxido de hierro, y también potencia las propiedades de biocompatibilidad. Estudios recientes muestran mejoras en el suministro dirigido de fármacos usando nanopartículas de núcleo/corteza basadas en oro como el vehículo de suministro. Estos estudios ilustran la versatilidad de las nanopartículas de oro como un componente del núcleo o de la corteza. Las características de la resonancia de plasmones de superficie presentadas por nanomateriales de oro dan como resultado propiedades mejoradas de dispersión y absorción de la luz. Estas propiedades ópticas únicas permiten la conversión rápida de la luz absorbida en calor, dando como resultado una energía fototérmica. Además, las nanopartículas de oro son muy estables, no tóxicas, y se sintetizan fácilmente en una variedad de tamaños y modificaciones de la superficie. Las nanopartículas de oro se pueden usar como agentes de contraste en formación de bioimágenes, ya que no muestran fotoblanqueamiento.

Las propiedades inherentes de los nanomateriales de oro los hacen un material del núcleo adecuado. ZnTe se escogió como el componente de corteza debido a que es un material semiconductor con un banda prohibida directade 2,26 eV a 300 K, y es un material atractivo en aplicaciones que emplean sus propiedades ópticas. De forma más importante, la elevada estabilidad del núcleo de oro, acoplada con las propiedades de luminiscencia del telururo de cinc y la modificación eficiente de la superficie de la cisteína tiene el potencial de permitir que este sistema sea aplicado en el suministro dirigido de fármacos y en aplicaciones de formación de bioimágenes en el campo de la terapéutica y diagnóstico oncológico.

Esta invención muestra la síntesis de nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe encaperuzadas con cisteína usando una ruta simple en disolución. La Figura 13 muestra el diseño de nanopartículas de núcleo/corteza, e ilustra sus aplicaciones potenciales. Los grupos funcionales de amino en la cisteína tienen el potencial de apoyar la conjugación de los ligandos celulares y una combinación de fármacos quimioterapéuticos para producir una versión biomodificada de las nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe.

DESCRIPCIÓN ESPECÍFICA

La invención se describirá ahora con referencia a las siguientes figuras no limitantes, en las que:

La Figura 1 muestra los espectros de absorción de (A) nanopartículas de ZnTe encaperuzadas con cisteína, (B) nanopartículas de Au encaperuzadas con citrato, y (C) nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe encaperuzadas con cisteína.

La Figura 2 muestra un espectro de fotoluminiscencia de nanopartículas de Au y de núcleo/corteza de Au-ZnTe.

La Figura 3 muestra un patrón de difracción de rayos X de nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe.

La Figura 4 muestra una estructura de núcleo/corteza de Au-ZnTe con tres revestimientos de la superficie.

La Figura 5 muestra una sección transversal a través de una célula de cáncer de mama MFC7, en la que C-citoplasma, CM-membrana citoplásmica, M-mitocondria, N-núcleo, GB-cuerpo de Golgi, y ER-retículo endoplásmico.

La Figura 6 muestra una sección transversal a través de una célula de cáncer de mama MFC7, en la que C-citoplasma, M-mitocondria, N-núcleo, y CM-retículo citoplásmico.

La Figura 7 muestra una sección transversal a través de una célula de cáncer de mama MFC7 que muestra la absorción de partículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe en el citoplasma, en la que C-citoplasma y CM-membrana citoplásmica.

La Figura 8 muestra una sección transversal a través de una célula de cáncer de mama MFC7 que muestra la absorción de nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe en el citoplasma a través de fagocitosis, en la que C-citoplasma y CM-membrana citoplásmica.

La Figura 9 muestra una sección transversal a través de células pancreáticas PL45, que muestra la interacción de nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe con la superficie celular, en la que C-citoplasma, CM-membrana citoplásmica, y M-mitocondria.

La Figura 10 muestra una sección transversal a través de células pancreáticas PL45, que muestra la interacción de nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe con la superficie celular, y nanopartículas aisladas en una vacuola en el citoplasma, en la que C-citoplasma, CM-membrana citoplásmica, y M-mitocondria.

La Figura 11 muestra una sección transversal a través de una célula cancerosa MCF7 que muestra nanopartículas que entran en la célula. El segmento se agranda mostrando nanopartículas que entran en la

célula, en la que C-citoplasma, CM-membrana citoplásmica, y M-mitocondria.

La Figura 12 muestra una sección transversal a través de una célula PL45 que muestra nanopartículas que entran en la célula. El segmento se agranda mostrando características morfológicas de nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe, en la que C-citoplasma y CM-membrana citoplásmica.

5 La Figura 13 es un esquema de síntesis para nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe, en las que el componente de la corteza está modificado superficialmente con hidrocloreuro de éster etílico de L-cisteína para las características de solubilidad en agua y biocompatibilidad. Los grupos amino del agente encaperuzante pueden usarse para unir ligandos específicos de las células y fármacos quimioterapéuticos para aplicación en el suministro dirigido de fármacos y en la formación de bioimágenes.

10 La Figura 14 muestra la caracterización óptica de nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe usando espectroscopía de UV-vis, en la que a) las nanopartículas de ZnTe encaperuzadas con cisteína muestran un pico de absorbancia a 269 nm, se observa un material parduzco; b) las nanopartículas de oro muestran un pico de observancia a 519 nm, se observa una disolución coloidal roja; y c) las nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe muestran un pico de absorbancia a 538 nm, se observa un material púrpura oscuro.

15 La Figura 15 muestra la caracterización óptica de nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe usando espectroscopía de fotoluminiscencia. Los espectros de fotoluminiscencia de nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe a diversas excitaciones se representan en a, b y c, el pico observado presenta máximos de emisión constantes a 402 nm, d. las nanopartículas de Au no presentan pico de emisión para la excitación a 300 nm.

20 La Figura 16 muestra la caracterización morfológica de nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe usando TEM y HRTEM, en la que a) las nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe presentan una morfología esférica con tamaños de diámetros que oscilan entre 2-10 nm, y b) presenta la microfotografía de HRTEM de nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe.

25 La Figura 17 muestra la caracterización de los componentes de las nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe usando análisis elemental mediante EDX. Para el análisis, se escogió un área típica de partículas agregadas, junto con imágenes de espectro de Au, Zn, y Te, que proporcionan pruebas de una estructura de núcleo/corteza y relaciones de los nanomateriales de núcleo/corteza heteroestructurados. Se muestran barridos de línea tomados en las posiciones indicadas. Se encontró que el oro estaba localizado en el núcleo, con la distribución del oro como se muestra, mientras que se observó que Zn y Te estaban asociados principalmente con la superficie de las partículas. Los datos de los barridos de línea extraídos de las imágenes del espectro de EDX sugieren un grosor de la corteza de aproximadamente 1-4 nm.

30 La Figura 18 muestra la caracterización cristalina de nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe usando XRD. El espectro de XRD presenta picos característicos para cada material componente en el núcleo/corteza.

35 La Figura 19 muestra la caracterización de nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe usando microscopía de fuerza atómica, en la que a) presenta el crecimiento relativo de células PL45 tras el tratamiento con nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe; b) presenta las células PL45 de control sin tratar; c) presenta células PL45 que crecen a una confluencia del 60% bajo la influencia de 25 $\mu\text{g/ml}$, y d) presenta el crecimiento de PL45 a una confluencia del 80% bajo la influencia de 50 $\mu\text{g/ml}$.

40 La Figura 20 muestra la absorción celular y el aislamiento de las nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe, en la que a) y b) muestran una sección transversal a través de células PL45 embebidas en resina, que muestran la interacción de la membrana celular con las nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe; c), d), e) y f) presentan dos células PL45 adherentes que muestran ambas interacciones de membrana con nanopartículas de núcleo/corteza, y el aislamiento de nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe en una vacuola en el citoplasma de las células. C-citoplasma, CM-membrana citoplásmica, y M-mitocondria.

45 La Figura 21 muestra formación de imágenes de fluorescencia de estirpes celulares cancerosas PL45 tratadas con nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe, en la que a) presenta una sección transversal a través de células cancerosas de páncreas PL45 bajo microscopía de campo brillante; b) muestra una sección transversal a través de células de cáncer de páncreas PL45 bajo microscopía de fluorescencia con conjunto de filtros de Dapi; c) muestra las propiedades de fluorescencia de nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe en diferentes áreas de las diapositivas de las muestras; y d) muestra revestimientos multifluorescentes de células PL45 tratadas con nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe bajo los conjuntos de filtros de Zeiss de fluorescencia Dapi y Alexa 388.

Ahora se describirán realizaciones de la invención por medio de los siguientes ejemplos.

55 EJEMPLO 1

Síntesis de nanopartículas de núcleo/corteza de oro-teluro de cinc encaperuzadas con cisteína

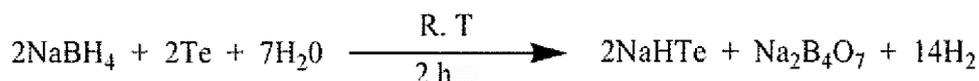
Se propone una ruta mejorada para la síntesis de nanopartículas de núcleo/corteza de oro-teluro de cinc encaperuzadas con cisteína. Esta ruta implica la adición de sales de oro reducidas a una disolución preparada de puntos cuánticos de teluro de cinc encaperuzados con cisteína, para producir una disolución negra verdosa oscura de nanopartículas de núcleo/corteza de oro-teluro de cinc encaperuzadas con cisteína.

5

En el matraz 1: Las sales de oro se reducen en presencia de iones citrato; y

En el matraz 2: El teluro se reduce mediante borohidruro de sodio a temperatura ambiente en condiciones inertes.

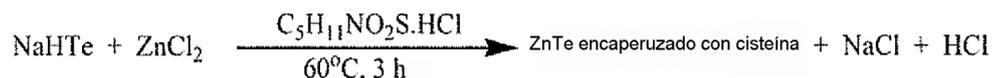
La reacción es como sigue:



10

Después de dos horas, se añaden a la disolución de ion teluro rosa disoluciones de cloruro de cinc (sal de cinc) e hidrocloreto de éster etílico de L-cisteína (agente encaperuzante), en una relación 1:10.

La reacción es como sigue:



15

La reacción continuó durante 30 minutos a temperatura ambiente. El pH se ajustó a 7, y la temperatura se incrementó hasta 60°C. Después de 3 horas, la reacción se retiró y se añadió a la disolución de oro reducido en el matraz 1. Después de 2 horas, se hizo precipitar un material negro verdoso usando acetona. Este producto se centrifuga para dar un pellet que se seca a vacío y se pesa, para dar un material que se dispersa fácilmente en agua, es decir, nanopartículas de núcleo/corteza de oro-teluro de cinc.

20

Estas nanopartículas de núcleo/corteza se caracterizan adicionalmente usando microscopio electrónico de transmisión, microscopio electrónico de transmisión de alta resolución, difracción de rayos X, espectroscopía ultravioleta y fotoluminiscencia. Esta ruta proporciona partículas de núcleo/corteza de oro-teluro de cinc encaperuzadas con cisteína, solubles en agua, muy estables, que tienen un tamaño entre 4-20 nm de diámetro.

25

Las nanopartículas así producidas mostraron propiedades ópticas mejoradas, como se ilustra en la Figura 1, caracterizadas por UV/Vis a 538 nm y PL en un intervalo de 400 a 420 nm. La difracción de rayos X reveló picos característicos tanto para Au como para ZnTe. Los tres picos a $2\theta = 27^\circ$, 40° y 49° correspondieron a la difracción de los planos (111), (220) y (311) de ZnTe mezclado con cinc cúbico. El núcleo mostró picos de difracción asignados a los planos (111), (220), (200) y (222) de oro cúbico.

30

La ventaja de los núcleos/cortezas de Au-ZnTe está en el diseño. La combinación del núcleo de oro y de la corteza de teluro de cinc potencia y/o desplaza las propiedades ópticas. Un desplazamiento en la propiedad óptica permite que estos núcleos/cortezas funcionen en la termodestrucción de tumores y/o de tejidos cancerosos. La corteza de teluro de cinc es capaz de funcionar como un marcador fluorescente para la formación de imágenes de tejidos, si se excita a la longitud de onda correcta. Estas nanopartículas de núcleo/corteza están modificadas en la superficie o están encaperuzadas con cisteína. La cisteína estabiliza el complejo de núcleo/corteza, haciendo los núcleos/cortezas de Au-ZnTe solubles en agua y biocompatibles. Los grupos de las cadenas laterales de amino en las moléculas de cisteína proporcionan un sistema para marcar fármacos que se pueden suministrar a sitios diana.

35

Estos núcleos/cortezas se desarrollaron adecuadamente para uso como un nanosistema de suministro de fármacos que es específico para el cáncer. El diseño permite la unión de fármacos quimioterapéuticos existentes a la superficie del núcleo/corteza, además de receptores específicos para tumores, con el objeto de crear un nanosistema para el suministro dirigido de fármacos que muestra una mayor eficacia.

40

EJEMPLO 2

Interacción de nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe encaperuzadas con cisteína con estirpes celulares cancerosas

45

Después de que las nanopartículas de núcleo/corteza se sintetizaron y caracterizaron con éxito según el Ejemplo 1, se expusieron a estirpes celulares cancerosas de diferentes órganos diana, para establecer la toxicidad.

Estirpes celulares de cáncer de páncreas, de próstata, de colon y de mama se expusieron a diferentes

concentraciones de nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe, y se estableció la viabilidad celular. Los resultados mostraron que los núcleos/cortezas no tuvieron efecto tóxico sobre el crecimiento de estas estirpes celulares. Para confirmar este resultado, estirpes celulares procedentes de dos sitios diana (cáncer de páncreas y de mama), que son bioquímica y morfológicamente diferentes, se embebieron en resina y se microseccionaron. Los resultados mostraron que las nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe interactúan con la membrana citoplásmica y entonces entran en la célula a través de fagocitosis, en la que se aíslan en vacuolas dentro del citoplasma.

Los resultados se ilustran en las Figuras 5 a 12.

EJEMPLO 3

10 Síntesis de nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe

Materiales

El cloruro de cinc, el hidrocloreto de éster etílico de L-cisteína, la sal de oro, el polvo de telurio, el borohidruro de sodio, el citrato de sodio y el agua desionizada (grado HPLC) y la acetona se obtuvieron de Sigma Aldrich. Todas las sustancias químicas tenían pureza analítica, y se usaron tal como se compraron.

15 Síntesis de nanopartículas de ZnTe encaperuzadas con cisteína

Se mezcló polvo de telurio (0,32 mmoles) con 20 ml de agua desionizada en un matraz de tres bocas de fondo redondo a temperatura ambiente. Se añadió borohidruro de sodio (0,81 mmoles) a la mezcla de reacción en condiciones inertes. Después de 2 horas, se añadieron 20 ml de ZnCl₂ (sal de cinc) 3,2 x 10⁻⁴ M e hidrocloreto de éster etílico de L-cisteína (agente encaperuzante) a la mezcla de reacción en relaciones molares de 1:10. La mezcla de reacción se calentó entonces a 60°C durante 3 horas bajo nitrógeno gaseoso. Las nanopartículas de ZnTe encaperuzadas con cisteína se separaron de la mezcla mediante técnicas de filtración, y la muestra se concentró entonces mediante evaporación giratoria, seguido de la precipitación de las nanopartículas de ZnTe solubles en agua usando acetona. Este producto se centrifugó para dar el pelete, que entonces se secó a vacío y se pesó para dar un material que se dispersa fácilmente en agua.

25 Síntesis de nanopartículas de oro

Las nanopartículas de oro se prepararon según el procedimiento descrito por Turkevich et al. Se insertó una barra agitadora magnética en 500 ml de agua destilada hirviendo. Al agua hirviendo se añadió una alícuota de 2 ml de cloruro de oro al 1% y 10 ml de citrato de sodio (1,47 g de 0,5 m), y la reacción transcurrió durante 10 minutos hasta que se observa una disolución roja oscuro.

30 Síntesis de nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe

En una reacción a temperatura ambiente típica, se mezcló polvo de telurio (0,041 g, 0,32 mmoles) con agua destilada estéril (15,0 ml) en un matraz de fondo redondo de tres bocas. Se añadieron cuidadosamente 15,0 ml de una disolución acuosa de borohidruro de sodio (0,031 g, 0,79 mmoles) a la disolución de telurio en condiciones inertes (Ecuación 1).



35



40

Después de 2 h de reducción, se añadieron simultáneamente 20,0 ml de disolución acuosa de ZnCl₂ (0,0436 g, 0,32 mmoles) y 40,0 ml de disolución acuosa de hidrocloreto de éster etílico de L-cisteína (0,1188 g, 0,32 mmoles) a la disolución de ion telurio púrpura oscuro (Ecuación 2). La disolución se agitó durante 30 minutos, seguido del ajuste del pH. La reacción se dejó transcurrir a pH 7, durante 3 horas a 60°C. Se añadió una alícuota de 40 ml de la disolución de nanopartículas de oro a la disolución de ZnTe encaperuzada con cisteína, y la reacción se dejó transcurrir durante 4 horas. La mezcla de reacción se filtró y se centrifugó para dar un material negro verdoso oscuro que se dispersó fácilmente en agua destilada estéril.

Caracterización de las nanopartículas

45 Para llevar a cabo las medidas en el intervalo de longitudes de onda de 200-1100 nm a temperatura ambiente, se usó un espectrofotómetro de UV-vis Perkin-Elmer Lambda 20. Las muestras se colocaron en cubetas de cuarzo (camino óptico de 1 cm), y se registró la absorbancia. Los espectros de fotoluminiscencia (PL) se registraron en un

espectrómetro de luminiscencia Perkin-Elmer LS 55 con una lámpara de xenon a lo largo de un intervalo de 200-800 nm. Las muestras se colocaron en cubetas de cuarzo (camino óptico de 1 cm), y se analizaron y registraron los picos de excitación. Las muestras para formación de imágenes mediante S/TEM y el análisis espectroscópico se prepararon moldeando en gota una disolución alícuota de material de nanopartículas de Au-ZnTe sobre una rejilla de soporte para TEM (que consiste en una película amorfa de carbono agujereada soportada sobre una malla de cobre), y permitiendo entonces que el disolvente se evapore a temperatura ambiente. La formación de imágenes mediante TEM preliminar de las nanopartículas de Au, ZnTe y de Au-ZnTe se llevó a cabo usando un Philips CM120 BIOTWIN TEM que funciona a 120 kV. Para la formación de imágenes de alta resolución de las muestras de Au-ZnTe, se usó un microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (HRTEM) JEOL JEM 3010 URP que funciona a 300 kV. La formación de imágenes de campo oscuro anular de alto ángulo (HAADF) se llevó a cabo en un microscopio electrónico de transmisión de barrido (STEM) Titan G2 80-200 ChemiSTEMTM que funciona a 200 kV con un ángulo de convergencia de 18 mrad y un ángulo interno de HAADF de 54 mrad. La espectroscopía dispersiva de energías de rayos X (XEDS) se llevó a cabo usando el sistema detector de rayos X Titan's Super-X, que tiene un ángulo de colección de sólidos de 0,7 srad. Las medidas de XRD de las muestras de Au-ZnTe se llevó a cabo usando un difractor avanzado Bruker aXS D8 con radiación de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), que funciona a 40 kV y 40 mA. La formación de imágenes mediante TEM de la absorción celular de las nanopartículas se llevó a cabo usando un Philips CM120 BIOTWIN TEM que funciona a un voltaje acelerador de 120 kV con la muestra enfriada a 80 K. El potencial Zeta de las nanopartículas de núcleo/corteza se determinó mediante un Zetasizer, Nanoseries, Malvern Instrument. Las muestras se filtraron varias veces a través de un filtro de membrana Millipore de 0,22 mm antes de registrar las medidas de la carga superficial. Las imágenes de fluorescencia se registraron usando un microscopio de fluorescencia y de contraste de fases Carl Zeiss Axio Imager 2. La sección transversal de la muestra de células PL45 se colocó en un portaobjetos y se visualizó bajo un conjunto de filtros de Dapi y Alexa.

Las nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe se sintetizaron como se describió anteriormente usando un nuevo método de un recipiente, bajo una atmósfera inerte. Se observó un color púrpura oscuro tras 2 horas, indicando la reducción del polvo de telurio. La disolución cambió de color parduzco oscuro a negro tras la adición de cloruro de cinc e hidrocloreto de éster etílico de L-cisteína. El material de esta reacción se purificó para el análisis de caracterización. Se midieron las propiedades de absorción del material progenitor y del material de núcleo/corteza. Las nanopartículas de ZnTe encaperuzadas con cisteína mostraron un pico de absorción a 269 nm (Fig. 14a), que se atribuye al complejo de Zn-ligando como se observó previamente para CdTe encaperuzado con cisteína. Las nanopartículas de oro mostraron su absorbancia de resonancia de plasmones de superficie (SPR) característica a aproximadamente 515 nm (Fig. 14b). Los espectros de absorción de las nanopartículas de Au-ZnTe mostraron un pico de absorción a 538 nm (Fig. 14c), un desplazamiento al rojo en relación con la absorción del oro. La posición y la forma de la absorción del pico del sistema de núcleo/corteza de Au-ZnTe no muestra semejanza con los de los materiales precursores.

Se estudiaron las propiedades de fotoluminiscencia de las nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe (Fig. 15). Las nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe mostraron emisiones bruscas, con forma gaussiana. La excitación a diferentes longitudes de onda (300, 310 y 320 nm) produjo un pico constante a 402 nm en los espectros de PL (Fig. 15a, b y c). Los informes previos sobre nanopartículas de ZnTe muestran emisión en el intervalo de 400-600 nm.

Las imágenes de TEM de Au-ZnTe mostraron partículas esféricas con diámetros en el intervalo de 2-10 nm. La disposición autoensamblada de las nanopartículas de Au-ZnTe sobre la rejilla de carbono es similar a la dada a conocer para Au-CdSe. En el análisis de TEM de alta resolución se observaron agrupamientos aglomerados de partículas esféricas con forma regular con núcleos de oro oscuros y cortezas de ZnTe más transparentes. Las imágenes de HRTEM mostraron partículas con bordes de red. El espaciado de la red de 0,32 nm observado en la (Fig. 16b) se asigna al plano {111} de ZnTe cúbico.

Los espectros de HAADF-STEM y de EDX se usaron para confirmar la estructura y relación de los materiales de núcleo/corteza heteroestructurados. Los datos obtenidos de este estudio (presentados en la Fig. 17) confirman la estructura de núcleo/corteza de las nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe. El oro se observó como un material del núcleo, mientras que ZnTe se observó como el material de corteza con un grosor de ± 2 nm. Un barrido de línea comparativo del área seleccionado en la muestra muestra las relaciones de Au, Zn y Te en las nanopartículas de núcleo/corteza.

El patrón de difracción de rayos X de polvo de las nanopartículas de Au-ZnTe se muestra en (Fig. 18a). El patrón revela picos característicos tanto para Au como para ZnTe. Los tres picos a $2\theta = 27^\circ$, 40° y 49° corresponden al espaciado de red esperado de los planos {111}, {220} y {311} de la estructura de ZnTe mezclado con cinc cúbico. Los picos a $2\theta = 38^\circ$, 46° , 65° y 78° se asignaron a los planos de red {111}, {220}, {200} y {222} de oro cúbico. No fue posible dar cuenta de los picos no asignados que se observaron en el patrón de XRD. Se consideró la formación de ZnS como nanomaterial secundario como se dio a conocer previamente para CdTe encaperuzado con cisteína, con lo que el azufre de la cisteína se hidroliza y reacciona con cadmio para formar una corteza de CdS adicional. No se encontraron pruebas a partir del patrón de difracción de XRD de la formación de ZnS a través de la reacción del azufre de la cisteína. Es posible que algunos de los picos no asignados se pudiesen atribuir a telurio sin reaccionar procedente de la reacción.

EJEMPLO 4

Absorción celular de nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe

Una de las atracciones clave del sistema de nanopartículas de Au-ZnTe reside en las aplicaciones que surgen. Se investigó la biocompatibilidad de este sistema de núcleo/corteza con estirpes de células cancerosas humanas procedentes de diversos órganos. Este ejemplo se restringe a la estirpe celular de adenocarcinoma de páncreas humano (PL45) que se cocultivó con nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe. La toxicidad celular se estudió usando el ensayo de WST-1, que se basa en la escisión de la sal de tetrazolio soluble en agua hasta un colorante de formazano mediante succinato-tetrazolio reductasa, ocurriendo esta reacción en la cadena respiratoria mitocondrial y siendo activa solamente en células viables.

10 Medios de cultivo tisular y estirpe celular

Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), disolución salina amortiguada con fosfato (PBS) de Dulbecco, tripsina, 100x pen-strep Fungizone (PSF) y suero fetal de ternera (FCS). Todos los reactivos del cultivo tisular celular se suministraron por Invitrogen. La estirpe celular de adenocarcinoma de páncreas humano PL45 se adquirió de la American Type Culture Collection (ATCC) y se usó en los experimentos. La estirpe celular de adhesión se hizo crecer en medio DMEM que contiene 10% de FBS y 1-2% de PSF, a una densidad celular de 5000. Las células que crecieron como monocapas se desgasificaron, se sometieron a tripsina y se cosecharon para experimentación antes de que alcanzasen el 100% de confluencia.

Ensayo de viabilidad celular WST-1

La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de WST-1 (4-[3-(4-yodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-bencenodisulfonato) (Roche diagnostics, Mannheim, Alemania), según las instrucciones del fabricante. Las células tratadas con nanopartículas y las del control se sembraron en una placa de 96 pocillos a una densidad celular de 105 por pocillo en 100 μ l de medios de cultivo apropiados. Las células se cultivaron en CO₂ a 37°C durante 48 horas. A cada pocillo de tratamiento se añadió reactivo de WST-1 reconstituido, y se incubó durante 2 horas a 37°C. La placa se agitó durante 30 segundos, y la absorbancia se midió a 450 nm usando un lector de microplacas Multiskan FC. Todos los experimentos se repitieron por triplicado, y los resultados se representaron como una media SEM (error estándar de la media), usando la siguiente fórmula: (muestra de ensayo)/(control de disolvente)*100 = % de viabilidad celular

Absorción celular de nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe

Las estirpes celulares PL45 se trataron con nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe durante 48 horas a las siguientes concentraciones, 3,125, 6,25, 12,5, 25 y 50 μ g/ml. Las células tratadas se fijaron entonces con glutaraldehído al 2,5% durante 24 horas, seguido de un lavado con amortiguador de fosfato. Se añadió a las células un postfijado de tetróxido de osmio al 0,5%, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de un lavado con amortiguador de fosfato. Las células se deshidrataron entonces con acetona al 30, 50, 75 y 100%. Se añadieron resina y acetona a la muestra en volúmenes iguales, seguido de una incubación durante 4 horas a temperatura ambiente. Las células se colocaron en moldes y en resina completa, seguido de una incubación durante toda la noche a 70°C. Los bloques de las muestras en resina se seccionaron en secciones transversales ultrafinas usando un microtomo, se tiñeron y se visualizaron con un microscopio electrónico de transmisión.

Las células PL45 no mostraron inhibición de la proliferación celular dependiente de la dosis tras 72 horas de exposición a nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe a las siguientes concentraciones 3,125, 6,25, 12,5, 25 y 50 μ g/ml (Fig. 19a). En (Fig. 19b, c y d) se presenta una comparación de la morfología celular tras la exposición a nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe. No se observaron variaciones significativas de la morfología en la estirpe celular de cáncer de páncreas.

La interacción de las nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe y PL45 se investigó usando embibición, seccionamiento ultrafino con microtomo, y formación de imágenes mediante TEM. Se confirmó la absorción celular y el aislamiento de las nanopartículas de núcleo/corteza a través de interacciones de membrana. La capa superficial de cisteína puede haber sido la responsable de las interacciones de membrana con las nanopartículas de núcleo/corteza (Fig. 20a-f). Se visualiza claramente el proceso de absorción y aislamiento en vacuolas de las nanopartículas. El mecanismo mediante el cual el nanomaterial pasa las membranas celulares está todavía bajo investigación.

La carga superficial de los nanomateriales es un factor importante que se puede alterar mediante la unión de bioconjugados. La monitorización de la carga superficial permite el control en interacciones electrostáticas e hidrófobas dentro de los sistemas biológicos, dando como resultado aplicaciones de direccionamiento intracelular y transporte de fármacos. La medida del potencial Zeta se usó para determinar la carga superficial de los precursores progenitores, del núcleo/corteza de Au-ZnTe, y de cisteína. Además, se usó para determinar cuán eficientemente ha pasivado el agente encaperuzante la superficie más externa de las nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe. Los precursores progenitores Au y ZnTe presentaron cargas negativas de -65,1 mV y -11,7 mV, respectivamente. De forma interesante, las nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe presentaron una carga positiva próxima a

neutra de 0,0519 mV. La cisteína presentó una carga positiva de 3,95 mV. Los resultados confirmaron que el agente encaperuzante influyó en la carga superficial de Au-ZnTe, y que las nanopartículas de núcleo/corteza están eficientemente pasivadas mediante una capa de cisteína encaperuzante externa. La carga superficial de las nanopartículas de núcleo/corteza ajustará la funcionalización de este nanomaterial para aplicaciones posteriores en selección de células y terapéutica.

Se estudiaron las propiedades de fluorescencia de nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe en las estirpes celulares PL45 usando microscopios de fluorescencia y de contraste de fases. La Fig. 21a muestra la sección transversal de células PL45 embebidas en resina tratadas con nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe bajo campo brillante. La Fig. 21b muestra la misma diapositiva bajo un conjunto de filtros fluorescentes de Dapi. Los resultados ilustran la formación de imágenes mediante nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe. Las emisiones de luz azul corresponden a la longitud de onda de absorción entre 365-415 nm, y se debe a la emisión desde la capa de la corteza de ZnTe. Las Figs. 21c y d presentan diversas secciones en la diapositiva de las muestras que florecen debido a la presencia de las nanopartículas de núcleo/corteza bajo conjuntos de filtro de Dapi y Alexa 388. El foco de este estudio fue optimizar los procedimientos sintéticos y comprender las características de las nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe. La modificación de la superficie del núcleo/corteza con cisteína permitió que las partículas fuesen solubles en agua, así como también biocompatibles. Los grupos funcionales amino de la cisteína se pueden utilizar para la unión de receptores biológicos, marcadores o ligandos. La disposición similar a una cadena observada para nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe es característica de nanopartículas de oro encaperuzadas con cisteína. En su estudio, Horovitz y colaboradores investigaron el ensamblaje de nanopartículas de oro que fueron inducidas por cisteína, un aminoácido que posee un grupo funcional tiol adicional además de la alfa-amina. El efecto del ensamblaje de cisteína se explicó considerando las interacciones electrostáticas de tipo bipolar entre los grupos amina y ácido cargados de las moléculas de cisteína, unidos a las nanopartículas de oro por sus grupos -SH. Tampoco descartaron la interacción entre cisteína y citrato unido a nanopartículas de oro. En este trabajo, la cisteína se une a la corteza de ZnTe con interacciones electrostáticas así como con el oro cubierto de citrato, formando una red o ensamblaje de partículas.

Los informes previos sobre partículas de Au cubiertas con cortezas metálicas mostraron que este pico de absorción de plasmones de superficie se puede ajustar cambiando el grosor de la corteza. Lu et al., demostraron que la absorción de plasmones del oro se desplaza gradualmente hasta que aparece un pico característico del material de corteza. Las propiedades ópticas presentadas por las nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe proporcionan pruebas de que la corteza de ZnTe es fluorescente. La emisión desde las nanopartículas de Au-ZnTe podría ser útil en aplicaciones biomédicas tales como formación de imágenes de tumores. Las propiedades de emisión se pueden reunir siguiendo el movimiento de las partículas de Au-ZnTe revestidas con fármaco en las células, o monitorizando el tamaño tumoral tras los tratamientos con fármacos. Esto puede ser mucho más eficiente que el uso de colorantes orgánicos como marcadores. Los informes sobre toxicidad y biocompatibilidad indican que las nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe son biocompatibles. Estos resultados proporcionan una plataforma para estudios posteriores para investigar las interacciones mecánicas entre las membranas celulares y las nanopartículas de núcleo/corteza, y también para aventurarse en la investigación de la unión superficial de fármacos complementarios y ligandos celulares. Por lo tanto, la invención se amplía al uso de nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe como un sistema molde para la unión de diversos fármacos quimioterapéuticos antimetabólicos y antimetabolitos tales como 5-fluorouracilo, docetaxel y paclitaxel. El uso de una combinación de fármacos de quimioterapia en un sistema de núcleo/corteza facilitará la farmacocinética mejorada y la eficacia terapéutica. Además, los receptores celulares que se presentan en diversos tipos de células cancerosas se pueden unir a la superficie del núcleo/corteza biocompatible para facilitar la terapia que está dirigida específicamente a las células cancerosas.

La presente invención ha optimizado una ruta sintética para producir nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe solubles en agua con distintas características. Los estudios de absorción celular confirmaron la biocompatibilidad de los núcleos/cortezas en los sistemas celulares.

Referencias

1. Danhier, F., Feron, O., Préat, V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J. Controlled Release*. 148, 135-146(2010).
2. Vigderman, L and Zubarev, E.R. Therapeutic platforms based on gold nanoparticles and their covalent conjugates with drug molecules. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 65,663-676 (2013).
3. Chaudhuri, R.G. and Paria, S. Core/Shell Nanoparticles: Classes, Properties, Synthesis Mechanisms, Characterization, and Applications *Chem. Rev.*, 112, 2373-2433 (2012)
4. Huang, X., Jain P.K., El-Sayed, I.H., El-Sayed, M.A. Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy. *Nanomedicine*. 2(5), 681-693 (2007)
5. Hsu, C. Huang, C. Hao, Y. Liu, F. Au/Pd core/shell nanoparticles with varied hollow Au cores for enhanced formic acid oxidation. *Nanoscale Res Lett.* 8:113 (2013)
6. Mitsudome, T. and Kaneda, K. Advanced Core-Shell Nanoparticle Catalysts for Efficient Organic Transformations *ChemCatChem*. 5, 1681-1691 (2013).

7. Habas, S.E Lee, H. Radmilovic V., Somorjai, G.A Yang, P. Shaping binary metal nanocrystals through epitaxial seeded growth. *Nat.Mater.* 6, 692-697 (2007).
8. Slater, M.A., Schroeder, S.L.M., Burke. M.G., O'Brien. P., Carmargo. P.H.C., Haigh. S.J. Correlating catalytic activity of Ag-Au nanoparticles with 3D compositional variations. *Nano Lett.* 14 (4), 1921-1926 (2014).
- 5 9. Lee, J.S., Shevchenko, E.V., Talapin. D.V. Au-PbS core/shell nanocrystals: plasmonic absorption enhancement and electrical doping via intra-particle charge transfer. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 9673 (2008).
10. Li, J., and Zeng, H.C. Size tuning, functionalization, and reactivation of Au in TiO₂ nanoreactors. *Angew. Chem. Int. Ed.* 44, 4342-4345 (2005).
11. Liu, M.Z., Guyot-Sionnest, P. Preparation and optical properties of silver chalcogenide coated gold nanorods. *J. Mater. Chem.* 16, 3942-3945 (2006).
12. Shevchenko, E.V., Bodnarchuk, M.I., Kovalenko, M.V, Talapin, D.V, Smith, R.K., Aloni, S., Heiss, W. A. P. Alivisatos. Tuning the Magnetic Properties of Metal Oxide Nanocrystal Heterostructures by Cation Exchange. *Adv.Mater.* 20, 4323-4329 (2008).
13. Qian, L., Sha,Y., Yang, X. Simple and convenient preparation of Au-Pt core/shell nanoparticles on surface via a seed growth method. *Thin Solid Films.* 515 (4), 1349-1353 (2006).
14. Sun, Z., Yang, Z., Zhou, J., Yeung, M.H., Ni W., Wu, H., Wang, J. A General Approach to the Synthesis of Gold-Metal Sulfide Core-Shell and Heterostructures. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48, 2881 -2885 (2009).
15. Salant, A., Amitay-Sadovsky, E., Banin, U. Directed Self-Assembly of Gold-Tipped CdSe Nanorods. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 10006-10007 (2006).
- 20 16. Mokari, T., Sztrum C.G., Salant, A. Rabani, E. Banin, U. Formation of Asymmetric One-Sided Metal Tipped Semiconductor Nanocrystal Dots and Rods. *Nat. Mater.* 4, 855-863 (2005).
17. Mokari, T., Rothenberg E., Popov, I., Costi R., Banin, U. Selective Growth of Metal Tips onto Semiconductor Quantum Rods and Tetrapods. *Science*, 304, 1787-1790 (2004).
- 25 18. Goon I.Y., Lai, L.M.H., Lim, M., P. Munroe, Gooding, J.J., Amal, R. Fabrication and Dispersion of Gold-Shell-Protected Magnetite Nanoparticles: Systematic Control Using Polyethyleneimine. *Chem. Mat.* 21, 673-681 (2009).
19. Zhang, J., Post, M., Veres, T., Jakubek, Z.J., Guan, J., Wang, D., Normandin, F., Deslandes, Y., Simard, B. Laser-assisted synthesis of superparamagnetic Fe@Au core/shell nanoparticles. *J. Phys. Chem. B.* 110, 7122-7128 (2006).
- 30 20. Bao, Y.P., Calderon, H., Krishnan, K.M. Synthesis and Characterization of Magnetic-Optical Co-Au Core/shell Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C.* 111, 1941-1944 (2007).
21. Pal, S., Morales, M., Mukherjee, P., Srikanth H. Synthesis and Magnetic Properties of Gold-Coated Iron Oxide Nanoparticles. *J. Appl. Phys.* 2009, 105, 07B504 (2009).
- 35 22. Lim, J., Eggeman, A., Lanni, F., Tilton, R.D., Majetich, S.A. Synthesis and single-particle optical detection of low-polydispersity plasmonic-superparamagnetic nanoparticles. *Adv. Mater.* 20, 1721-1726 (2008).
23. Chiang, I.C. and Chen, D.H. Synthesis of Monodisperse FeAu Nanoparticles with Tunable Magnetic and Optical Properties. *Adv. Funct. Mater.* 17, 1311-1316 (2007).
24. Wei, Y.H., Klajn, R., Pinchuk, A.O., Grzybowski, B.A. Synthesis, Shape Control, and Optical Properties of Hybrid Au/Fe₃O₄ Nanoflowers. *Small.* 4, 1635-1639 (2008).
- 40 25. Melancon, M. Lu, W., Li. C. Gold-Based Magneto/Optical Nanostructures: Challenges for In Vivo Applications in Cancer Diagnostics and Therapy. *Mater Res Bull.* 34 (6), 415-421 (2009).
26. Kayal. S. and Ramanujan. V.R. Anti-Cancer Drug Loaded Iron-Gold core-shell nanoparticles (Fe@Au) for Magnetic Drug Targeting. *J Nanosci Nanotechnol.* 10, 1-13(2012).
- 45 27. Pullabhotla, V.S.R. and Revaprasadu, A novel route to cysteine capped Au-CdSe hybrid nanoparticles *N. Mater. Lett.* 63, 2097-2099 (2009)
28. Duncan, B., Kim, C., Rotello, V.M. Gold nanoparticle platforms as drug and biomacromolecule delivery systems. *J Control Release.* 148, 122-127 (2010).
29. Jain, P.K., El-Sayed I.H., El-Sayed M.A. Au nanoparticles target cancer. *Nanotoday.* 2 (1), (2007).
- 50 30. Crowder, B.L., Morehead, F.F., Wagner, P.R. Efficient Injection Electroluminescence in ZnTe by Avalanche Breakdown. *Appl. Phys. Lett.* 8, 148-149 (1966).
31. Sou, I.K., Wong, K.S., Yang, Z.Y. Wang, H., Wong, G.K.L. Highly efficient light emission from ZnSTe alloy. *Appl. Phys. Lett.* 66, 1915-1917 (1995).
32. Wu, Q., Litz, M., Zhang, X.C. Broadband detection capability of ZnTe electro-optic field detectors. *Appl. Phys. Lett.* 68, 2924-2926 (1996).

33. Bhunia, S., and Bose, D.N. Microwave synthesis, single crystal growth and characterization of ZnTe. *J. Cryst. Growth.* 186, 535-542 (1998).
34. Mntungwa, N., Pullabhotla, V.S.R., Revaprasadu, N. Facile synthesis of cysteine and triethanolamine capped CdTe nanoparticles. *Colloids Surf., B.* 101, 450-456 (2013).
- 5 35. Jiang, F., Li, Y., Ye, M., Fan, L., Ding, Y., Li, Y. Ligand-Tuned Shape Control, Oriented Assembly, and Electrochemical Characterization of Colloidal ZnTe Nanocrystals. *Chem. Mater.* 22, 4632-4641 (2010).
36. Kang, S.W., Lee, Y.W., park, Y., Choi, B., Hong, J.W., Park, K., Han, S.W. One-Pot Synthesis of Trimetallic Au@PdPt Core/Shell Nanoparticles with High Catalytic Performance. *ACS Nano.* 7, (9) 7945-7955 (2013).
- 10 37. L'Azou . B., Jorly, J., On, D., Sellier, E., Moisan, F., Fleury-Feith, J., Cambar, J., Brochard, P., Ohayon-Courtès, C. In vitro effects of nanoparticles on renal cells. *Part. Fibre toxicol.* 5: 22. (2008).
38. Gibson, J.D., Khanal, B.P., Zubarev, E.R. Paclitaxel-Functionalized Gold Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 11653-11661 (2007).
39. Patra, C.R., Bhattacharya, R., Mukhopadhyay, D., Mukherjee, P. Fabrication of Gold Nanoparticles for targeted therapy in pancreatic cancer. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 62(3), 346-361 (2010).
- 15 40. Pujalte I., Passagne I., Brouillaud B., Tréguer M., Durand E., Ohayon-Courtès C., L'Azou B. Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells *Part. Fibre toxicol.* 8:10 (2011).
41. Parveen, S., Misra, R., Sahoo, S.K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine.* 8, 147-166 (2012).
- 20 42. Lianga, H., Chenb, C., Chena, S., Kulkarnia, A.R., Chiua, Y., Chena, M., Sung, H. Paclitaxel-loaded poly(g-glutamic acid)-poly(lactide) nanoparticles as a targeted drug delivery system for the treatment of liver cancer. *Biomaterials.* 27, 2051-2059 (2006).
43. Iversen, T., Skotlanda, T., Sandvig, K. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. *Nano Today.* 2011. 6, 176-185 (2011).
- 25 44. Labhasetwar, V. Nanotechnology for drug and gene therapy: the importance of understanding molecular mechanisms of delivery. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 674-680 (2005).
45. Mocanu, A., Cernica, I., Tomoaia, G., Bobos, L., Horovitz, O., Tomoaia-Cotisel, M. Self-assembly characteristics of gold nanoparticles in the presence of cysteine. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 338, 93-101 (2009).
- 30 46. Zeta potential: a surface electrical characteristic to probe the interaction of nanoparticles with normal and cancer human breast epithelial cells. *Biomed Microdevices.* 10,321-328 (2008).
47. A. Valizadeh, H. Mikaeili, M. Samiei, S. M. Farkhani, N. Zarghami, M. kouhi, A. Akbarzadeh, S. Davaran. Quantum dots: synthesis, bioapplications, and toxicity. *Nanoscale Res Lett.* 7, 480 (2012).
- 35 48. L. Shao, Y. Gao, F. Yan. Semiconductor Quantum Dots for Biomedical Applications. *Sensors.* 11, 11736-11751 (2011).
49. Hao, X., Zhou, M., Zhang, X., Yu, J., Jie, J., Yu, C., Zhang, X. Highly luminescent and photostable core-shell dye nanoparticles for high efficiency bioimaging. *Chem. Commun.* 50, 737-739 (2014).
50. Lu, L., Burkey, G., Halaciuga, I., Goia, D.V. Core-shell gold/silver nanoparticles: Synthesis and optical properties. *Journal of Colloid and Interface Science.* 392, 90-95 (2013).
- 40 51. Kimling, J., Maier, M., Okenve, B., Kotaidis, V., Ballot, H., Pleach, A. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *J Phys Chem B.* 110(32), 15700-15707 (2006).

REIVINDICACIONES

1. Una nanopartícula compuesta de un núcleo que comprende oro y una primera capa que comprende telururo de cinc provista sobre el núcleo, en la que el telururo de cinc está encaperuzado con cisteína.
- 5 2. Una nanopartícula según la reivindicación 1, en la que el telururo de cinc está encaperuzado con hidrocloreto de éster etílico de L-cisteína.
3. Una nanopartícula según la reivindicación 1 o 2, que comprende además una segunda capa que comprende un fármaco quimioterapéutico antimetabolito y/o antimetabólico, un marcador químico y/o un ligando celular, segunda capa la cual se proporciona sobre la primera capa.
- 10 4. Una nanopartícula según la reivindicación 3, en la que el fármaco quimioterapéutico antimetabolito y/o antimetabólico se selecciona de oxaliplatino, cisplatino, irinotecán, paclitaxel, 5-fluorouracilo y docetaxel.
5. Una nanopartícula según la reivindicación 1, para uso en terapia y/o diagnóstico.
6. Una nanopartícula según la reivindicación 5, para uso en terapia y/o diagnóstico de cáncer en un ser humano o animal.
- 15 7. Una nanopartícula según la reivindicación 6, para uso en formación de bioimágenes, detección de tumores y/o termodestrucción.
8. Una nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que tiene un diámetro entre 2 y 20 nanómetros.
- 20 9. Un método para producir una nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, comprendiendo el método efectuar la conversión del material precursor del núcleo de la nanopartícula en oro, depositar la capa de telururo de cinc sobre el núcleo de oro, y encaperuzar el telururo de cinc con cisteína.
10. El método según la reivindicación 9, en el que el material precursor del núcleo de nanopartículas es cloruro de oro.
11. Un método para producir un nanomaterial de oro-telururo de cinc encaperuzado con cisteína, comprendiendo el método las etapas de:
 - 25 a. reducir una sal de oro;
 - b. añadir telururo reducido, sal de cinc y cisteína para formar una disolución de puntos cuánticos de telururo de cinc encaperuzados con cisteína; y
 - c. añadir la sal de oro reducida a la disolución preparada de puntos cuánticos de telururo de cinc encaperuzados con cisteína, para producir una disolución de nanopartículas de núcleo/corteza de oro-telururo de cinc encaperuzadas con cisteína.
- 30 12. Un método según la reivindicación 13, en el que la sal de oro es cloruro de oro.
13. Un sistema de suministro de fármacos de nanoescala, que comprende una nanopartícula de núcleo/corteza de oro-telururo de cinc encaperuzada con cisteína.

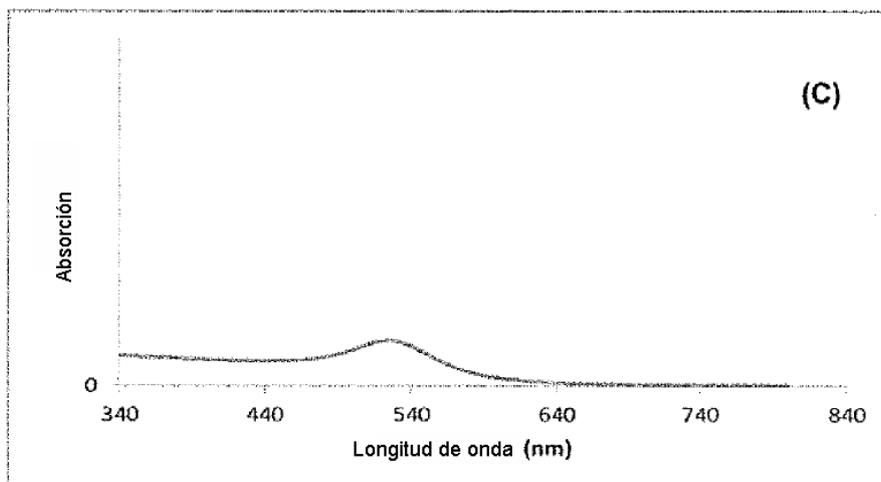
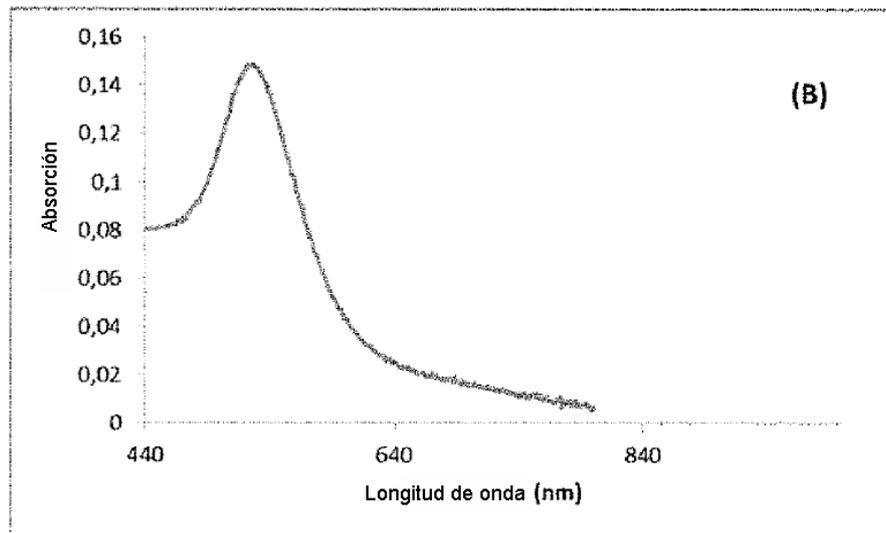
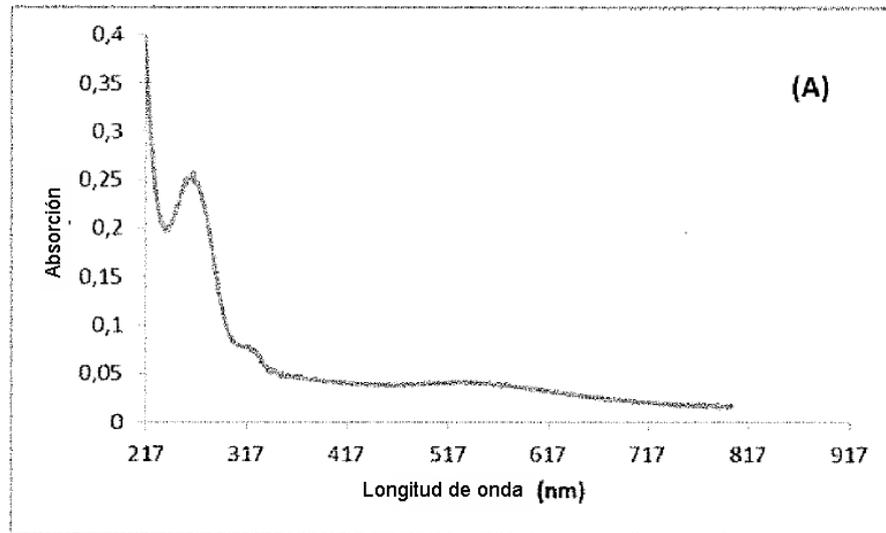


Figura 1

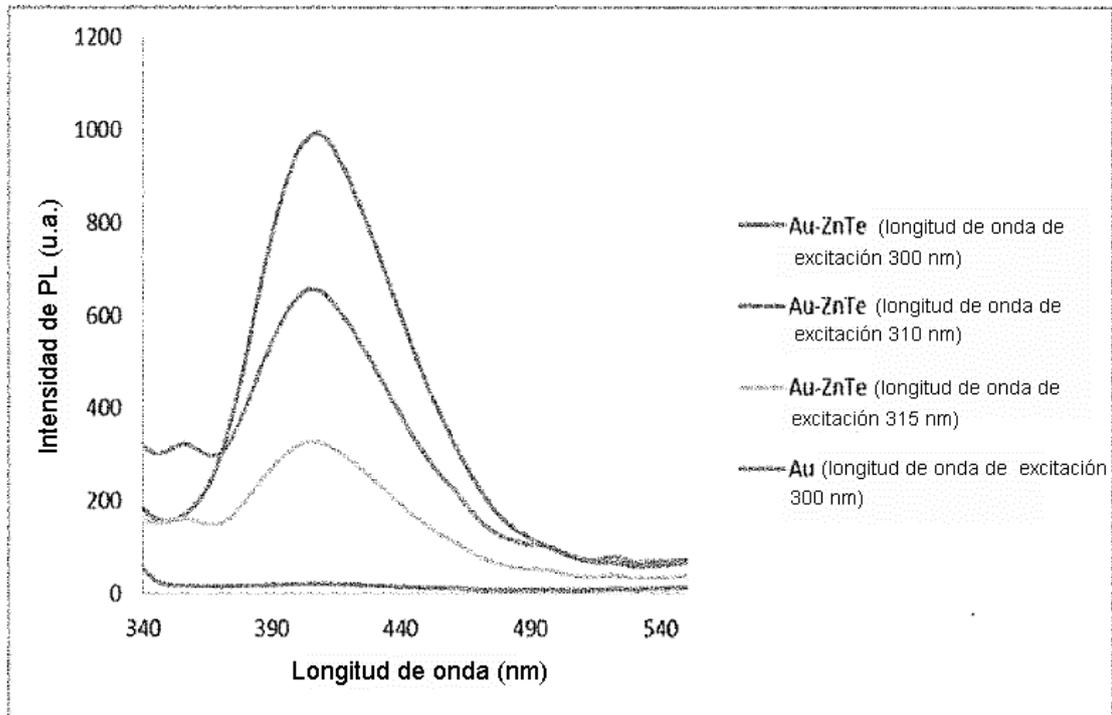


Figura 2

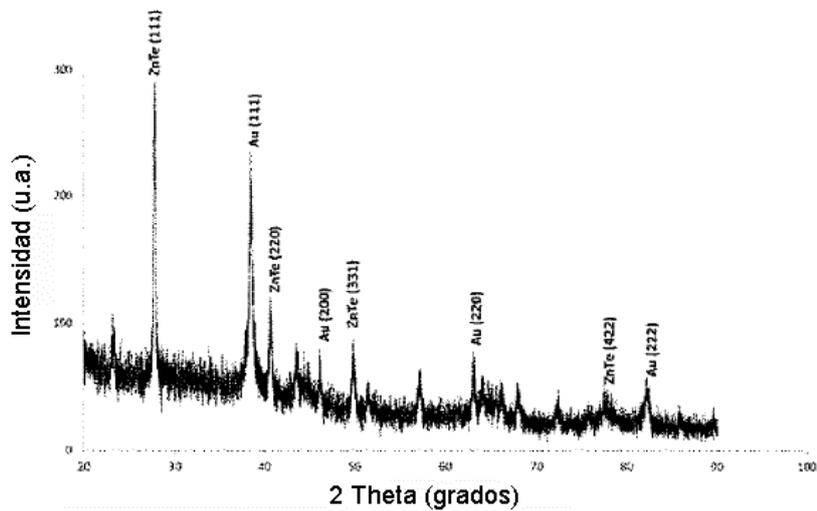


Figura 7. Espectro de XRD de nanopartículas de núcleo/corteza de Au-ZnTe

Figura 3

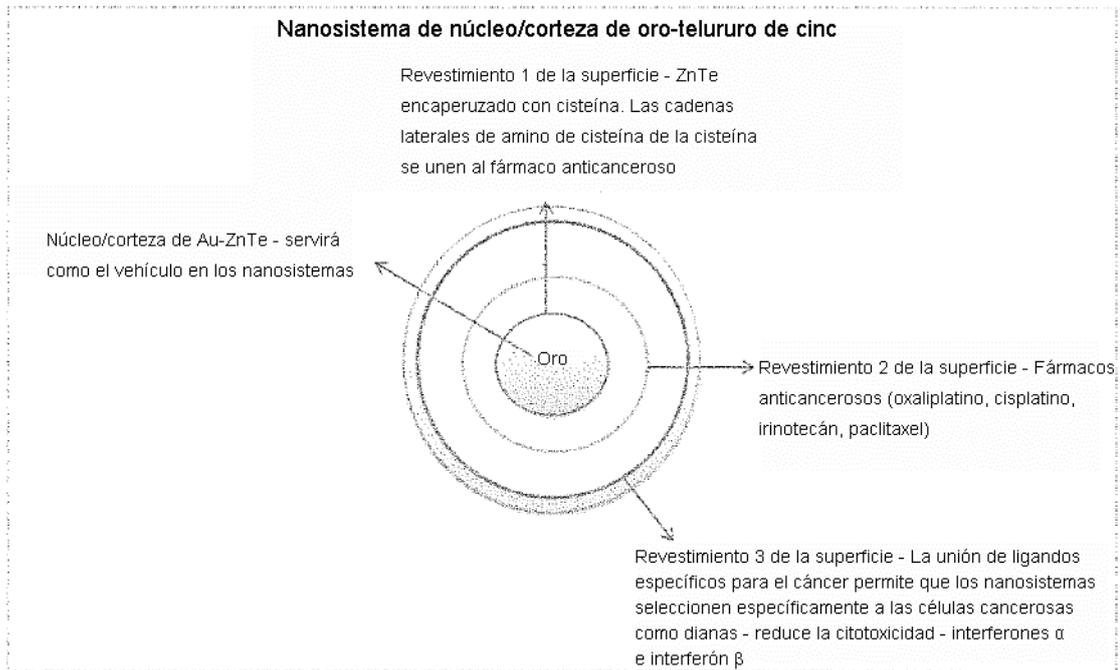


Figura 4

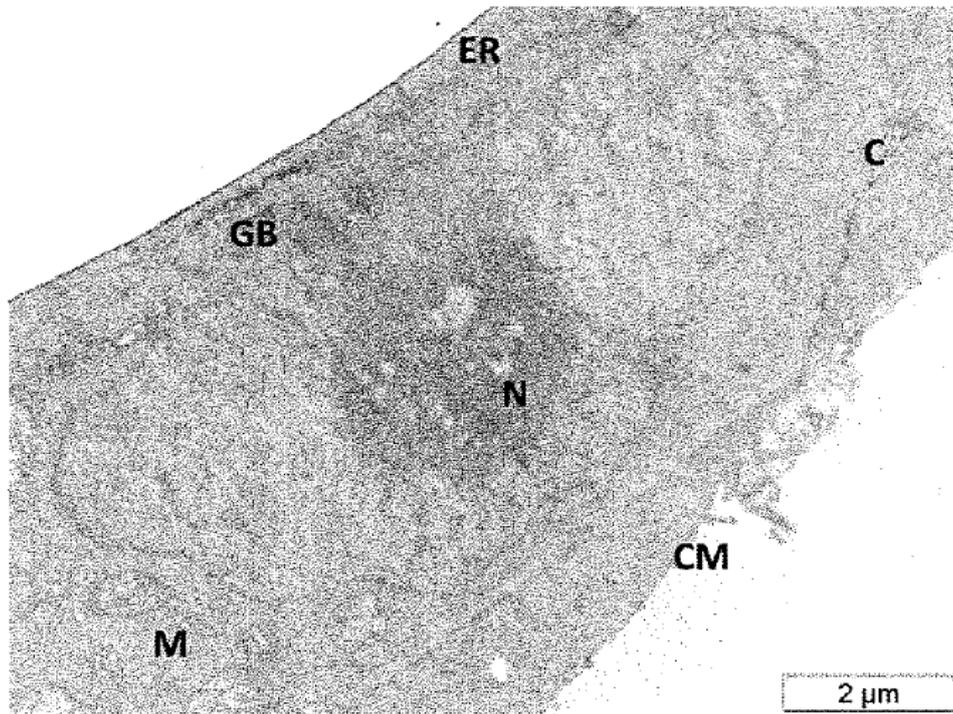


Figura 5

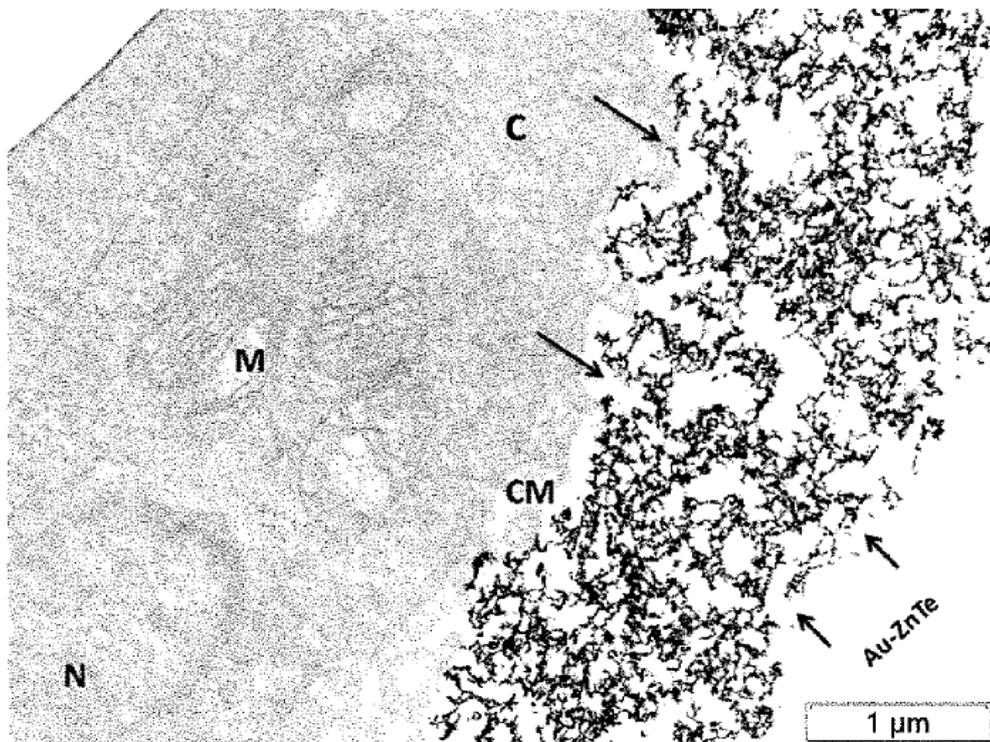


Figura 6

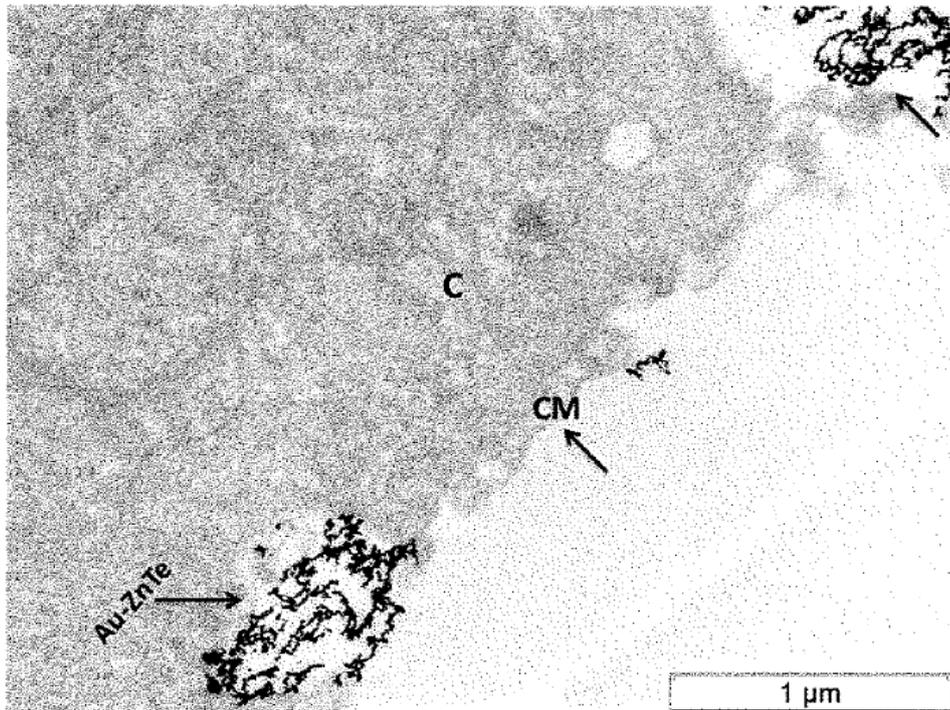


Figura 7

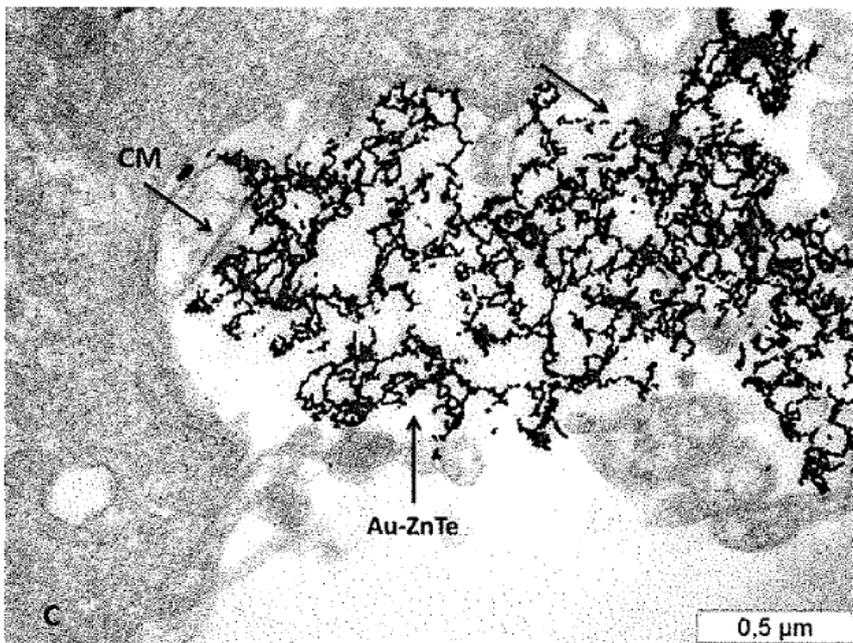


Figura 8

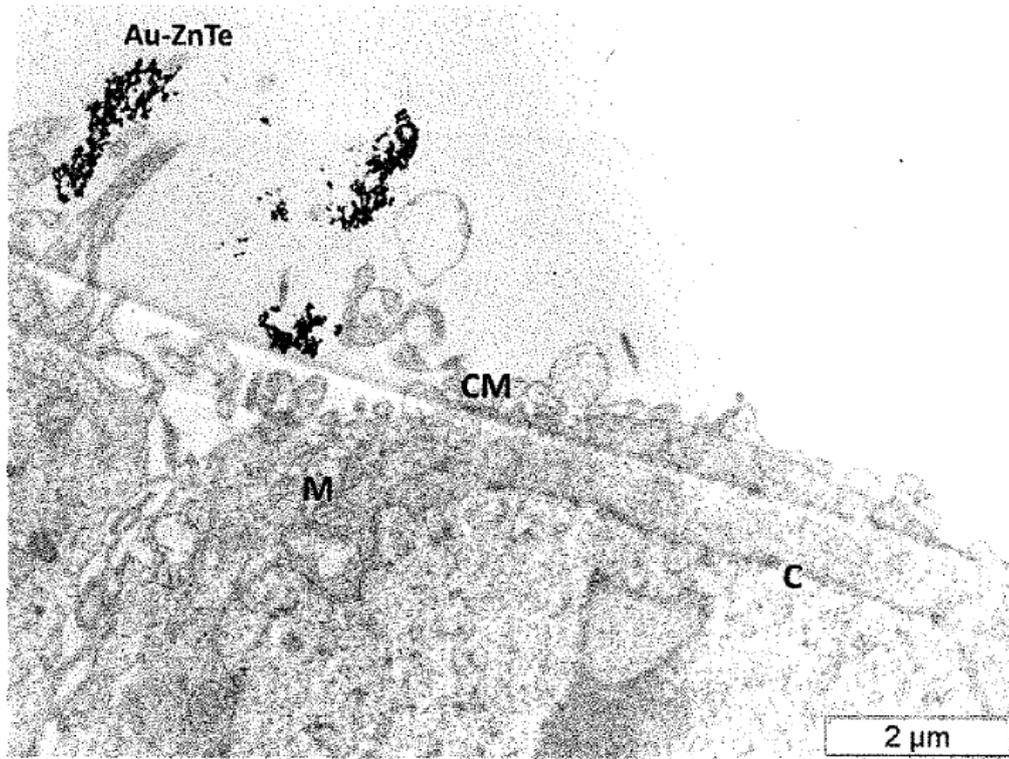


Figura 9

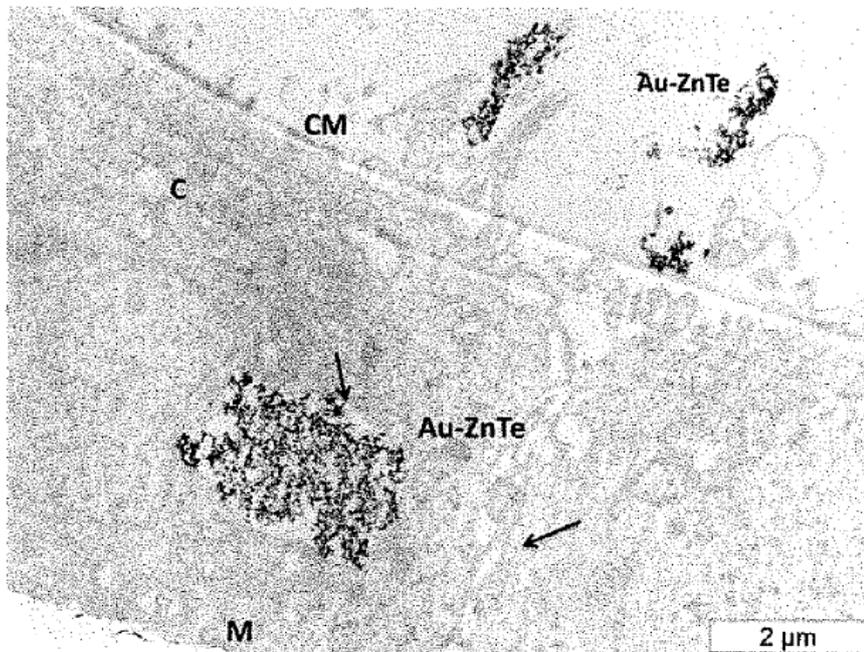


Figura 10

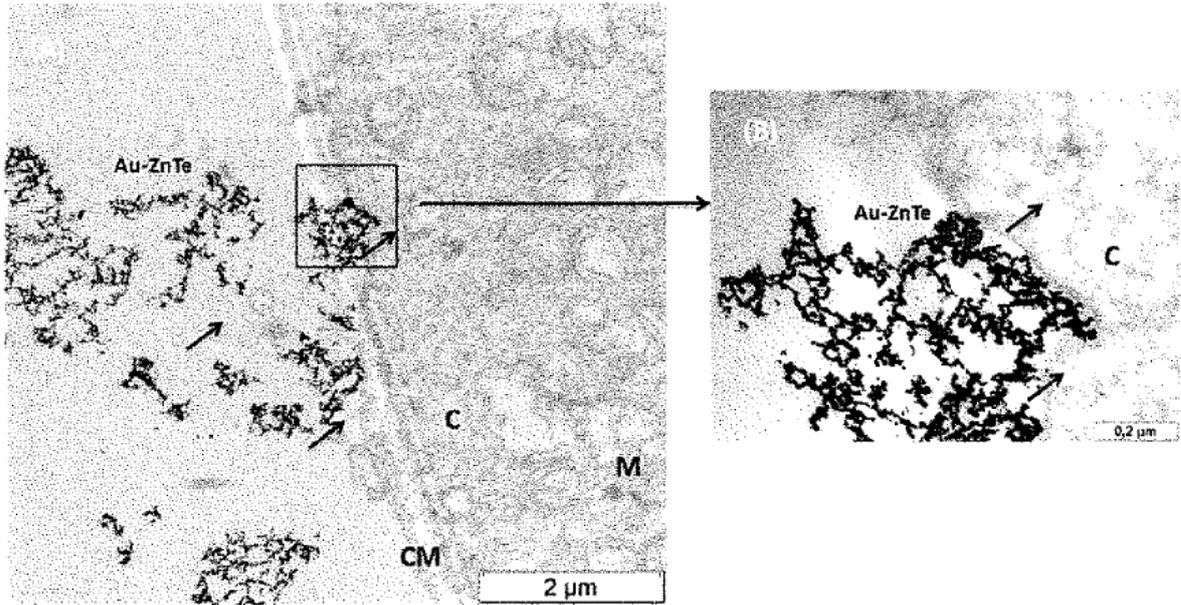


Figura 11

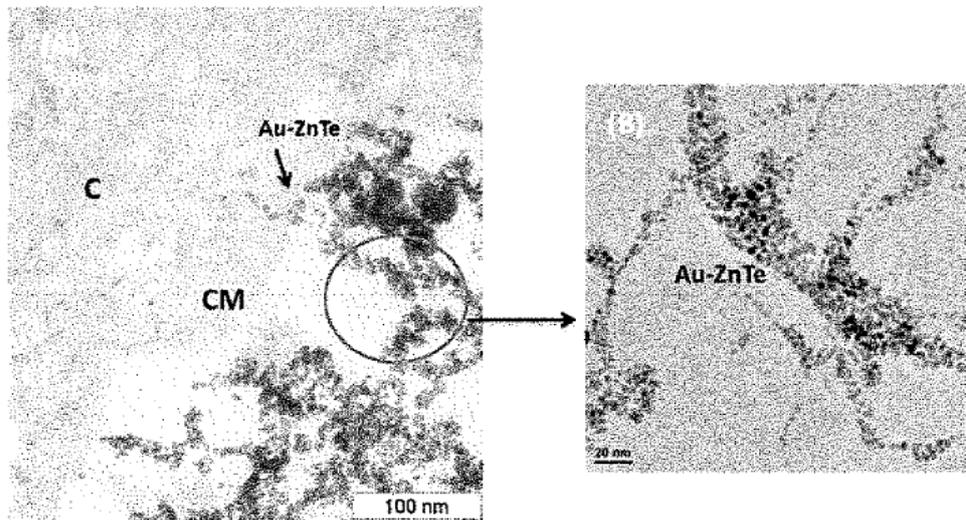


Figura 12

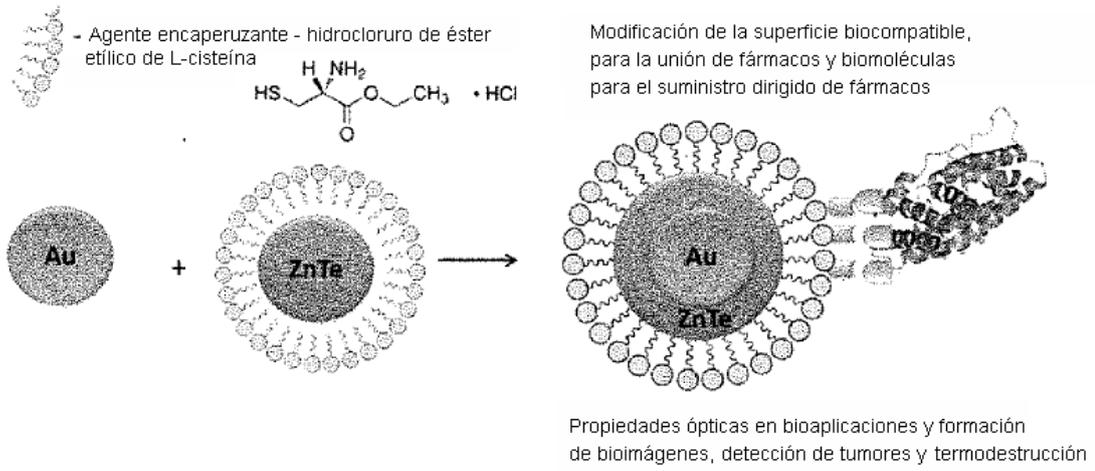


Figura 13

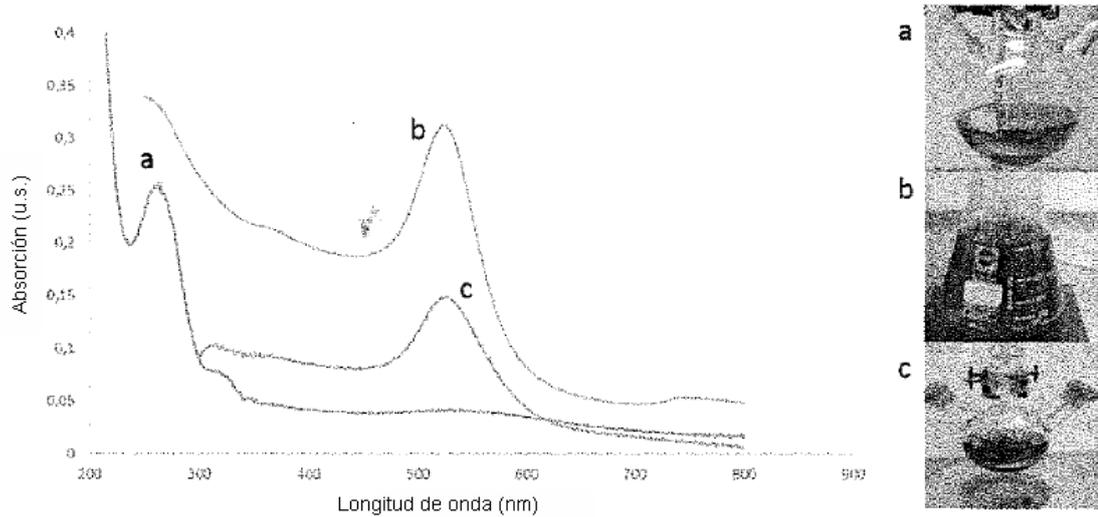


Figura 14

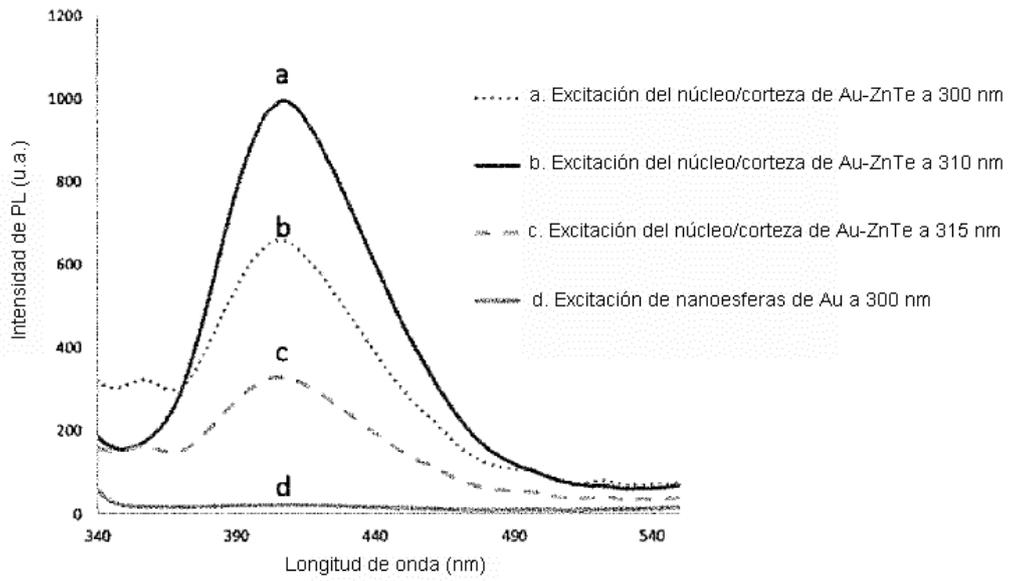


Figura 15

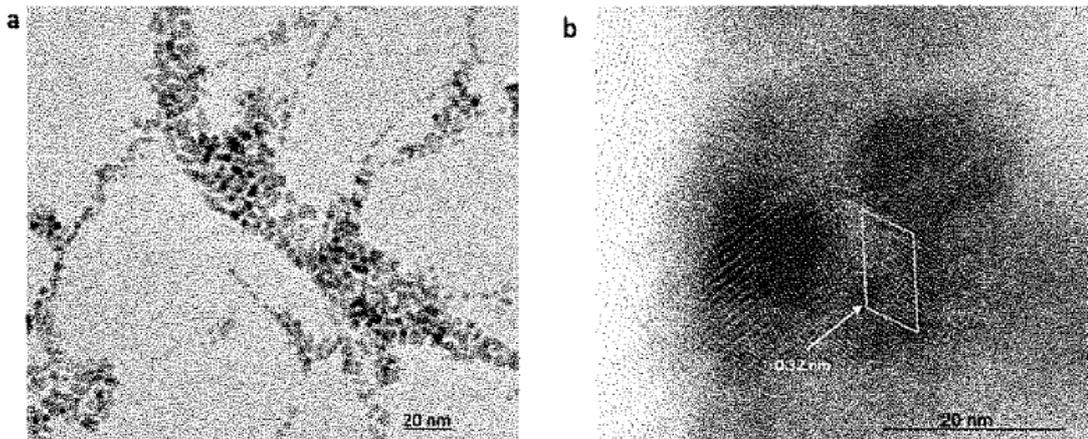


Figura 16

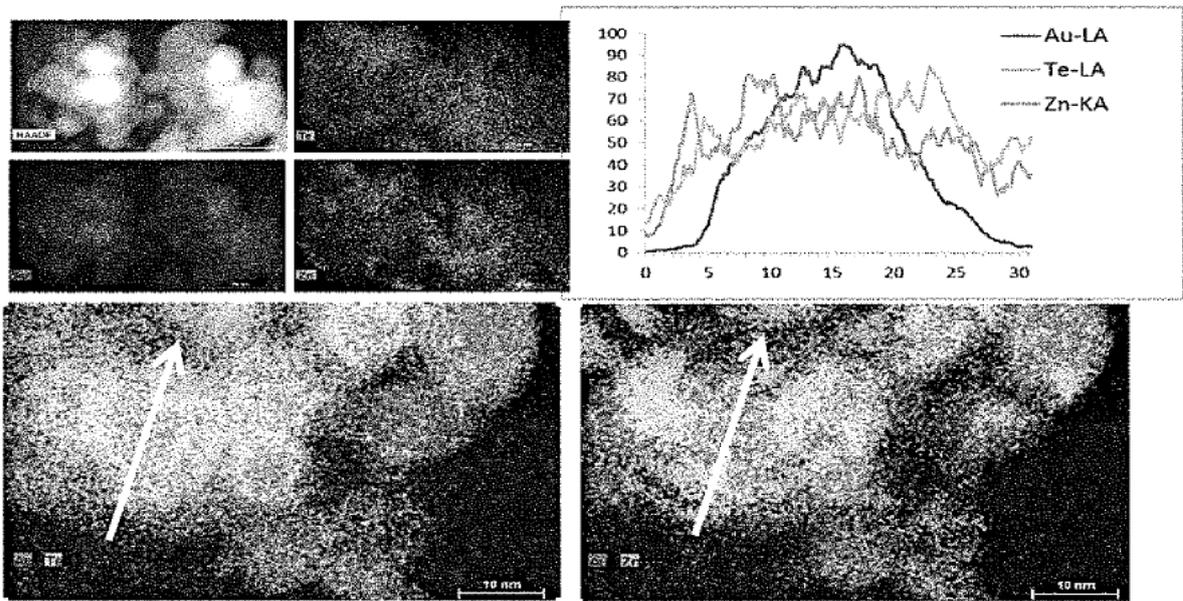


Figura 17

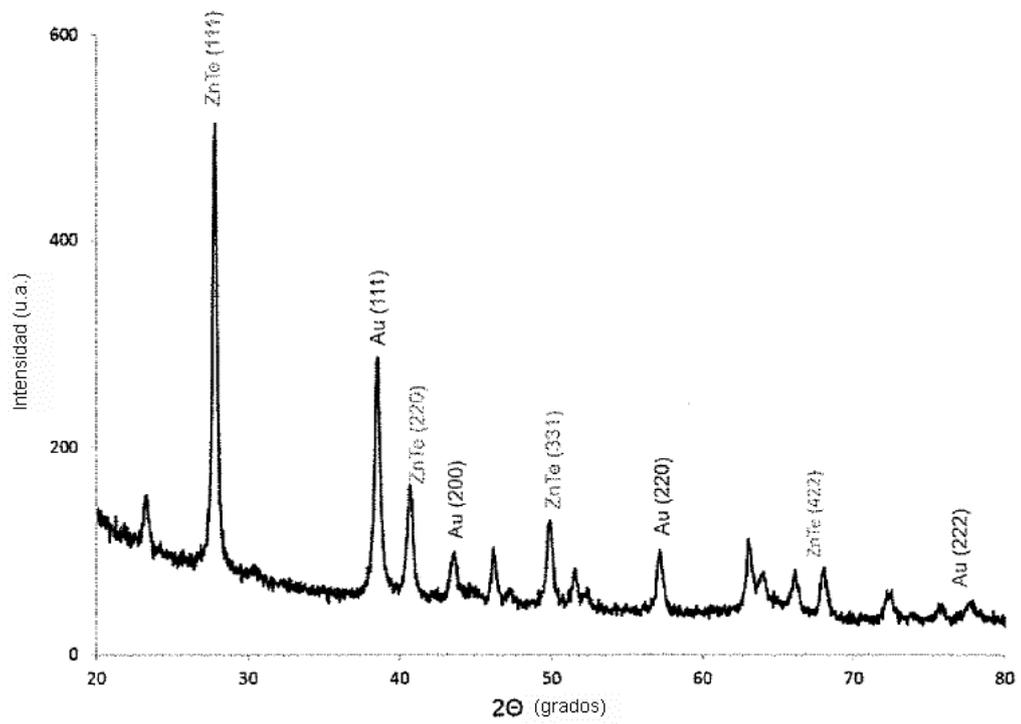


Figura 18

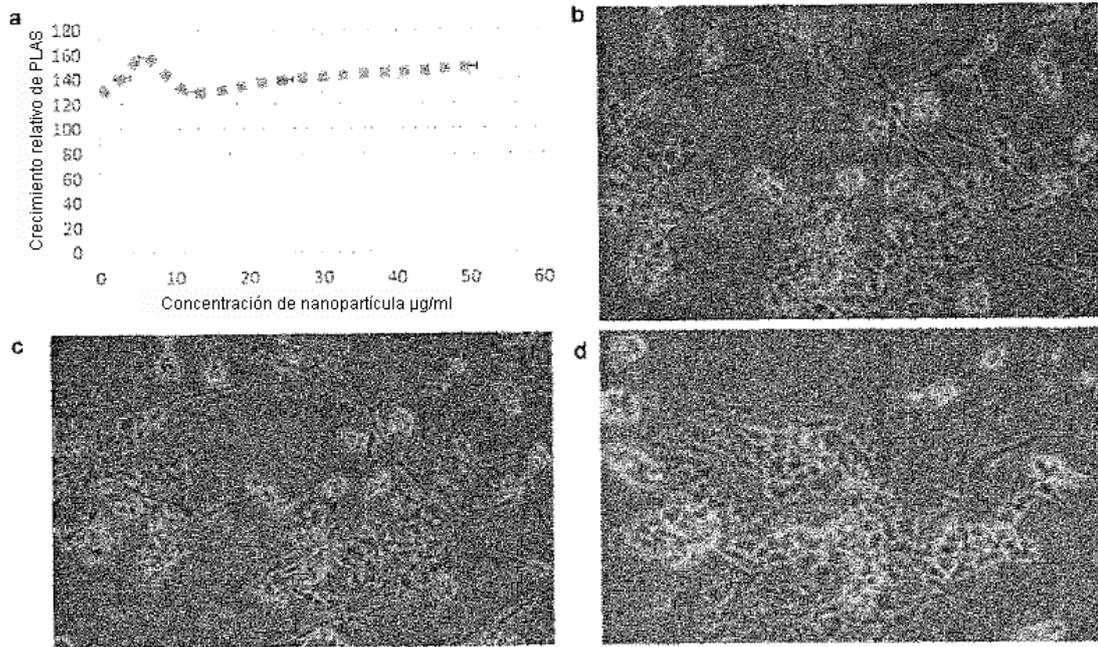


Figura 19

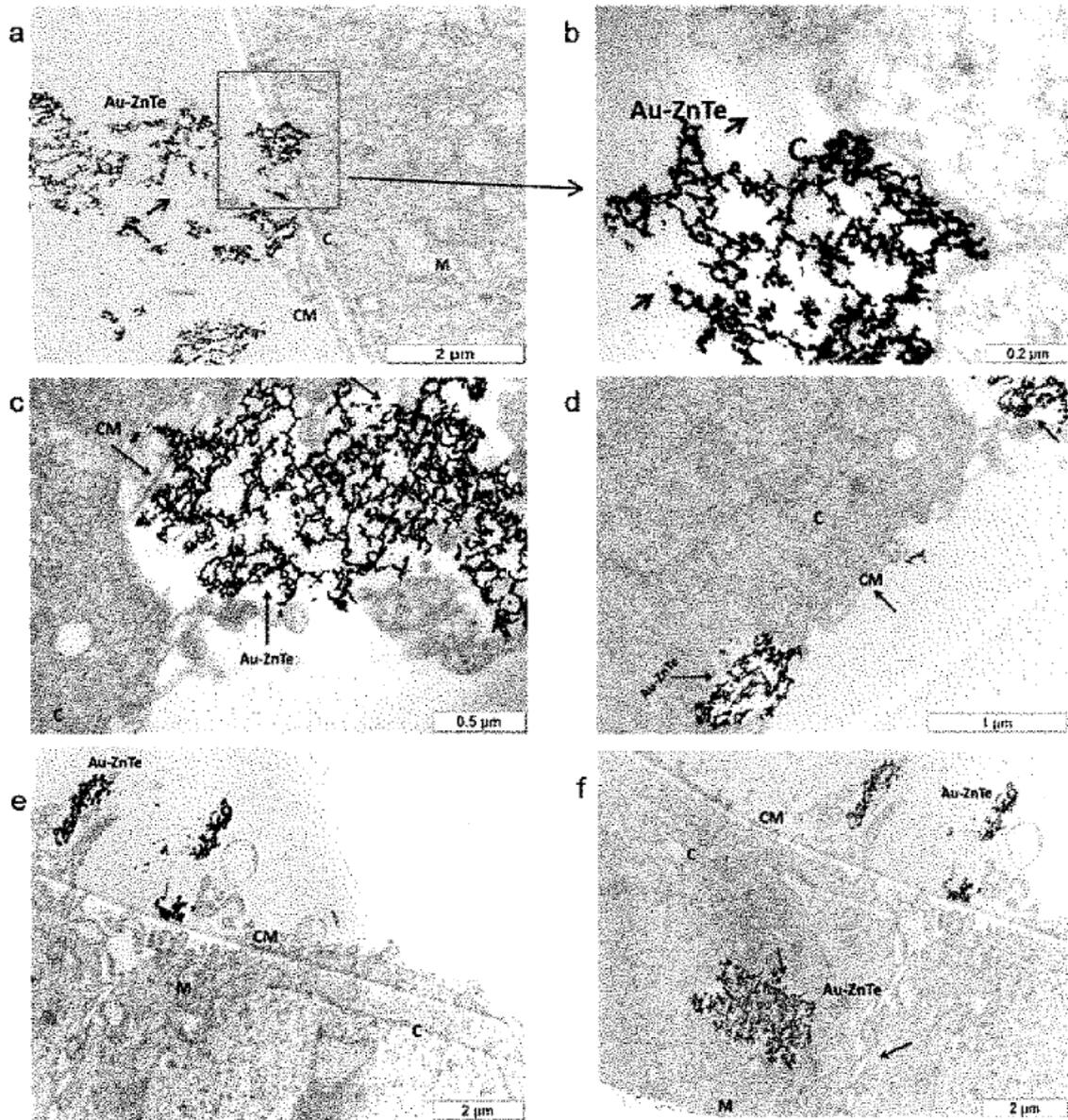


Figura 20

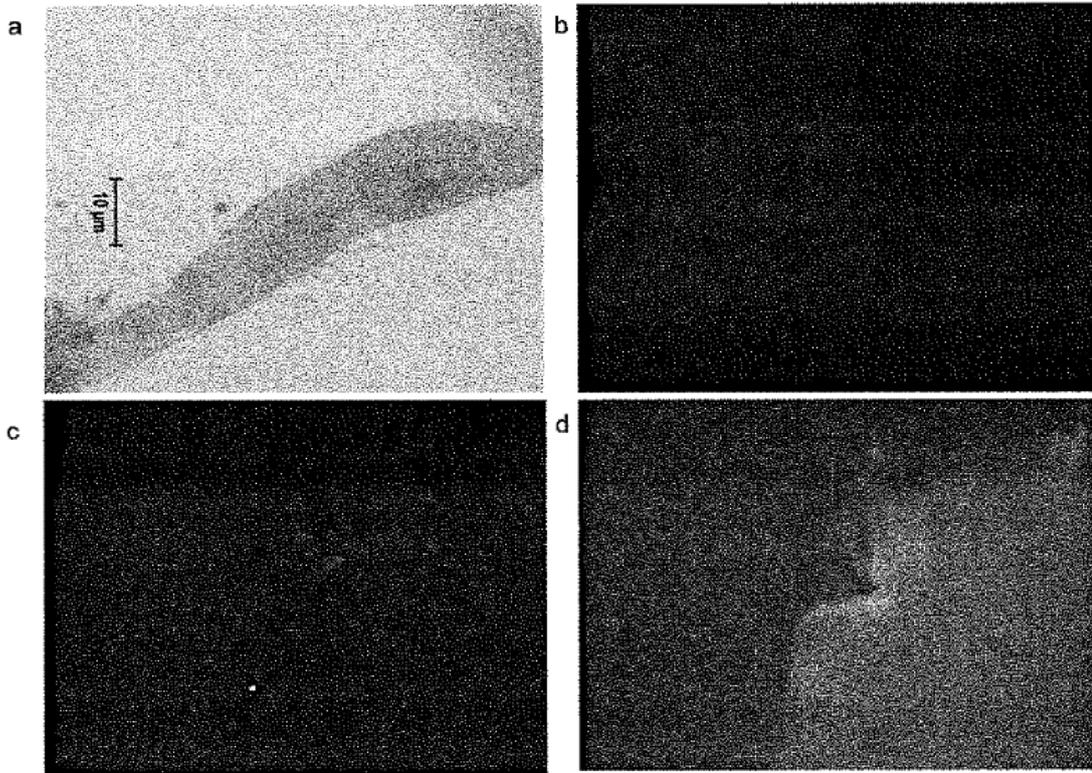


Figura 21