

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 963**

51 Int. Cl.:

A61K 49/00 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

B82Y 15/00 (2011.01)

G01N 33/58 (2006.01)

C09K 11/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2007 PCT/EP2007/011100**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2008 WO08074461**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2007 E 07856832 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 2124880**

54 Título: **Nanopartículas fluorescentes**

30 Prioridad:

18.12.2006 DE 102006060155

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

23.05.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MITTMANN, KARIN;
BLOCK, CHRISTOPH y
ARNTZ, CLAUDIA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

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

ES 2 668 963 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas fluorescentes

La invención se refiere a nanopartículas fluorescentes con una idoneidad especial como diagnóstico *in vivo*, en particular como agente de contraste para la discriminación de distintos tipos de tejido y reivindica la prioridad de la solicitud de patente alemana 10 2006 060 155.6, a la que se hace referencia en cuanto al contenido.

En el caso de múltiples enfermedades, un diagnóstico lo más temprano posible y significativo es de importancia decisiva para la elección, así como para la coordinación y ejecución de las medidas médicas necesarias. Esto se aplica sobre todo para múltiples tipos de tumor para cuya discriminación y terapia (incluyendo posibles secciones) es esencial la discriminación entre tejido sano y carcinógeno. Según esto, la recuperación o incluso la supervivencia de un paciente depende de manera decisiva de sí, y en qué calidad, el médico que trata y/u opera puede distinguir entre distintos tipos de tejido.

Para mejorar el diagnóstico y las medidas médicas ya se han desarrollado en el pasado agentes de contraste, con cuya ayuda pueden hacerse visibles funciones y estructuras en el cuerpo a través de modalidades de imagen. Estos procedimientos se usan, entre otros, para la detección dirigida de cambios celulares asociados con el cáncer.

Así, por ejemplo Hsu et al. (2004) ("A far-red fluorescent contrast agent to image epidermal growth factor receptor expression", *Photochemistry and Photobiology*, 79 (3): 272-279) han desarrollado un agente de contraste específico desde el punto de vista molecular basándose en un fluoróforo orgánico como marcador para la transformación carcinogénica temprana.

En ese documento se aprovecha la sobreexpresión asociada al tumor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) para identificar tejido alterado en la cavidad oral a través de un conjugado de anticuerpos anti-EGFR fluorescentes rojos (Alexa660).

En general, una desventaja de los fluoróforos orgánicos es su metabolización en el cuerpo, durante la cual el fluorocromo se descompone o desactiva. Con ello, la metabolización contrarresta la elevada intensidad de marcación necesaria para el diagnóstico. Con el aumento del tiempo de residencia del fluoróforo orgánico *in vivo*, este problema se agudiza y plantea una dificultad considerable, en particular durante la marcación de células en capas de tejido más profundas.

Además, los fluoróforos orgánicos emisores de ondas largas, en particular, tienen la desventaja de que su rendimiento cuántico se reduce por el procedimiento de conjugación química. Además, los fluoróforos orgánicos son muy susceptibles al fotoblanqueo ("*photo bleaching*"), lo que puede conducir a una pérdida de fluorescencia sustancial incluso después de una exposición corta. De este modo, un agente de contraste basado en estos fluoróforos presenta una intensidad de fluorescencia demasiado baja y estabilidad con una duración de excitación más larga para ser adecuado para la detección/marcación de células en capas de tejido más profundas ("imagenología de tejido profundo"). Por ejemplo, a partir del estudio de Hsu et al (2004) se desprende que los conjugados Alexa660 presentan una profundidad de penetración de como máximo 0,5 mm, de modo que una detección de la fluorescencia ya no es razonablemente posible.

Otra posibilidad conocida para la marcación de fluorescencia de cambios celulares consiste en el uso de los denominados puntos cuánticos (QD), que son grandes nanopartículas fluorescentes de unos pocos nanómetros cuyo núcleo se compone de materiales semiconductores tales como CdSe, CdTe, InP o similares.

En el pasado se propuso ya en varias ocasiones usar puntos cuánticos en el sentido de un "agente de imagenología" (es decir, por tanto un agente de contraste) también para una marcación *in vivo* en pacientes (por tanto, por ejemplo Larson DR, Zipfel WR, William RM, Brunchez MP, Wise FW et al. 2003, Water soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo. *Science* 300 (5624): 1434-1436). No obstante, hasta ahora aún no se han realizado estas propuestas. Por tanto, se conoce concretamente que las nanopartículas se acumulan en órganos del cuerpo, en particular en el hígado y el bazo y, por tanto, son detectables casi al 100 % en el cuerpo del paciente incluso después de muchas semanas. Esto se aplica incluso cuando la vida media de las nanopartículas en la sangre asciende solo a unas horas después de la aplicación intravenosa. No obstante, debido a la toxicología a largo plazo, por el momento aún sin aclarar, de las nanopartículas de semiconductores fluorescentes en condiciones fisiológicas, se excluye en los humanos un uso de nanopartículas de este tipo acumuladas en el cuerpo. Por tanto, en principio, el uso de materiales persistentes a largo plazo como agentes de contraste *in vivo* puede considerarse problemático. Por consiguiente, hasta la fecha no se ha establecido ningún agente de contraste basado en nanopartículas de semiconductores fluorescentes que sea adecuado para la aplicación en seres humanos.

El documento US 2005/112376 A1 se refiere a nanocristales fluorescentes funcionalizados, previendo la funcionalidad un revestimiento que comprende un compuesto de imidazol. El documento US'376 enseña el uso de estos nanocristales para aplicaciones *in vitro* tales como el inmunoensayo y ELISA o para aplicaciones técnicas como matrices, microchips, biosensores o laboratorio en un chip (*lab-on-a-chip*).

El documento WO 2006/0337732 A1 se refiere a la síntesis de partículas de partículas coloidales luminiscentes y

desvela en este caso nanopartículas con un revestimiento por un componente de imidazol (párrafo [0028]). El documento WO'732 enseña el uso para distintos fines diagnósticos o análisis de micromatrices mediante la unión a soportes sólidos tales como matrices.

5 Por tanto, la presente invención tiene por objetivo proporcionar nanopartículas fluorescentes que presentan una idoneidad especial para el uso como diagnóstico, en particular como agente de contraste *in vivo*.

Este objetivo se soluciona de acuerdo con la reivindicación principal. Las formas de realización ventajosas son objetivo de las reivindicaciones dependientes o reivindicaciones independientes separadas. Las nanopartículas de acuerdo con la invención pueden usarse *in vivo* para la marcación específica de estructuras o funciones biológicas seleccionadas. En particular, las nanopartículas seleccionadas en este caso pueden servir como agentes de contraste *in vivo* para apoyar intervenciones médicas, especialmente intervenciones quirúrgicas.

Las nanopartículas de acuerdo con la invención comprenden al menos tres estructuras, concretamente un núcleo inorgánico, que se recubre con una capa de pasivación que porta entonces, por su parte, ligandos específicos, pudiendo ser los ligandos específicos también parte de la capa de pasivación. Estos conducen a una unión específica de la nanopartícula a la molécula diana ("*target*") del sistema biológico.

15 De acuerdo con la invención, el núcleo inorgánico de las nanopartículas con la capa de pasivación que lo rodea presenta un diámetro hidrodinámico de no más de 15, preferentemente no más de 10 nm. De manera especialmente preferente, los diámetros termodinámicos son de más de 8 nm o no más de 5 nm. Las nanopartículas de este tamaño pueden ser excretadas a través del riñón y, por tanto, no se acumulan en el cuerpo o a lo sumo en cantidades razonables. Con ello se posibilita la aplicación *in vivo*. Esto se aplica en particular a las nanopartículas con un diámetro hidrodinámico de no más de 5 nm.

En esta forma de realización, las nanopartículas emiten preferentemente una longitud de onda con un máximo de emisión entre 600 y 700 nm, por ejemplo entre 620 y 660, de manera especialmente preferente de aproximadamente 625 nm o 655 nm. Esta emisión es claramente visible para el ojo humano, y dichas nanopartículas pueden servir, por tanto, en el caso de intervenciones médicas directamente como agentes de contraste. Por tanto, en determinadas circunstancias es posible prescindir de instrumentos ópticos de soporte.

Como se ha puesto ahora de manifiesto, las nanopartículas inorgánicas con una capa de pasivación que contiene un componente de imidazol *in vivo* son en realidad no inertes, pero se degradan en estas condiciones. Por tanto, estas nanopartículas cumplen el criterio de degradabilidad biológica y de la permeabilidad renal de los productos de degradación, que es especialmente pertinente para la aplicación *in vivo*. Esta observación fue sorprendente, porque la capa de pasivación sirve sobre todo también para el aumento de la estabilidad química y/o física de las nanopartículas (véanse también las realizaciones adicionales). Así, en esta forma de realización de la invención, la estabilidad de las nanopartículas, por un lado, que se requiere para un buen diagnóstico, y la biodegradabilidad, por otro lado, que se requiere para la movilidad renal de las partículas "grandes", se encuentran en una proporción adecuada entre sí para el uso como agentes de contraste *in vivo*.

35 La capa de pasivación tiene sobre todo por objetivo aumentar la intensidad de fluorescencia así como la estabilidad química y física del núcleo inorgánico. Los núcleos inorgánicos recubiertos con la capa de pasivación están caracterizados por un rendimiento cuántico de al menos el 10 %, de manera ventajosa de al menos el 30, 50 o incluso el 70 %. Como rendimiento cuántico se entiende, a este respecto, la relación de la cantidad de la luz emitida por una muestra y la cantidad de la luz absorbida por la muestra. La capa de pasivación presenta de manera ventajosa un espesor de no más de 1 nm. El diámetro del núcleo pasivado se aumenta en este caso en no más de 2 nm.

De manera ventajosa, las nanopartículas se dotan respectivamente aún de modificadores, en particular para mejorar la compatibilidad con el entorno biológico. El aumento del radio hidrodinámico mediante el uso de modificadores no excede preferentemente 2 nm. El espesor de la capa de pasivación y de los modificadores depende en casos individuales también de las relaciones entre ambas estructuras y en relación con el núcleo inorgánico.

En el caso de la limitación de tamaño mencionada anteriormente de las nanopartículas de acuerdo con la invención, estas presentan una idoneidad especial para el uso como diagnóstico en el paciente vivo. Por tanto, mediante la reducción de tamaño se consigue un aumento de la velocidad de difusión y la profundidad de penetración en el tejido. Esto permite una extensión uniforme y rápida de las nanopartículas en el entorno biológico así como una penetración lo más amplia posible de un tejido (por ejemplo, un tumor) tras una aplicación local. Asimismo, las nanopartículas de acuerdo con la invención permiten una aplicación sistémica, que también puede efectuarse a través de una inyección. La aplicación local, por ejemplo una aplicación tópica o una aplicación intra- o peritumoral durante el tratamiento de tumores, no obstante, se prefiere.

Las formas de realización especialmente ventajosas de las nanopartículas de acuerdo con la invención presentan un diámetro hidrodinámico de no más de 8, de manera especialmente preferente de no más de 4 nm. Las nanopartículas de este orden de magnitud pueden ser excretadas a través de riñón, de modo que no se acumulan, o se acumulan claramente menos, en el cuerpo. Así, las nanopartículas de acuerdo con la invención reducen significativamente el problema de toxicidad a largo plazo asociado previsiblemente a los puntos cuánticos conocidos.

En otra forma de realización ventajosa, las nanopartículas de acuerdo con la invención emiten un espectro de fluorescencia entre 600 y 700 nm, de manera especialmente preferente con un máximo de emisión entre 600 y 660 nm, de manera en particular preferente entre 620 y 660 nm. Este espectro de emisión tiene la ventaja de una transmisión tisular lo más alta posible debido a una baja absorción por parte de la hemoglobina y otras sustancias que absorben la luz en el sistema vivo (incluida agua). La luz de estas longitudes de onda todavía es perceptible para el ojo humano, de modo que la identificación del tejido marcado por el médico tratante es posible sin más ayudas técnicas complejas para la detección (por ejemplo, cámaras CCD). Esto es en particular ventajoso en el caso del uso de las nanopartículas de acuerdo con la invención como agentes de contraste durante una intervención quirúrgica para la discriminación (por ejemplo) del tejido carcinogénico y sano.

En una forma de realización, en el caso de las nanopartículas que pueden usarse de acuerdo con la invención se trata de nanopartículas conocidas con un núcleo, por ejemplo, de CdSe, CdS o CdTe, como se describen, por ejemplo, en el documento US 2004/0247861 con referencia a publicaciones científicas (véase el párrafo [0006]). En este documento se remite también a documentos para la fabricación de los materiales de núcleo (véase [0007]), por tanto, por ejemplo, al documento US 6.179.912. A estos documentos se hace referencia para la divulgación de las propiedades de estas nanopartículas conocidas, así como a su producción plenamente.

Es especialmente ventajoso que el núcleo inorgánico de las nanopartículas de acuerdo con la invención se componga esencialmente de semiconductores. Estos núcleos emiten, en función de su tamaño individual y/o composición, luz en distintos colores, aunque absorben toda banda ancha en el mismo intervalo del espectro de luz (intervalo UV a VIS). Los espectros de excitación y emisión se sitúan debido al alto "desplazamiento de Stokes" muy separados entre sí, lo que posibilita una excitación simple y simultánea de distintos puntos cuánticos. Presentan espectros de emisión estrechos y simétricos que no se solapan, o se solapan solo ligeramente. Otras propiedades positivas, que tienen una gran importancia en particular para la profundidad de penetración mejorada y la marcación *in vivo*, representan el elevado rendimiento cuántico de hasta el 80 % y la elevada fotoestabilidad.

Los puntos cuánticos, que pueden representar el núcleo inorgánico de las nanopartículas de acuerdo con la invención, se conocen por el documento WO2005/001889. Según ello, se trata de un núcleo inorgánico a partir de una aleación de al menos dos semiconductores, los cuales están o bien distribuidos homogéneamente o bien para cada uno de los cuales está presente un gradiente de concentración dentro de la aleación. En lo que respecta a la divulgación de la naturaleza y producción de estos puntos cuánticos, se hace referencia al documento WO2005/001889 antes citado. Los núcleos pueden diferir en su tamaño respectivamente en el 5 %.

Por tanto, el núcleo inorgánico de las nanopartículas de acuerdo con la invención puede comprender una aleación a partir de al menos dos semiconductores, presentando el núcleo una composición homogénea y estando caracterizado por una "energía de brecha de bandas", que no es lineal con respecto a la relación molar de los dos semiconductores.

Como alternativa, el núcleo puede estar creado de manera no homogénea, aumentando gradualmente la concentración del primer semiconductor partiendo del centro del núcleo hasta su superficie y disminuyendo gradualmente la concentración del segundo semiconductor desde el centro del núcleo hasta su superficie.

Se aplica igualmente a ambos núcleos que al menos uno de los semiconductores sea un semiconductor de grupo II-grupo VI o un semiconductor de grupo III-grupo V (la definición de grupo se corresponde con los grupos del sistema periódico de los elementos). La aleación puede estar seleccionada, por ejemplo, del grupo de las siguientes aleaciones: CdSeTe, CdSSe, CdSTe, ZnSeTe, ZnCdTe, CdHgS, CdHgTe, InGaAs, InGaP, GaAlAs, InGaN. Estos núcleos pueden portar, además, un revestimiento a partir de material inorgánico, tal como por ejemplo semiconductores (por ejemplo, ZnS). Esta capa adicional la conoce el experto en la materia como "tapa" o "caparazón".

El semiconductor de grupo II-grupo VI y el semiconductor de grupo III-grupo V son conocidos en general y contienen, por ejemplo CdS_{1-x}Se_x, CdS_{1-x}Te_x, CdSe_{1-x}Te_x, ZnSe_{1-x}Te_x, Zn_{1-x}Cd_xTe, Cd_{1-x}Hg_xS, Cd_{1-x}Hg_xTe, In_{1-x}Ga_xAs, Ga_{1-x}Al_xAs y In_{1-x}Ga_xP. Preferentemente se usan los semiconductores CdS_{1-x}Te_x, CdS_{1-x}Te_x, ZnSe_{1-x}Te_x, Zn_{1-x}Cd_xTe, Cd_{1-x}Hg_xS, Cd_{1-x}Hg_xTe, In_{1-x}Ga_xAs, In_{1-x}Ga_xP, siendo x una fracción de 0 a 1.

La relación molar de los semiconductores puede asumir cualquier relación molar. No obstante, en el caso de que la aleación comprenda CdSSe, se prefiere una aleación con la formulación molecular CdS_{1-x}Se_x. En el caso de que la aleación comprenda CdSTe, se prefiere una aleación con la formulación molecular CdS_{1-x}Te_x. En el caso de que la aleación comprenda ZnSeTe, se prefiere una aleación con la formulación molecular ZnSe_{1-x}Te_x. En el caso de que la aleación comprenda ZnCdTe, se prefiere una aleación con la formulación molecular solo de CdTe. En estas especificaciones, x es en cada caso una fracción entre 0 y 1.

Estos núcleos inorgánicos preferentes de las nanopartículas de acuerdo con la invención pueden producirse con las siguientes etapas: (i) la preparación de una primera solución en condiciones que posibilitan la formación de nanocristales, (ii) producción de una segunda solución, que comprende un prepaño de los semiconductores con una relación molar en una condición que no posibilita una formación de nanocristales, (iii) adición de la segunda solución para la primera solución, que posibilita una formación de nanopartículas, y (iv) cambio de las condiciones, que

detienen/paran el crecimiento de los nanocristales y su formación. El procedimiento para la producción de los núcleos se representa en el documento WO 2005/001889, al que se hace referencia en cuando a la divulgación de la producción de esta forma de realización preferente del núcleo inorgánico de las nanopartículas de acuerdo con la invención.

5 En una forma de realización alternativa, el núcleo inorgánico puede componerse esencialmente de una agrupación de metales nobles, que comprende preferentemente de 2 a 27 átomos de metales nobles. En una forma de realización preferente se seleccionó el metal noble de un grupo compuesto por oro, plata, cobre, platino, paladio, osmio, iridio, rutenio y rodio. La agrupación puede presentar cargas variables.

10 Estos núcleos tienen la ventaja de que, debido a su fuerte absorción y emisión, son fácilmente detectables como los denominados "nanopuntos" individuales con una débil excitación de lámpara de mercurio. Las nanopartículas de acuerdo con la invención con estos núcleos deben usarse de manera ventajosa como etiquetas fluorescentes de una molécula y de masa.

15 En el sentido de la presente invención, el término "metal noble" se refiere a un grupo de elementos seleccionado de un grupo compuesto por oro, plata y cobre y el grupo de los metales de platino (PGM) platino, paladio, osmio, iridio, rutenio y rodio. En formas de realización preferentes de la presente invención, los metales nobles se seleccionan del grupo compuesto por oro, plata y cobre. En una forma de realización especialmente preferente, el metal noble es plata u oro.

20 El término "agrupación" se refiere a un compuesto de 2-27 átomos de un metal. Las agrupaciones se conocen, entre otros, de los sectores de las catálisis químicas, de la cerámica, de la tecnología de semiconductores y ciencias de materiales. Su producción resulta familiar para el experto en la materia. El documento WO2004/003558 describe, entre otros, la producción de agrupaciones de metales nobles y contiene, además, extensas referencias bibliográficas adicionales. En particular se desvela la producción de nanoagrupaciones de metales nobles, que están asociadas a moléculas orgánicas. El término asociación debe entenderse, a este respecto, como cada forma del enlace independientemente de la naturaleza química o física del enlace (así, por ejemplo, enlace covalente, no
25 covalente, electrostático o de van der Waals). En cuanto a la producción de las nanoagrupaciones como núcleo de las nanopartículas de acuerdo con la invención se hace referencia al documento WO2004/003558.

Las nanopartículas de acuerdo con la invención presentan una capa de pasivación que aumenta la intensidad de fluorescencia así como la estabilidad química y física del núcleo inorgánico. Con ello, las nanopartículas emiten luz preferentemente con un rendimiento cuántico de más del 10 %, preferentemente de más del 50 %.

30 Las nanopartículas de acuerdo con la invención presentan en el entorno acuoso a 4 °C preferentemente una estabilidad de almacenamiento de al menos 12 meses y son preferentemente estables por encima de un intervalo de pH de pH 5 a pH 10, es decir, muestran desviaciones de menos del 50 % en referencia a sus características espectrales específicas como el rendimiento cuántico, posición del máximo de emisión, anchura media del espectro de emisión. Las partículas preferentes muestran desviaciones de menos del 10 % en referencia a estas
35 características espectrales específicas.

Las nanopartículas que pueden usarse de acuerdo con la segunda forma de realización de la invención muestran también en condiciones biológicas (es decir, fisiológicas) o *in vivo* para un periodo de al menos tres días esencialmente una constancia/estabilidad de las propiedades del núcleo (incluida la capa de pasivación que lo rodea). Las partículas preferentes muestran una constancia/estabilidad de este tipo para un periodo de 7 a 14 días, considerándose como estabilidad la conservación de al menos el 50 % de la constancia de las propiedades.
40

Aunque las nanopartículas en el sentido anterior son estables, no obstante, son degradables *in vivo* y, por tanto, no son inertes. En el sentido de la invención, "no inerte" significa que las nanopartículas tras un periodo de 12 semanas o más después de la administración ya están degradadas en al menos el 50 %. Preferentemente, al menos una degradación al 50 % es detectable después de 8, 6 o 4 semanas. La detección de las partículas que permanecen en el cuerpo incluye la detección en órganos del cuerpo así como en plasma. "Inerte" significa que después de un período de 4 semanas tras la administración aún más del 50 %, incluso hasta casi el 100 % de las partículas en el cuerpo del paciente puede ser detectado.
45

La degradabilidad de las nanopartículas puede detectarse a través de ensayos que son conocidos para el experto en la materia, concretamente por ejemplo mediante la espectroscopía de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), que también puede complementarse con mediciones espectroscópicas de fluorescencia cuando la muestra es de calidad adecuada.
50

La capa de pasivación contiene al menos un compuesto, que es capaz de coordinar átomos metálicos o iones metálicos, por ejemplo iones de cinc, mercurio o cadmio. Este compuesto puede ser una base de Lewis o un compuesto cíclica o linealmente insaturado con electrones resonantes. Como compuesto cíclicamente insaturado puede ser también un heterociclo o un hereoaromato. El grupo insaturado o conjugado se encuentra en una forma de realización preferente en una posición terminal con respecto a la estructura de la molécula. Además, la capa de pasivación puede presentar un reticulante transversal o el compuesto cíclica o linealmente insaturado puede funcionar también como reticulante transversal. El reticulante transversal puede ser básico.
55

Los átomos metálicos o compuestos que coordinan iones metálicos pueden unirse funcionalmente por quelación, coordinación o propiedades de donantes de electrones de bases de Lewis a núcleos inorgánicos fluorescentes y presentar, de manera correspondiente, partes/grupos conjugados. Estas moléculas pueden contener, además, partes que confieren solubilidad o humectabilidad a los núcleos recubiertos que están revestidos con ellas en soluciones acuosas.

Estas moléculas o compuestos pueden contener un sistema de anillo homogéneo o heterogéneo (heterocíclico) con uno, dos o más anillos unidos (o también condensados). Son sistemas hereoaromáticos preferentes, por ejemplo, tiazoles, derivados de tiazol, oxazoles, derivados de oxazol, pirroles, derivados de pirrol incluidos oligómeros de polipirrol dopados o no dopados, tiofenos, derivados de tiofeno incluidos politiofenos dopados o no dopados, furanos, derivados de furano, piridina y derivados de piridina, pirimidina y sus derivados, piracinas, derivados de piracina, triacina y derivados de triacina, triazoles, derivados de triazol, ftalocianinas y derivados de ftalocianina, porfirina y derivados de porfirina. Estos compuestos pueden contener hidrocarburos insaturados (olefínicos) o sus aminas, derivados de fósforo u oxígeno, que pueden incluir acetileno, propina y aleno, pero no están limitados a estos. Se prefiere que la molécula presente una suficiente densidad de electrones p o pi para participar en la formación de aductos o la resonancia en la superficie del núcleo del semiconductor.

El compuesto heteroaromático es de acuerdo con la invención un componente de imidazol. Preferentemente se añade, además, como reticulante transversal un compuesto de fosfina, preferentemente un compuesto de alquifosfina.

Con la expresión "componente de imidazol" se entiende en el sentido de esta descripción una molécula heterocíclica o heteroaromática, que contiene al menos un grupo de imidazol (incluidos derivados de imidazol), y que está disponible para el enlace del núcleo inorgánico o la capa de pasivación con un metal tal como cadmio, cinc, galio o un catión metálico o un sustrato, que contiene un catión de este tipo. En este contexto, preferentemente al menos un grupo de imidazol puede estar en una posición terminal con respecto a la estructura de la molécula. El componente de imidazol se une en su forma funcional al nanocrystal fluorescente a través del anillo que contiene orbitales moleculares deslocalizados. Por lo general, los nitrógenos del anillo de imidazol sirven como un ligando de coordinación para unir de manera funcional un ion de metal como el cadmio o el cinc.

En una forma de realización, el componente de imidazol comprende grupos funcionales reactivos como uno o dos aminoácidos, por ejemplo histidina, carnosina, anserina, baleína, homocarnosina, histidilfenilalanina, ciclo-histidilfenilalanina, 5-amino-4-imidazol-carboxamida, histidilleucina, 2-mercaptoimidazol, boc-histidina, hidrazida, histinol, 1-metilhistidina, 3-metilhistidina, imidazolisina, ornitina que contiene imidazol (por ejemplo, 5-metilimidazol), alanina que contiene imidazol (por ejemplo (beta)-(2-imidazolil)-L(alfa) alanina), carcinina, histamina. Estas moléculas a base de histidina o aminoácidos que contienen imidazol pueden sintetizarse según métodos generalmente conocidos.

Por el término "fosfina" se entiende en el sentido de la invención una molécula que presenta al menos un grupo de fosfina (incluidos sus derivados) para el enlace o la quelación de un no metal como Se, S u otros no metales o de sustratos que contienen dichos átomos y que proporciona al menos un grupo funcional (por ejemplo, hidroxil-, amino-, tiol-, carboxil-, carboxamida-, etc.) para la reacción con moléculas adyacentes.

Preferentemente, debería estar localizada una agrupación de fosfina en una posición terminal con respecto a la estructura de la molécula. Las partes de fosfina sirven como ligandos de coordinación para unir un no metal o ion como Se o S en forma funcional con un núcleo fluorescente o un compuesto de la capa de apantallamiento.

En una forma de realización preferente, el compuesto que contiene fosfina contiene uno, dos o varios grupos de fosfina acoplados entre sí (por ejemplo en forma polimérica), que pueden incluir compuestos de hidroximetilfosfina o similar, pero no están limitados a estos. Los compuestos que contienen fosfina pueden sintetizarse según métodos generalmente conocidos. Como se conoce adicionalmente, los compuestos que contienen alquifosfina pueden presentar, además, uno o varios grupos funcionales adicionales (por ejemplo, hidroxil-, amino-, tiol-, carboxil-, carboxamida-, etc.). Son ejemplos de derivados los derivados de hidroximetilfosfina, amidas o ésteres, siempre y cuando la derivatización sea compatible con las funciones de la fosfina como recubrimiento descritas en este caso.

Son especialmente preferentes ácido tris-(hidroximetil)-fosfina y β -[tris-(hidroximetil)fosfino]-propanoico, para revestir los núcleos inorgánicos de las nanopartículas de acuerdo con la invención. En general se conoce que los compuestos reticulados transversalmente que contienen fosfina también tienen la posibilidad de unirse funcionalmente a átomo y/o iones metálicos como Zn o Cd. En este sentido, los isocianatos funcionalizados o los cianoacrilatos de alquilo pueden ser útiles además como reticulantes transversales para la formación de ligandos y aductos con núcleos fluorescentes. Los reticulantes transversales pueden también ser básicos.

El efecto de pasivación de la capa de pasivación presente de acuerdo con la invención se basa en el apantallamiento de átomos superficiales de cadmio o cinc o similares mediante la complejación con el componente de imidazol y el apantallamiento de los átomos opuestos (Se o S o similar) a través de la complejación con los compuestos que contienen fosfina.

La capa de pasivación de las nanopartículas de acuerdo con la invención se conoce por el documento US

2004/0247861 A1. En este documento de divulgación se describe la producción de núcleos inorgánicos que recubren con la capa de pasivación, por ejemplo de puntos cuánticos. Con fines de la divulgación de la producción de la capa de pasivación usada de acuerdo con la invención y los núcleos inorgánicos revestidos con ella se hace referencia, por tanto, al documento US 2004/0247861.

5 Las moléculas de la capa de pasivación pueden presentar o portar, además, grupos químicos para unir moléculas diana y células y reticular transversalmente (ligandos específicos). En la presencia de reactivos correspondientemente adecuados como $ZnSO_4$ y Na_2S , estas moléculas o compuestos pueden formar una capa de pasivación con las moléculas sobre el núcleo fluorescente ("tapa" o "caparazón"). Estos reactivos pueden unirse funcionalmente también a átomos o iones en la superficie del nanocrystal fluorescente, de modo que esta capa de pasivación adicional también puede estar configurada inmediatamente en la superficie del núcleo.

10 Las nanopartículas de acuerdo con la invención pueden presentar en una forma de realización ventajosa adicionalmente modificadores, que pueden componerse de partes orgánicas e/o inorgánicas. Sirven para mejorar la compatibilidad, efectividad y/o solubilidad de las nanopartículas en un líquido o un agente de suspensión en particular en el entorno fisiológico. Esta modificación de superficie es sobre todo ventajosa para conseguir menor absorción inespecífica posible y una mayor compatibilidad en los sistemas biológicos, en particular en el cuerpo humano.

15 Una posibilidad es la modificación de la superficie con el polietilenglicol (PEG) ya admisible para determinadas aplicaciones médicas, en particular en formas de bajo peso molecular, para conservar un pequeño tamaño total de la nanopartícula. Esto puede aumentar tanto la biocompatibilidad de las nanopartículas así como su tiempo de circulación sanguínea y también la eficiencia de absorción en células. Mediante la combinación de una capa de PEG de bajo peso molecular con otras sustancias como vitaminas tales como, por ejemplo, ácido fólico, puede lograrse una menor absorción de nanopartículas en los macrófagos, dado que debido a la absorción de proteínas reducida con ello en las nanopartículas se dificulta un reconocimiento de las nanopartículas por el sistema inmunológico. El revestimiento con monosacáridos, di- o trisacáridos hasta polisacáridos de bajo peso molecular a partir de uno o distintos monosacáridos representa una posibilidad adicional de la modificación de superficie ventajosa mediante el uso de modificadores. Como un tipo de realización es posible una modificación con, por ejemplo, poliglucosa, en la que puede usarse dextrano, que es admisible desde el punto de vista médico como sustituto de la sangre. Muestra una buena biocompatibilidad/tolerancia. Una forma de realización adicional es el uso de formas estereoisoméricas (D-/L-) de los sacáridos para contrarrestar una posible degradación.

20 25 Una forma de realización adicional es el uso de vitaminas hidrófilas biológicamente compatibles como modificadores, tales como por ejemplo tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina, cobalamina, ácido pantoténico, ácido ascórbico y ácido fólico. Así, por ejemplo el ácido fólico puede conducir a una unión preferente de nanopartículas a células cancerosas. Esta vitamina muestra solo una inmunogenicidad baja y, por tanto, una alta biocompatibilidad. Mediante la unión al receptor de ácido fólico unido a membrana se facilita una internalización de las nanopartículas.

30 35 La modificación de superficie con vitaminas lipofílicas como retinol, colecalciferol, tocoferol y filoquinona también es posible. Así puede conducir por ejemplo la vitamina E a una mayor absorción celular de nanopartículas.

40 Los ácidos grasos, tales como por ejemplo 1-octadecenos o ácido 18-metileicosanoico y sus derivados, pueden aumentar la solubilidad y estabilidad de los coloides y disponen de un grupo carboxilo terminal funcional que puede usarse para la unión posterior de ligandos específicos. Por tanto, es razonable absorber ácidos grasos como modificadores.

45 Una forma de realización adicional de la modificación de superficie es un revestimiento con polialcoholes, tal como por ejemplo dietilenglicol (DEG), que pueden reducir de manera especialmente buena la absorción de proteínas inespecífica. Lo mismo se aplica para politetrafluoroetileno (PTFE, teflón), en particular en sus formas de bajo peso molecular, debido a las que puede conseguirse una absorción de proteínas reducida. El politetrafluoroetileno se usa con frecuencia en aplicaciones cardioquirúrgicas.

50 Una modificación de superficie puede realizarse, asimismo, con uno o varios aminoácidos de origen natural, a los que pertenecen tanto los aminoácidos proteinogénicos como no proteinogénicos, así como aminoácidos sintéticos. A este respecto pueden usarse ambos estereoisómeros (formas D y L). Di-, tri-, tetra- hasta pequeños polipéptidos de los aminoácidos mencionados anteriormente difícilmente estimulan el sistema inmunológico y, por tanto, también son adecuados para una capa de compatibilidad fina. A este respecto, puede tratarse de secuencias de aminoácidos artificiales así como de secuencias de proteínas biológicas. Los derivados peptídicos de proteínas naturales como por ejemplo de la fitoquelatina pueden usarse, asimismo, para la modificación de superficie. Una modificación de superficie con péptido tat y péptidos que contienen péptido tat es otra posibilidad de hacer que las nanopartículas estén disponibles para el uso en aplicaciones biomédicas. El péptido tat es una molécula efectiva para llevar, por ejemplo, nanopartículas de oro a través de la membrana celular hacia el núcleo.

55 Una forma de realización adicional de los modificadores posibles es la configuración de un revestimiento de fosforilcolina. La fosforilcolina reduce una posible absorción de proteínas inespecífica, como por ejemplo en lentes de contacto. Una modificación de la fornicolina puede usarse fácilmente en sistemas biológicos debido a sus

propiedades no trombogénicas y se caracteriza por una alta estabilidad a largo plazo.

Dado que el polilactato es biocompatible, esta sustancia se usa en múltiples aplicaciones médicas. En particular las formas de bajo peso molecular del polilactato son otra posibilidad de la modificación de superficie de las nanopartículas de acuerdo con la invención. A este respecto, pueden usarse ambos estereoisómeros (formas D y L) para reducir una posible biodegradación.

Además de las modificaciones de superficie mencionadas, es posible una unión proteolíticamente divisible de proteínas inespecíficas a las nanopartículas. Esto puede causar un aumento de la biocompatibilidad/tolerancia. En el sitio objetivo puede efectuarse una separación de la proteína grande liberando las pequeñas nanopartículas en el tejido. Asimismo, puede efectuarse una separación tras el correspondiente tiempo de retención. Para ello sirven preferentemente proteínas ampliamente distribuidas, tal como por ejemplo la transferrina, lactoferrina, ceruloplasmina, elastina y albumina además de otras proteínas, que reducen una absorción inespecífica. Así, por ejemplo un revestimiento de superficie a partir de combinaciones de polipéptidos con elastina puede prevenir la formación indeseada de trombo y, por tanto, aumentar la biocompatibilidad de las nanopartículas.

La proteína sérica principal, la albúmina, puede reducir las interacciones inespecíficas con membranas plasmáticas. Además, la nanopartícula correspondientemente modificada contiene la capacidad de configurar interacciones específicas con células diana mediante la unión simultánea de un ligando específico a la superficie de la partícula. Un revestimiento con albúmina sérica puede conducir a un tiempo de circulación sanguínea considerablemente más largo al impedir la rápida absorción por los macrófagos después de la dosis intravenosa que en el caso de las nanopartículas no revestidas.

Además de los revestimientos inespecíficos descritos anteriormente, las nanopartículas de acuerdo con la invención portan una marcación selectiva con ligandos específicos de células diana, por ejemplo están conjugados con proteínas, anticuerpos, péptidos o, de manera especialmente preferente, con pequeños dominios proteicos de alta afinidad, fragmentos de anticuerpos u otras moléculas orgánicas, que se unen, por ejemplo, a estructuras específicas de células tumorales u otros objetivos. Un ligando preferente es la adhesina (véase el ejemplo de realización 4). "Específico" significa en este contexto que el ligando está expresado o bien exclusivamente o si no en mayor medida sobre la diana.

La combinación del diámetro hidrodinámico reducido, lo que conduce a la mayor velocidad de difusión y perfusión mencionada, junto con las propiedades y mejoras ya descritas y la alta intensidad de fluorescencia sobre todo en la zona roja visible de la luz hace que las nanopartículas de acuerdo con la invención sean un diagnóstico sencillo, que puede usarse de múltiples maneras, para una discriminación selectiva y exacta de formas de tejido *in vivo*. Estas posibilidades en combinación con biomarcadores específicos de tejido sirven sobre todo para diferenciar entre tejido anormal, (pre)cancerígeno y normal, lo que favorece una evaluación visual para una resección tumoral más precisa durante una intervención operativa. Las nanopartículas de acuerdo con la invención que pueden usarse en este caso sirven, por tanto, como agentes de contraste.

De acuerdo con la presente invención, las nanopartículas pueden usarse o bien como diagnóstico *in vivo* o terapéutico. Pueden administrarse localmente (por ejemplo, intratumoralmente, intramuscularmente o en tejidos/órganos accesibles operativamente) o, si no, también sistémicamente (por ejemplo, de manera intravenosa). La administración local/tópica puede estar prevista como líquido, solución de dispersión, gel, espuma, crema, parche activo. Esto puede ser preferente en particular en el caso del tratamiento/diagnóstico de órganos huecos. La administración oral también es posible, por ejemplo, como jarabe o en forma de comprimidos o cápsulas. De igual manera es posible una inhalación (por ejemplo, dispersión). Una aplicación anal está prevista a través de supositorios. En una variante pueden implantarse las nanopartículas en forma de depósito. El término "diagnóstico" se usa en el contexto de la presente invención como sinónimo de "agente de contraste", es decir, sirve para la representación discriminativa de estructuras morfológicas o funcionales en sistemas biológicos, en particular en seres humanos vivos, para favorecer una intervención médica.

Las nanopartículas pueden usarse como diagnóstico sobre todo en intervenciones quirúrgicas. Asimismo, pueden usarse en procedimientos mínimamente invasivos (por ejemplo, endoscopia, laparoscopia). Es razonable una combinación con procedimientos generadores de imagen tales como PET, MRT, CT, etc.

Como ya se explicó antes, el uso de acuerdo con la invención en la forma de la aplicación local es especialmente ventajoso. La cantidad de Cd usada durante la aplicación local no excede a este respecto de manera ventajosa una décima parte de la carga total, que en el transcurso de la vida habitualmente se acumula fácilmente en el hígado y el riñón de una persona en edad avanzada y estilo de vida habitual. La carga total de estos órganos se sitúa en aproximadamente 18 mg (Saturag et al 2000; "British Journal of Nutrition"; 2000, (84), 791-802). De manera ventajosa se limita, por tanto, durante la aplicación local la cantidad de nanopartículas de tal modo que la cantidad de Cd suministrada no excede al menos esencialmente el valor de 2 mg. En una forma de realización especialmente preferente se hace posible la visualización del tumor ya con una cantidad de agente de contraste que no excede una cantidad total de 0,6 mg, de manera especialmente preferente 0,2 mg de cadmio.

Por "aplicación local" se entiende en el sentido de la invención cada aplicación en la que ya según la manera de

aplicación se espera una cantidad o dosis elevada del agente de contraste en distintas zonas del cuerpo. Por tanto, también una administración vascular del agente de contraste es una administración local cuando mediante las medidas de acompañamiento adoptadas por el personal encargado de la administración, tal como por ejemplo la unión de vasos sanguíneos entrantes o salientes, se impide que el agente de contraste se extienda esencialmente sin impedimentos a través del sistema vascular en el cuerpo.

La ventaja especial de esta forma de realización consiste en que con ello se hace posible el uso de las nanopartículas en la aplicación médica en seres humanos vivos en primer lugar, dado que de otro modo, es decir, como dosis sistémica - esto queda excluido debido a la toxicidad asociada a ello. La aplicación local reduce concretamente la dosis de las nanopartículas que se requiere para la representación suficiente.

Se ha demostrado que el agente de contraste que contiene Cd se usa de acuerdo con la invención para la visualización de un tumor *in vivo* de manera ventajosa en una dosis, que se corresponde con una cantidad de 0,002 a 0,02 mg de Cd por cm³ de tejido tumoral. Son especialmente ventajosas dosificaciones del agente de contraste de 0,002 a 0,015 mg de Cd/por cm³ de tejido tumoral, en particular entre 0,002 y 0,010 mg de Cd/por cm³. Con esta dosificación ventajosa pueden visualizarse tumores con un volumen de hasta aproximadamente 150 cm³ *in vivo*, sin exceder con ello el límite superior de carga habitualmente aceptable para los seres humanos.

Pueden ser objeto de las investigaciones todos los tejidos/órganos accesibles del paciente, sobre todo la piel, órganos huecos (por ejemplo en el tracto gastrointestinal, urogenital, respiratorio) o zonas exteriormente accesibles de los órganos sensoriales y también el sistema cardiovascular.

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

Siempre y cuando las nanopartículas se usen de acuerdo con la invención para fines terapéuticos, al menos algunos de los ligandos de la nanopartícula pueden portar moléculas efectoras o principios activos, es decir, pueden representar efectores. A este respecto, un efector es un ligando con una función seleccionada. De manera ventajosa, la nanopartícula porta tanto ligandos específicos para la localización dirigida de la nanopartícula en el cuerpo o en el tejido como un ligando con molécula efectora.

El efector puede permanecer unido o ser divisible o separable o liberable. El efector puede ejercer, por ejemplo, su función a través de una activación/inactivación de un receptor, un enmascaramiento de estructuras (de superficie), la activación del sistema inmunológico ("cebado"), la modulación de vías de señalización, la activación o desactivación de una enzima, terapia génica (por ejemplo, mediante el suministro selectivo de plásmidos o siRNA), el suministro selectivo de toxinas/quimioterapéuticos/citostáticos o el efecto estimulante, por ejemplo, en el metabolismo, formación de hormonas, etc. La protección de células, por ejemplo las células B productoras de insulina, también es posible.

1. Métodos

a) Producción de un conjugado de BP619-neutravidina con anticuerpo monoclonal biotinilado unido

Productos químicos y materiales

Nanopartículas

BP619 200 µg/ml

En el caso de las nanopartículas BP619 o BP 617 se trata de una nanopartícula de acuerdo con la invención, es decir, presenta un núcleo de CdS_xS_e ("núcleo de aleación") y una capa de pasivación de acuerdo con el documento US 2004/0247861 A1.

Proteína

La proteína purificada está presente en tampón de fosfato-NaCl (almacenamiento a -80 °C)

Sustancia tampón MES (sigma), NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, EDC (1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida hidrocloreuro), S-NHS (N-hidroxisulfosuccinimida), cámaras de diálisis (Slide-A-Lyzer), Vivaspin (MWCO 50 kDa, VivaScience)

Tampones

D-PBS (10x)

NaCl 1370 mM (80 g/l)

KCl 27 mM (2 g/l)

Na₂HPO₄*12H₂O 42 mM (15,4 g/l) / Na₂HPO₄*2H₂O 7,652 g/l.

KH₂PO₄ 14 mM (2 g/l)

llenar hasta 1000 ml, el pH debería situarse a aproximadamente 7,5,

autoclavar, almacenamiento a RT.

Para una solución de PBS 1x diluir los 100 ml de tampón 10x con ddH₂O y ajustar el valor de pH deseado (pH 7,4 (AK) u 8,0 (QD)) con unas gotas de NaOH 2 M antes de llenarlo completamente hasta 1 l.

- 5 Tampón de MES = tampón de activación
colocar nuevamente (el tampón orgánico no puede autoclavarse)
Receta para 0,8 l (0,1 M MES, NaCl 0,25 M, pH 6.0):

15,616 g de MES
11,688 g de NaCl

- 10 hasta 800 ml de ddH₂O, ajustar pH 6,0
Llenar hasta como máximo 0,7 l con ddH₂O, después ajustar con NaOH 2M o 5 M el valor de pH. A continuación llenar hasta 800 ml con ddH₂O.
Solución de glicina de 1 M (puede conservarse durante más tiempo filtrada de manera estéril a 4 °C), congelar alícuotas

Ejecución

- 15 En primer lugar, el tampón MES (tampón de activación) se produce en un cilindro de medición de vidrio. La cámara de diálisis se riega antes del uso de 1 a 2 minutos en tampón MES. Llenar 100 µl de BP619 (20 µg) con tampón MES hasta 400 µl de volumen final en un recipiente estéril de Eppendorf y mezclar bien con la pipeta. Los BP619 se transfieren a la cámara de diálisis (3,5 kDa). Durante la primera diálisis, los BP619 se dializan protegidos de la luz durante una hora a temperatura ambiente y con mezcla continua contra 800 ml de tampón de activación MES. Tras la primera diálisis, los BP619 se extraen de la cámara de diálisis y se transfieren a un recipiente de Eppendorf. Para la mezcla de EDC y S-NHS con los BP619, se preparan soluciones madre respectivamente de EDC 100 mM y S-NHS 100 mM directamente antes del uso. Después de la primera diálisis se pipetea 33 µl de S-NHS 100 mM y 13 µl de EDC 100 mM a los BP619 y se agitan durante 15 minutos protegidos de la luz a temperatura ambiente y 350 rpm. Tras la incubación se dializan los BP619 contra PBS. Para ello, los BP619 se transfieren a la cámara de diálisis (MWCO 3,5 kDa) y se dializan durante una hora protegidos de la luz contra PBS con pH 8,0. Tras la segunda diálisis, los BP619 se extraen de la cámara de diálisis y se transfieren a un recipiente de Eppendorf. Los BP619 activados se mezclan con 80 µg de neutravidina (8 µl a 10 mg/ml, 20 µl de volumen final con D-PBS). A continuación se agita esta preparación de reacción durante 2 horas a temperatura ambiente y protegida de la luz con 350 rpm. Tras la conjugación se almacena la preparación de conjugación protegida de la luz a 4 °C. Al día siguiente, para saturar cualquier grupo reactivo, se pipetea 1 M de glicina hasta una concentración final de glicina de 10 mM.
- 20
- 25
- 30

Los conjugados BP619 se concentran con tubitos de centrifugación Vivaspin. Los conjugados se centrifugan en un intervalo de tiempo hasta que se consigue la concentración deseada. Después se efectúa la adición estequiométrica del anticuerpo monoclonal biotinilado, que está dirigido contra el antígeno de membrana asociado a tumores transportador de glucosa 1 (GLUT1).

35 **b) Conjugación de BP619 con EGF-His**

Productos químicos y materiales

Nanopartículas

BP619 200 µg/ml

Proteína

- 40 La proteína purificada está presente en tampón de fosfato-NaCl (almacenamiento a -80 °C)
Sustancia tampón MES (sigma), NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, EDC (1-etil-3-[3-di-metiaminopropil]carbodiimida hidrocloreuro), S-NHS (N-hidroxisulfosuccinimida), cámaras de diálisis (Slide-A-Lyzer), Vivaspin (MWCO 50 kDa, VivaScience)

Tampones

- 45 D-PBS (10x)
NaCl 1370 mM (80 g/l)
KCl 27 mM (2 g/l)
Na₂HPO₄*12H₂O 42 mM (15,4 g/l) / Na₂HPO₄*2H₂O 7,652 g/l.
KH₂PO₄ 14 mM (2 g/l)
- 50 llenar hasta 1000 ml, el pH debería situarse a aproximadamente 7,5,
autoclavar, almacenamiento a RT.

Para una solución de PBS 1 x diluir los 100 ml de tampón 10x con ddH₂O y ajustar el valor de pH deseado (pH 7,4 (AK) u 8,0 (QD)) con unas gotas de NaOH 2 M antes de llenarlo completamente hasta 1 l.

Tampón de MES = tampón de activación
colocar nuevamente (el tampón orgánico no puede autoclavarse)

5 Receta para 0,8 l (0,1 M MES, NaCl 0,25 M, pH 6.0):

15,616 g de MES
11,688 g de NaCl

hasta 800 ml de ddH₂O, ajustar pH 6,0

10 Llenar hasta como máximo 0,7 l con ddH₂O, después ajustar con NaOH 2M o 5 M el valor de pH. A continuación llenar hasta 800 ml con ddH₂O.

Solución de glicina de 1 M (puede conservarse durante más tiempo filtrada de manera estéril a 4 °C), congelar alicuotas

Ejecución

15 En primer lugar, el tampón MES (tampón de activación) se produce en un cilindro de medición de vidrio. La cámara de diálisis (3,5 kDa) se riega antes del uso de 1 a 2 minutos en tampón MES. Llenar 100 µl de BP619 (20 µg) con tampón MES hasta 400 µl de volumen final en un Eppi estéril y mezclar bien con la pipeta. Los BP619 se transfieren a la cámara de diálisis (3,5 kDa). Durante la primera diálisis, los BP619 se dializan protegidos de la luz durante una hora a temperatura ambiente y con mezcla continua contra 800 ml de tampón de activación MES. Tras la primera diálisis, los BP619 se extraen de la cámara de diálisis y se transfieren a un recipiente de Eppendorf. Para la mezcla de EDC y S-NHS con los BP619, se preparan soluciones madre respectivamente de EDC 100 mM y S-NHS 100 mM directamente antes del uso. Después de la primera diálisis se pipetea 33 µl de S-NHS 100 mM y 13 µl de EDC 100 mM a los BP619 y se agitan durante 15 minutos protegidos de la luz a temperatura ambiente y 350 rpm. Tras la incubación se dializan los BP619 contra PBS. Para ello, los BP619 se transfieren a la cámara de diálisis (3,5 kDa) y se dializan durante una hora protegidos de la luz contra PBS con pH 8,0. Tras la segunda diálisis, los BP619 se extraen de la cámara de diálisis y se transfieren a un recipiente de Eppendorf. Los BP619 activados se conjugan con 4,92 µg de EGF-His (diluidos con PBS hasta un volumen final de 20 µl). Para ello, los BP619 activados se pipetea a EGF-His y se mezclan bien con la pipeta. A continuación se agita esta preparación de reacción durante 2 horas a temperatura ambiente y protegida de la luz con 350 rpm. Tras la conjugación se almacena la preparación de conjugación protegida de la luz a 4 °C. Al día siguiente, para saturar cualquier grupo reactivo, se pipetea 1 M de glicina hasta una concentración final de glicina de 10 mM.

35 Los conjugados BP619-EGF-His se concentran con tubitos de centrifugación Vivaspin (50 kDa MWCO). En este caso se lava previamente la membrana una vez con 4 ml de ddH₂O, a continuación se lava posteriormente con 4 ml de PBS. Los conjugados BP619-EGF-His se diluyen en 2 ml de PBS y se aplican sobre la membrana. A continuación se lavan los conjugados BP619-EGF-His de nuevo con 2 ml de PBS. Los conjugados se centrifugan en un intervalo de tiempo hasta que se consiga la concentración deseada.

c) Experimento con animales

i) Ejecución

40 Para ello se inyectaron subcutáneamente ratones desnudos (sin timo y, por tanto, inmunosuprimidos) con células de carcinoma de colon humanas de la línea celular HT29, que formaron tumores sólidos después de un tiempo de crecimiento de aproximadamente 2 a 3 semanas.

Cada ratón se anestesia con hipnomidato para realizar la inyección y se inyecta intratumoralmente con 25 µl de una solución de nanopartícula; a este respecto, la inyección se efectúa de forma centralizada en un punto del tumor.

Se registra una cinética de la fluorescencia del material en el tumor desde el momento 0 a 5 o 60 min.

45 Después de la muerte, el tumor se extrae en primer lugar con epidermis y a continuación se extraen los órganos bazo, hígado y riñones.

El tumor se extrae con dermis epidérmica, se congela con una gota de OCT sobre papel de aluminio (lado exterior orientado hacia arriba), se envuelve en papel de aluminio y se congela instantáneamente en N₂. A continuación, almacenar a -80 °C hasta el transporte de retorno a hielo seco, seguir almacenando a -80 °C.

50 Los órganos bazo, hígado, riñones se extraen de todos los ratones, se congelan instantáneamente en N₂ y se almacenan a -80 °C, a -80 °C hasta el transporte de retorno.

ii) Documentación fotográfica

Materiales/aparatos usados

Cámara Nikon Coolpix P2
Fuente de luz fría 24W (Eitrotec LB24)
Filtros ópticos:

- 5
- Filtro paso corto 50 % de longitud de onda de corte 550 nm (Melles Geriot 03SWP408 o 03SWP608)
 - Filtro de color "verde" 550 nm (Melles Geriot 03FCG087 / OG550)
 - Filtro de color "naranja" 570 nm (Melles Geriot 03FCG089 / OG570)
 - Filtro de color "rojo" 590 nm (Melles Geriot 03FCG098 / OG590)

cartón de arcilla negro como base

Ajustes de cámara

- 10 Las tomas para la documentación de la fluorescencia se llevan a cabo con una cámara digital compacta habitual en el mercado (Nikon Coolpix P2). A continuación se encuentra una visión general sobre los ajustes realizados en la cámara.

Ajuste	Valor
Balance de blancos (WB)	"Luz solar directa" (fija)
Medición de exposición	"Medición puntual"
Toma en serie	"Instantánea"
Selector de mejor toma	"Off"
Horquillado de exposición	"Horquillado de exposición"
Corrección de flash	"0"
Adaptación de imagen	"Normal"
Señal de nitidez	"Off"
Saturación de color	"+/-0"
Sensibilidad ISO	64
Calidad de imagen	"buena"
Tamaño de imagen	"2592x1944"
Preselección del campo de medición	"Medio"
Enfoque automático	"Enfoque automático individual"
Apertura constante	"On"
Eliminación de ruido	"Off"
Corrección de exposición	variable (estándar -2)

Las divisiones de imagen respectivas pueden desprenderse de la información EXIF del archivo de imagen (por ejemplo, con Photoshop o PixVue).

15 Ejecución

La cámara se monta con el soporte del filtro en un trípode fotográfico y se ajusta con la ayuda del cabezal 3D de tal modo que la distancia entre la lente y el ratón/la superficie es de aproximadamente 15-20 cm. El ángulo debería ser lo más pronunciado posible desde arriba en la medida en que la posición del trípode lo permita. El filtro de toma se monta de tal manera que la distancia con respecto a la lente es lo más pequeña posible.

- 20 La iluminación y excitación de la sustancia se efectúa mediante una fuente de luz fría, cuyo espectro se regula mediante un filtro paso corto (véase arriba). Debido al calor residual que se origina en la fuente de luz y a la mejor manejabilidad, un conductor de luz flexible con una lente se usa para enfocar el cono de luz. Sobre este conductor de luz se monta el soporte de filtro con el filtro paso corto. El conductor de luz se fija entonces en un trípode de laboratorio de tal modo que la distancia con respecto a la superficie asciende a aproximadamente 15 cm. A este respecto, el cono de luz debería estar ajustado de tal modo que mide aproximadamente 8 cm. También la iluminación debería efectuarse, a este respecto, para la disminución de sombras, de la manera más pronunciada posible desde arriba.

- 30 El ratón y el trípode de laboratorio para la iluminación se sitúan para mejorar el contraste sobre cartón de arcilla negro. El ratón se sitúa entonces en el medio en el cono de luz. A este respecto debe observarse que el tumor proyecta la menor sombra posible y está bien iluminado.

Durante la toma debe observarse el indicador de enfoque automático.

En un caso normal, las tomas deberían hacerse con un ángulo ancho máximo. Con un zoom más grande, es posible que la cámara ya no enfoque y que además cambie el ajuste de apertura.

Si entre las tomas se cambia el filtro de toma, no deberá modificarse en la medida de lo posible la otra configuración de ensayo para garantizar la comparabilidad y facilitar el tratamiento posterior.

5 **d) Ensayo de unión de células**

Materiales y equipamiento

Microscopio de fluorescencia: Leica DMIL, Zeiss LSM510META
Potenciador de señal, reactivo antidecoloración ProLong Gold

Tampones

10 D-PBS (pH 7,4) (10x)

NaCl 1370 mM (80 g/l)
KCl 27 mM (2 g/l)
Na₂HPO₄*12H₂O 42 mM (15,4 g/l) / Na₂HPO₄*2H₂O 7,652 g/l.
14 mM de KH₂PO₄(2 g/l)

15 ajustar pH 7,4 y llenar hasta 1000 ml
autoclavar, almacenamiento a RT.

Solución Triton X-100
0,1 % (v/v) en D-PBS
almacenamiento a 4 °C

20 Solución de BSA
3 % (p/v) en D-PBS
preparar nuevamente o a partir de una solución madre de -20 °C

4 % de solución PFA

25 5,71 ml de formaldehído (35 %)
5 ml 10 x D-PBS
ajustar/controlar pH 7,4

hasta 50 ml con ddH₂O, almacenamiento a 4 °C

solución de glicina 0,1 M

0,375 g de glicina

30 hasta 50 mL de D-PBS, ajustar/controlar pH 7,4, filtrar de manera estéril, almacenamiento a 4 °C de Mowiol/DABCO

Después de mezclar 2,4 g de Mowiol en 6 g de glicerina (la más pura) se añaden 6 ml de ddH₂O y a continuación se agita durante varias horas a RT. A ello se proporcionan 12 ml de Tris 0,2 M (pH 8,5) y agitando se calientan hasta 50 °C durante 10 min. Después de que el Mowiol se disuelva (¡tarda más de 10 min!) se centrifuga durante 15 minutos a 5000 x g y finalmente se añaden 20 mg/ml de DABCO.

35 Almacenamiento: en alícuotas a -20 °C, solo puede usarse durante algunas semanas a 4 °C, cura lentamente

Anticuerpos

Primer anticuerpo: Ac-5 1:100, un Acm anti-EGFR (ratón) de Dianova
Segundo anticuerpo: cabra anti-ratón con Alexa488

40 Ejecución

Con 2 días de antelación, las células HT29 se siembran en cubreobjetos redondos. Para la siembra se convierten 5 x 10⁴ células, para que después de 48 horas de crecimiento a 37 °C esté presente una monocapa confluyente al 50-70 % al principio de la tinción inmune.

45 Los conjugados BP619-EGF-His se preincuban durante 30 minutos a temperatura ambiente en un medio Mc-Coy de 50 µl, que contiene un 3 % de BSA.

Cuando se alcanza la confluencia de las células HT29, el medio se aspira y las células se lavan al menos una vez con D-PBS.

Se pipetea de 30 a 50 µl de los conjugados BP619-EGF-His preincubados en las células lavadas y a continuación se incuban durante una hora a 37 °C/7,5 % de CO₂ en la incubadora.

5 Después de la tinción de las células con los conjugados BP619-EGF-His, las células se lavan una vez con PBS y luego se fijan con 300 µl de solución de PFA al 4 %, de 15 a 20 minutos a temperatura ambiente. Después de la fijación, las células se lavan una vez con D-PBS y se apagan con glicina 0,1 M, durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después del apagado, las células se lavan una vez con D-PBS y a continuación se permeabilizan con Triton X-100-PBS al 0,1 %, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para bloquear las células se incuban las células a continuación con un 3 % de BSA, durante 30 minutos a temperatura ambiente.

10 Después del bloqueo de las células teñidas, las células pueden teñirse en contraste o directamente la tinción del conjugado BP619-EGF-His puede analizarse en el microscopio. Para el análisis de la colocalización tiene que hacerse una tinción de contraste.

15 La tinción de contraste se realiza con el primer anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo monoclonal de Dianova. El anticuerpo anti-EGFR se diluye de 1 a 100 en 30 µl del 1 % de BSA-PBS y a continuación se pipetea en las células. El anti-EGFR se incuba durante 60 minutos a temperatura ambiente en las células. Después de la incubación se lavan las células 3 veces durante 5 minutos con D-PBS. Como segundo anticuerpo con fluorocromo para contrarrestar la tinción se toma cabra-anti-ratón con Alexa488. Para ello, el segundo anticuerpo se diluye de 1 a 200 en 30 µl del 1 % de BSA y a continuación se pipetea en las células. El segundo anticuerpo cabra-anti-ratón Alexa 488 se incuba durante 60 minutos a temperatura ambiente en las células. Después de la incubación se lavan las células 3 veces durante 5 minutos con D-PBS. Las células se incrustan en Mowiol/DABCO y se analizan con el microscopio.

20 e) Preparación y tinción de criosecciones

Los tumores se almacenan a -80 °C y se transportan en una caja de poliestireno con unidades de enfriamiento (enfriadas hasta -80 °C) para su corte. El corte se efectúa con un criomicrotomo. Los cortes que se originan tienen un espesor de 10 µm.

Materiales y equipamiento

25 Microscopio de fluorescencia: Leica DMIL, Zeiss LSM510META, cubas para lavar, cámaras húmedas, lápiz de engrase para marcar la zona del tejido, solución de paraformaldehído al 4 % (véase el ensayo de unión de células), PBS (véase el ensayo de unión de células), solución de BSA al 3 % (véase el ensayo de unión de células), solución Triton X-100 (véase el ensayo de unión de células), solución de glicina 0,1 M (véase el ensayo de unión de células), anticuerpos primarios y secundarios correspondientes, dado el caso otros reactivos para tinciones de contraste.

30 Ejecución

Las criosecciones se descongelan y secan a RT (aproximadamente durante 10-20 min). Después de la marcación de la zona del tejido con un lápiz graso, se efectúa la fijación del tejido con solución de paraformaldehído al 4 % durante 20 min en una cámara húmeda. Tras el lavado con D-PBS a continuación se apaga durante 5 min con solución de glicina 0,1 M.

35 Después del lavado en PBS y de la permeabilización con 0,1 % de Triton-X-100, se efectúa el bloqueo durante 1 h a RT con solución de BSA al 3 %.

Para probar el EGFR en la membrana plasmática se usa un conjugado directo anti-EGFR-A488. Este se diluye 1:100 en 1 % de BSA/PBS y los cortes se incuban en una cámara húmeda durante 1 h a RT. El lavado con D-PBS se efectúa en una cuba durante al menos 15 min y al menos un cambio de tampón.

40 Para la incrustación se usa Mowiol/DABCO y las secciones (sin teñir y teñidas) se analizan en el microscopio.

f) Análisis microscópico

El análisis microscópico de los preparados se efectúa con el LSM510 de Zeiss. A este respecto, se usan los siguientes filtros:

45 Para el análisis de la fluorescencia de NP:
FSet 15= FilterSet 15 488015-0000
Excitación: BP546
Divisor de haz: FT580
Emisión: LP 590

50 Para el análisis de la fluorescencia de Alexa488:
FSet 46= FilterSet 46 1196-681
Excitación: BP500/20
Divisor de haz: FT515
Emisión: BP535/30

También se ejecutó un análisis láser confocal en una parte de los preparados (véanse instrucciones de uso del microscopio).

2. Ejemplos de realización

Ejemplo de realización 1:

5 Experimento *in vivo*: Experimento con animales con tumores xenoinjertos HT29 en ratones desnudos con inyección intratumoral de complejos de anticuerpos de neutravidina de acuerdo con la invención

10 En un experimento *in vivo* en ratones con tumores de xenoinjerto se mostró un “enfoque tumoral” específico de conjugados de anticuerpo de acuerdo con la invención. Para ello se inyectaron subcutáneamente ratones desnudos (sin timo y, por tanto, inmunosuprimidos) con células de carcinoma de colon humanas de la línea celular HT29, que formaron tumores sólidos después de un tiempo de crecimiento de 3 semanas.

Para una marcación de tumor selectiva se produjo un complejo de anticuerpos de acuerdo con la invención, o un conjugado de neutravidina de acuerdo con la invención con un anticuerpo monoclonal biotinilado unido al mismo. Este anticuerpo monoclonal está dirigido contra el antígeno de membrana asociado a tumores transportador de glucosa 1 (GLUT1), que está expresado en muchas formas de carcinoma colorrectales humanas.

15 Después de la inyección intratumoral de los complejos, los tumores ya podían reconocerse visualmente en fluorescencia roja bajo excitación UV. Después de hasta 48 h después de la inyección, los complejos de acuerdo con la invención podrían ser detectados en criosecciones preparadas de los tumores.

20 Figura 1: Señal roja (conjugado de neutravidina y anticuerpo biotinilado contra la proteína de membrana GLUT1). Puede reconocerse una unión específica a células HT-29 pero no a células murinas (todavía no se logra una marcación homogénea de todo el tumor).

Figura 2: Señal roja (conjugado de neutravidina y anticuerpo biotinilado contra la proteína de membrana GLUT1). Puede reconocerse una unión específica a células HT-29 en el entorno inmediato de ductos intratumorales, pero no a las células murinas. (Todavía no se logra una marcación homogénea de todo el tumor).

Ejemplo de realización 2:

25 i) Comparación de la intensidad de Biopixels 618 (material de acuerdo con la invención) con las nanopartículas de aleación de Crystalplex 630 (NC 630) mediante análisis espectral. En el caso de las nanopartículas NC630 se trata de nanopartículas que tienen un núcleo Cd_xSe_{1-x}/Zn_5 y están funcionalizadas con grupos COOH.

Se desprenden los siguientes valores de la Figura 3:

Concentración de BP618	1,67 µg/ml
Concentración de NC630	6,70 µg/ml
Excitación a 360 nm de BP618	55000 cps
Excitación a 360 nm de NC630	22000 cps
Excitación a 488 nm de BP618	25000 cps
Excitación a 488 nm de NC630	10000 cps

30 Teniendo en cuenta la mayor concentración de nanopartículas NC630 en un factor 4, se desprende una mayor intensidad de emisión del material BP618 de acuerdo con la invención en un factor 10.

35 Esta diferencia de intensidad es muy significativa para el uso de acuerdo con la invención del medio de contraste para la visualización directa, por ejemplo en la aplicación médica en la cirugía. Mientras que en el caso del material de acuerdo con la invención puede observarse la fluorescencia por el médico tratante directa y únicamente con ayuda de filtros de fluorescencia, las nanopartículas NC630 tienen que hacerse visibles con amplificación electrónica adicional.

ii) Caracterización de BioPixels 619 mediante filtración en gel

A partir de la Figura 4 puede reconocerse que el volumen de elución asciende a 16,2 ml. Este valor se correlaciona con un diámetro de solución madre de 10,8 nm.

40 iii) Comparación de tumor de ratón después de la inyección de BioPixels 619 acoplado a EGF y nanopartículas NC630

Después del procedimiento descrito en 1b) se llevó a cabo la conjugación de BP619 con EGF-His. A este respecto se usaron 1,4 µM de proteína y se conjugaron 40 µg de nanopartículas (= preparación doble). Después de la purificación/concentración con unidades de centrifugado de vivaspina se inyectaron en total

aproximadamente 14,3 µg de nanopartículas en el tumor.

La documentación fotográfica se efectuó como se describe en 1c). Los tumores en los que se inyectó material NC630 no muestran fluorescencia (Figura 5a, véase marcación), mientras que en el caso del uso de BioPixels 619 de acuerdo con la invención acoplados a EGF puede reconocerse claramente una fluorescencia (Figura 5b, véase marcación).

iv) Microscopía de la marcación tisular en el tumor con BioPixels 619 de acuerdo con la invención acoplados a EGF

Los tumores extraídos se cortaron por medio de un criotoma (espesor de corte 10 µm) y se trataron para el análisis microscópico como se describió anteriormente (1e). El análisis se efectuó con un microscopio de Zeiss (LSM510) usando el FSet15 para detectar la fluorescencia de BioPixel (véase 1f). La marcación del tumor (véase la Figura 6; zonas blancas sobre un fondo negro) no es homogénea; algunas zonas están marcadas más débilmente (véase la Figura 6 a), mientras que otras permiten reconocer una marcación más fuerte (véase la Figura 6 b).

Ejemplo de realización 3

Marcación de células tumorales con BioPixels 619 de acuerdo con la invención acoplados a EGF con captación intracelular de los biopixels.

En este caso se llevó a cabo con células tumorales HT29 según el procedimiento descrito (1d) un ensayo de unión de células. En la Figura 7 a se representa la fluorescencia de BP619. En este caso se marcaron mediante círculos algunas de las señales cuya fluorescencia se causa exclusivamente mediante BP619. En la Figura 7b se detectó la fluorescencia del anticuerpo A488. En este caso se usó como primer anticuerpo un anticuerpo de EGFR y como segundo anticuerpo cabra-anti-ratón A488 (véase 1d). También en este caso se han rodeado algunas de las señales cuya fluorescencia es exclusivamente atribuible al A488. En la Figura 7c finalmente puede verse la imagen copiada de 7 a y 7 b. Muchas de las señales permiten reconocer una colocalización, es decir, se encuentran tanto en la Figura 7 a como en la Figura 7b.

Ejemplo de realización 4

Adhesinas como ligandos para la imagenología molecular de las células cancerosas colorrectales

La invención se refiere a la detección de células CRC (células cancerosas colorrectales) mediante el uso de un conjugado fluorescente. Este consiste en un ligando que se une a una molécula típica de las células CRC y un nanocrystal semiconductor fluorescente, que hace visible la posición de este conjugado y, con ello, la célula CRC.

Con ello es posible una discriminación *in vivo* precisa, sencilla y económica del tejido (pre)cancerígeno y normal. Este favorece durante una intervención operativa mediante evaluación visual una resección tumoral más precisa.

Para este fin, los conjugados usados tienen que ser lo más pequeños posible para garantizar una buena distribución en el tejido/tumor. Los ligandos usados hasta ahora para dichos conjugados como anticuerpos o fragmentos de Fab son demasiado grandes como para cumplir este requisito. Por tanto, el objetivo de la invención es proporcionar un medio adecuado para la visualización del tejido tumoral.

El objetivo de la invención se soluciona mediante la conjugación de un ligando específico a nanopartículas fluorescentes para la detección de células CRC. A este respecto, el ligando debe mediar en la unión de este conjugado a una diana, preferentemente CEACAM, que están sobreexpresados en células CRC, y así hacer que el tumor sea detectable mediante fluorescencia.

En una forma de realización preferente, en el caso del ligando se trata de un miembro de la familia de las adhesinas, en formas de realización especialmente preferentes de DraE, AvaE-V o AfaE-III.

Las adhesinas son con 17 kDa de manera ventajosa tan pequeñas que también es posible una buena difusión en el tejido también en combinación con la nanopartícula fluorescente.

También es posible de manera sencilla, rápida y económica la expresión de adhesinas mediante la presencia de sistemas de expresión tales como células bacterianas.

Para la detección de células CRC es necesaria una diana, que es específica para estas células y se sobreexpresa en el tumor. La familia CEACAM (molécula de adhesión celular relacionada con CEA); CEA = antígeno carcinoembrionario) es un miembro de la superfamilia Ig. Cada miembro de la familia está altamente glicosilado y se compone de un dominio de tipo variable de Ig N-terminal, que se conectan a los hasta 6 dominios de IgC2. CEACAM1, CEACAM3 y CEACAM4 están insertados en la membrana celular a través de un dominio de transmembrana carboxiterminal y dominio citoplasmático, mientras que CEA (CEACAM5), CEACAM6 (NCA), CEACAM7 y CEACAM8 están anclados a la membrana a través de glucosilfosfatidilinositol (GPI). El dominio N-terminal presenta más del 90 % de similitud en el nivel de aminoácidos dentro de este grupo.

CEA y NCA están presentes en el tejido colónico en el epitelio cilíndrico y en las células caliciformes. Se localizan en

la superficie apical de enterocitos maduros y concretamente en la región de Glycocalyx/Microvillus. Las CEACAM actúan como moléculas de adhesión intercelulares. Esta estricta localización apical de CEACAM en las células epiteliales normales del colon puede estar invertida en células del adenocarcinoma; las proteínas se expresan en toda la superficie celular. En las células CRC, la organización celular y la polaridad de las células están invertidas. La CEA está distribuida por toda la superficie celular y, por tanto, entra en la sangre, puede detectarse ahí y usarse como marcador tumoral sérico.

5 Algunos miembros de esta familia, para la que está descrito que su expresión está altamente regulada en células CRC, son especialmente adecuados como diana para la detección de células CRC. A ellas pertenecen CEA (CEACAM5) y NCA (CEACAM6).

10 Como ligandos para estos receptores están descritas, entre otros, adhesinas de la familia Dr de *E. coli* (adhesinas Afa/Dr, subfamilia DrCEA). A este respecto, estas adhesinas están localizadas sobre la superficie bacteriana, parcialmente organizadas en las fimbrias, por cepas de *E. coli* (DAEC) difusamente adheridas y median en su adhesión a células epiteliales. Son miembros de esta familia, por ejemplo, AfaE-I, AfaE-III, AfaE-V, DraE y DaaE.

15 Los genes de ensamblaje estructurales ("*structural assembly genes*"), que codifican para adhesinas Afa/Dr, tienen una organización similar. Se componen de operones, que contienen al menos 5 genes (A a E). A este respecto, los genes A a D codifican genes accesorios, codificando el gen D una invasina. El gen E codifica la propia adhesina.

Las agrupaciones de genes tienen regiones altamente conservadas, por ejemplo los genes afaA, afaB, afaC, afaD y afaF, que tienen, por ejemplo, función reguladora o acompañante. El gen estructural que codifica AfaE es muy heterogéneo, lo que conduce a la producción de adhesinas antigénicamente diferentes.

20 Miembros de la familia Afa/Dr de las adhesinas

Las *E. coli*, que expresan estos miembros de la familia Afa/Dr de las adhesinas, se adhieren a células CHO, que expresan CEA (Berger et al., Molecular Microbiology, (2004) 52(4), pp. 963-983, "Differential recognition of members of the carcinoembryonic antigen family by Afa/Dr adhesins of diffusely adhering Escherichia coli (Afa/Dr DAEC)").

25 Las adhesinas también están descritas en Alain L. Servin (2005, volumen 18, n.º 2, pp. 264-292, "Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely Adhering Escherichia coli"). Otros datos sobre los sistemas de CEA/adhesinas se encuentran en las Figuras 8-13.

Esta generación y selección de ligandos de adhesinas adecuados se efectúa preferentemente mediante procedimientos de n-híbridos, como se describe en el documento EP 05 009 771.6.

Ejemplo de realización 4a

30 Para la formación de las adhesinas es suficiente el dominio N-terminal de CEACAM de (Korotkova et al., (2006a), THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, volumen 281, n.º 39, pp. 29120-29139, "A Subfamily of Dr Adhesins of Escherichia coli Bind Independently to Decay-accelerating Factor and the N-domain of Carcinoembryonic Antigen").

35 Los autores del estudio han usado fimbrias purificadas, en las que está presente también la respectiva adhesina, para estudios de unión mediante Biacore y han demostrado con ello indirectamente una interacción.

El uso del codón del dominio N-terminal de NCA (CEACAM6) como diana y la proteína madura de DraE como ligando (adhesina) se optimizó para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae* y los genes se sintetizaron como encargo.

40 Una clonación de los genes se efectuó en los vectores del sistema híbrido doble Matchmaker 3 de Clontech. A este respecto, el gen para el dominio N-terminal de NCA se encuentra ahora en el vector pGBKT7, que contiene el gen para el dominio de unión del factor de transcripción. DraE se sitúa en el vector pGADT7 detrás del gen para el dominio de activación de este factor de transcripción. Los vectores se introdujeron mediante transformación en la cepa de levadura Y190 y las levaduras se sembraron en un medio con 3-AT 10 mM. Para que el gen reportador β -galactosidasa sea leído, las dos proteínas tienen que interactuar.

45 La detección de la β -galactosidasa por medio de la conversión del sustrato FDG mediante la enzima en un producto fluorescente muestra claramente una interacción de los dos socios (serie temporal, véase la Figura 14). Si ambos genes están presentes en la levadura, la lectura de fluorescencia es muchas veces el valor de los controles, en los que en cada caso solo uno de los genes se transformó en levadura con el vector vacío correspondiente o solo ambos vectores vacíos. La prueba mediante ensayo de filtro y conversión de X-Gal a un colorante azul también confirma este resultado.

50 Así pudo demostrarse una interacción directa de las dos proteínas. Con ello, la adhesina es adecuada como ligando para conjugados con nanopartículas fluorescentes para la detección de células CRC mediante CEA como diana (como se muestra en NCA). Además, puede detectarse, por tanto, el efecto de la mutagénesis directamente durante una mutagénesis para alterar estos ligandos.

Ejemplo de realización 4b

Distintas adhesinas (DraE, AfaE-V, quizá AfaE-III) se expresan en bacterias y se purifican. Las proteínas purificadas se usan para estudios de unión (Biacore) y se conjugan en nanopartículas fluorescentes. A este respecto, son concebibles distintas formas de realización.

- 5
 - Unión de una de las proteínas inalteradas a las nanopartículas fluorescentes
 - Unión de una adhesina, mejorada mediante mutagénesis (tamaño, afinidad de unión, efecto sobre la diana), a las nanopartículas fluorescentes
 - Unión de una mezcla de distintas adhesinas a las nanopartículas
- 10
 - 1) Diversidad de las adhesinas, dado que se trata de diferentes miembros de las adhesinas Dr/Afa
 - 2) Diversidad de las adhesinas, dado que se trata de variantes modificadas en sus propiedades de una proteína
 - 3) Mezcla de las dos variantes 1) y 2)
 - Uso de nanopartículas con diferentes propiedades
 - Combinación de las distintas posibilidades

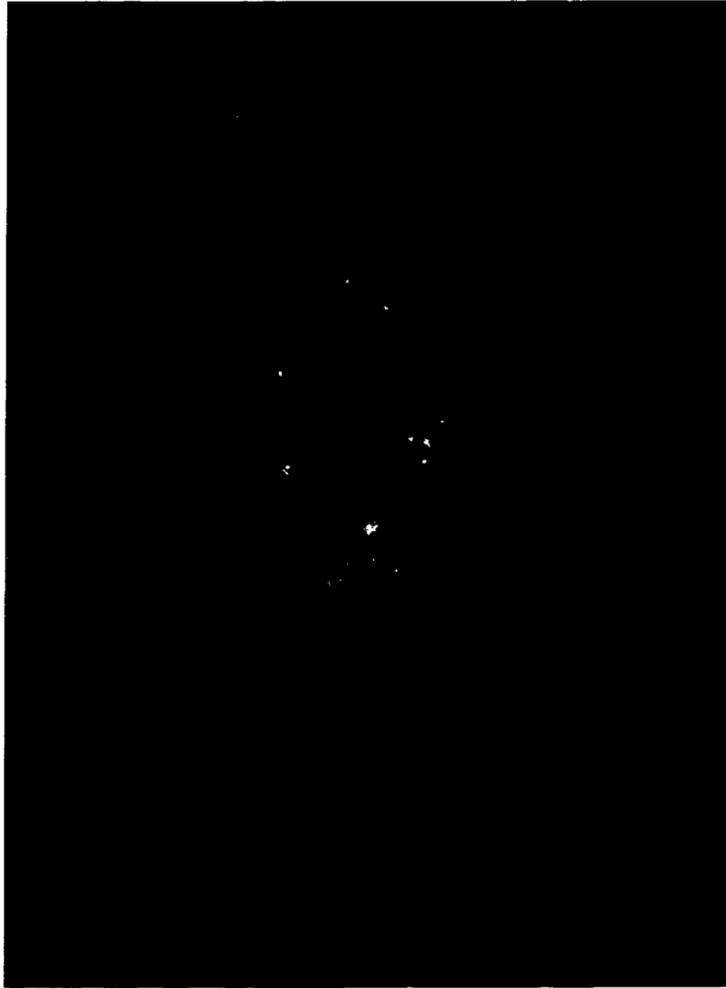
REIVINDICACIONES

1. Uso de nanopartículas fluorescentes que contienen un núcleo inorgánico, una capa de pasivación que contiene un componente de imidazol y ligandos específicos que comprenden al menos una adhesina para la preparación de un agente de contraste para la marcación tisular en intervenciones quirúrgicas, endoscópicas o mínimamente invasivas, para la aplicación local en seres humanos, **caracterizado porque** las nanopartículas presentan un diámetro hidrodinámico del núcleo inorgánico con la capa de pasivación de no más de 15 nm, preferentemente de no más de 10 nm, de manera especialmente preferente de no más de 5 nm, y una emisión de menos de 700 nm, aplicándose o inyectándose las nanopartículas local o tópicamente.
2. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el componente de imidazol comprende uno o varios compuestos seleccionados del siguiente grupo: histidina, carnosina, anserina, baleína, homocarnosina, histidilfenilalanina, ciclo-histidilfenilalanina, 5-amino-4-imidazolcarboxamida, histidilleucina, 2-mercaptoimidazol, boc-histidina, hidrazida, histinol, 1-metilhistidina, 3-metilhistidina, imidazolisina, ornitina que contiene imidazol (por ejemplo, 5-metilimidazol), alanina que contiene imidazol (por ejemplo (beta)-(2-imidazolil)-L(alfa) alanina), carcinina, histamina, que por su parte pueden estar sustituidos con grupos reactivos (por ejemplo amino, tiol, carboxilo o carboxamida).
3. Uso según una de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado porque** la capa de pasivación comprende un reticulante transversal para la reticulación transversal del componente de imidazol.
4. Uso según la reivindicación 3, **caracterizado porque** el componente de reticulación transversal comprende una alquilfosfina y/o un derivado de alquilfosfina.
5. Nanopartículas que contienen un núcleo inorgánico, una capa de pasivación y ligandos específicos que comprenden al menos una adhesina con un diámetro hidrodinámico del núcleo inorgánico con la capa de pasivación de no más de 15 nm, preferentemente de no más de 10 nm, de manera especialmente preferente de no más de 5 nm, **caracterizadas porque** presentan una emisión de 600 a 700 nm, preferentemente de 620 a 660 nm, para el uso como diagnóstico *in vivo*, en particular para la marcación tisular en intervenciones quirúrgicas, endoscópicas o mínimamente invasivas.
6. Nanopartículas que contienen un núcleo inorgánico, una capa de pasivación y ligandos específicos que comprenden al menos una adhesina con un diámetro hidrodinámico del núcleo inorgánico con la capa de pasivación de no más de 15 nm, preferentemente de no más de 10 nm, de manera especialmente preferente de no más de 5 nm, **caracterizadas porque** presentan una emisión de 600 a 700 nm, preferentemente de 620 a 660 nm para el uso como teranóstico.
7. Nanopartículas para el uso según una de las reivindicaciones 5 a 6, **caracterizado porque** el núcleo inorgánico contiene un núcleo semiconductor de aleación, presentando el núcleo una composición homogénea y estando caracterizado por una energía de "brecha de bandas", que no es lineal con respecto a la relación molar de los dos semiconductores.
8. Nanopartículas para el uso según una de las reivindicaciones 5 a 6, **caracterizadas porque** el núcleo inorgánico comprende una aleación de un primer semiconductor y un segundo semiconductor, aumentando gradualmente la concentración del primer semiconductor desde el centro del núcleo hasta su superficie y disminuyendo gradualmente la concentración del segundo semiconductor desde el centro del núcleo hasta su superficie.
9. Nanopartículas para el uso según una de las reivindicaciones 7 u 8, **caracterizadas porque** al menos uno de los semiconductores es un semiconductor de grupo II-grupo VI o un semiconductor de grupo III-grupo V.
10. Nanopartículas para el uso según la reivindicación 9, **caracterizadas porque** el núcleo comprende una aleación seleccionada del grupo de las siguientes aleaciones: CdSeTe, CdSSe, CdSTe, ZnSeTe, ZnCdTe, CdHgS, CdHgTe, InGaAs, GaAlAs, InGaN, InGaP, CdSe y CdTe.
11. Nanopartículas para el uso según una de las reivindicaciones 5 a 10, **caracterizadas porque** la capa de pasivación contiene un componente de imidazol y el componente de imidazol comprende uno o varios compuestos seleccionados del siguiente grupo: histidina, carnosina, anserina, baleína, homocarnosina, histidilfenilalanina, ciclo-histidilfenilalanina, 5-amino-4-imidazolcarboxamida, histidilleucina, 2-mercaptoimidazol, boc-histidina, hidrazida, histinol, 1-metilhistidina, 3-metilhistidina, imidazolisina, ornitina que contiene imidazol (por ejemplo (beta)-(2-imidazolil)-L(alfa) alanina), alanina que contiene imidazol (por ejemplo (beta)-(2-imidazolil)-L(alfa) alanina), carcinina, histamina, que por su parte pueden estar sustituidos con grupos reactivos (por ejemplo amino, tiol, carboxilo o carboxamida).
12. Nanopartículas para el uso según la reivindicación 11, **caracterizadas por** un componente de reticulación transversal para la reticulación transversal del componente de imidazol, en particular una alquilfosfina y/o un derivado de alquilfosfina.
13. Composición farmacéutica para el uso como diagnóstico *in vivo* o como teranóstico, que contiene al menos una nanopartícula según una de las reivindicaciones 5 a 12.

Fig. 1



Fig. 2



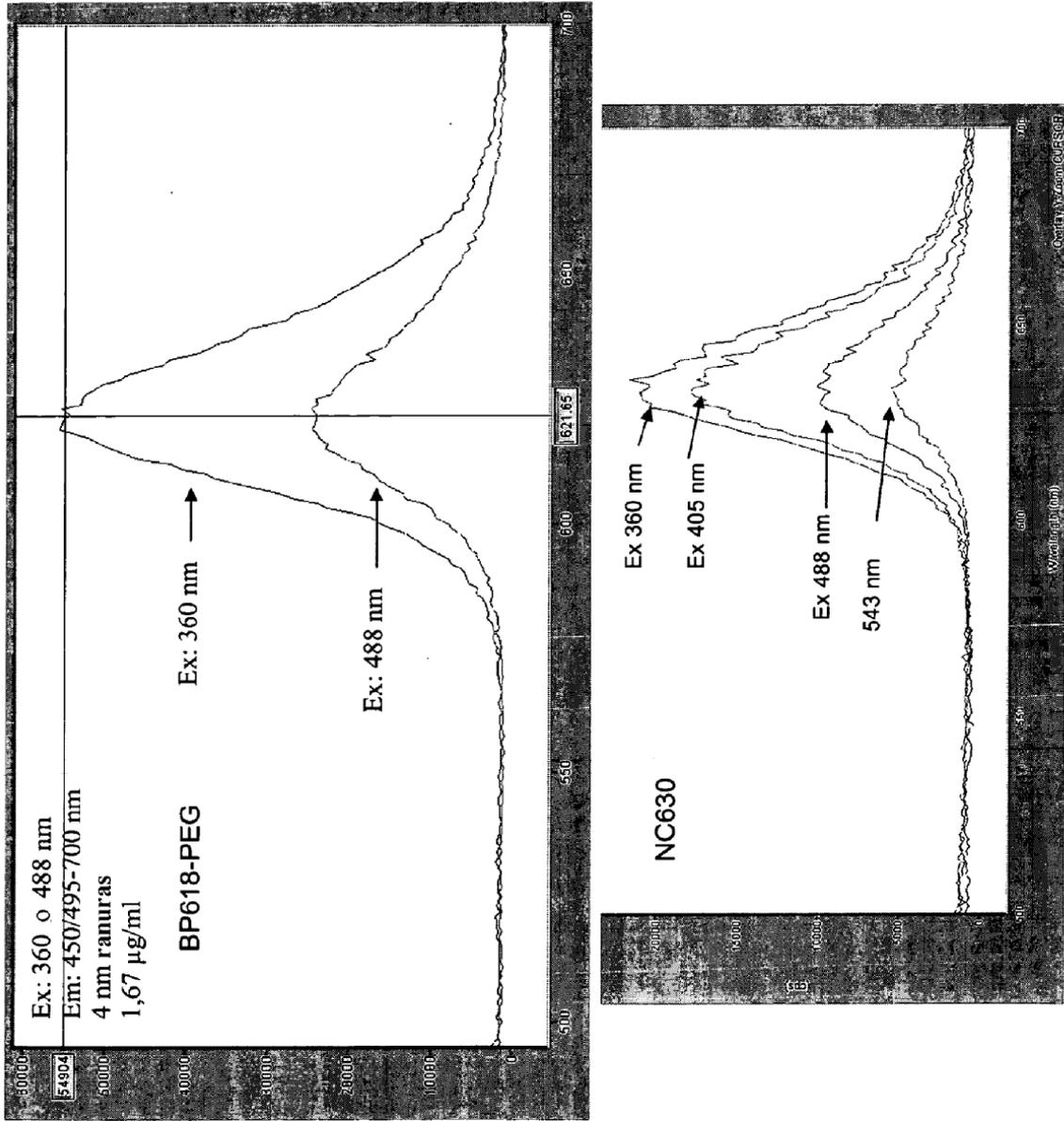


Fig. 3

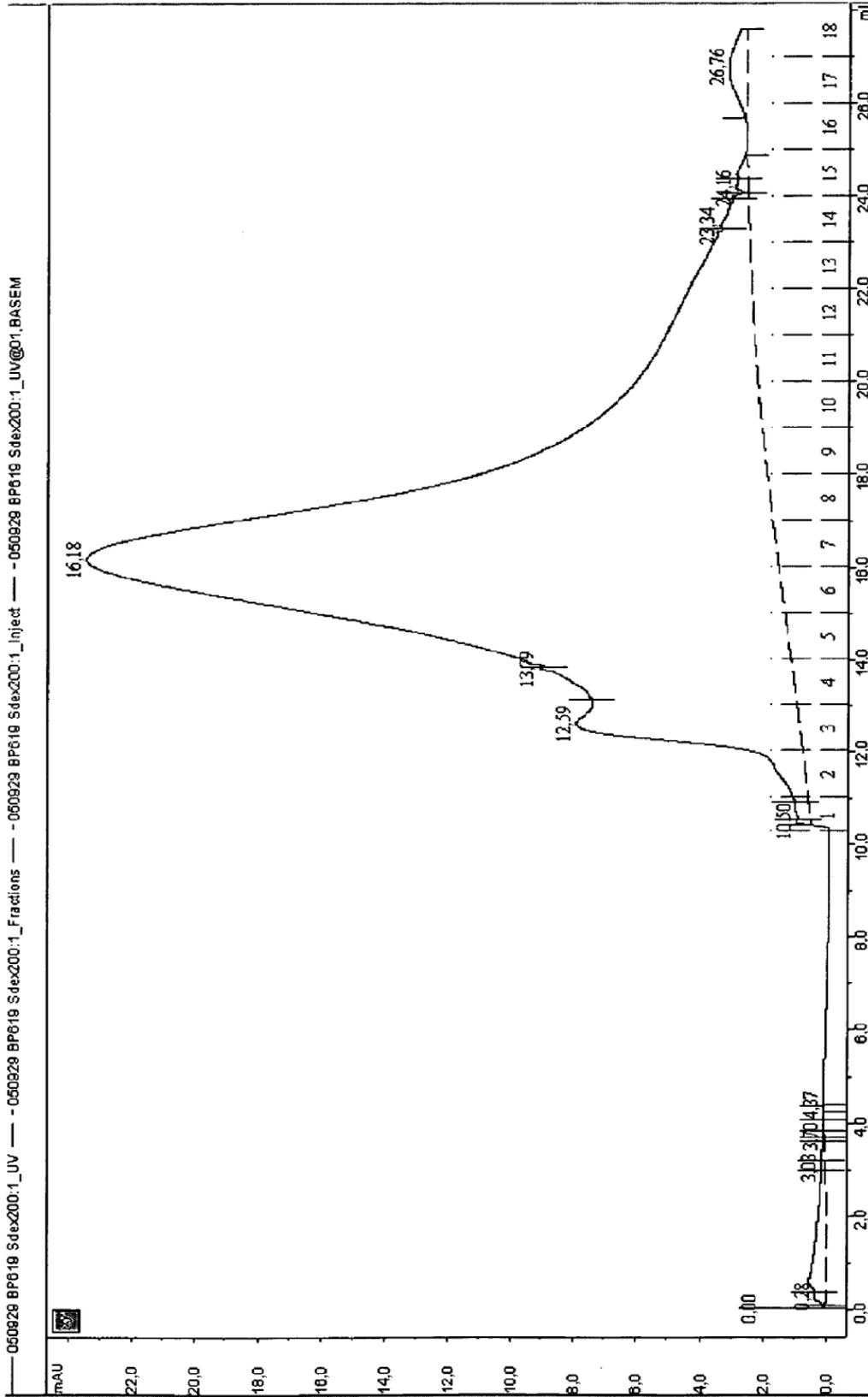


Fig. 4

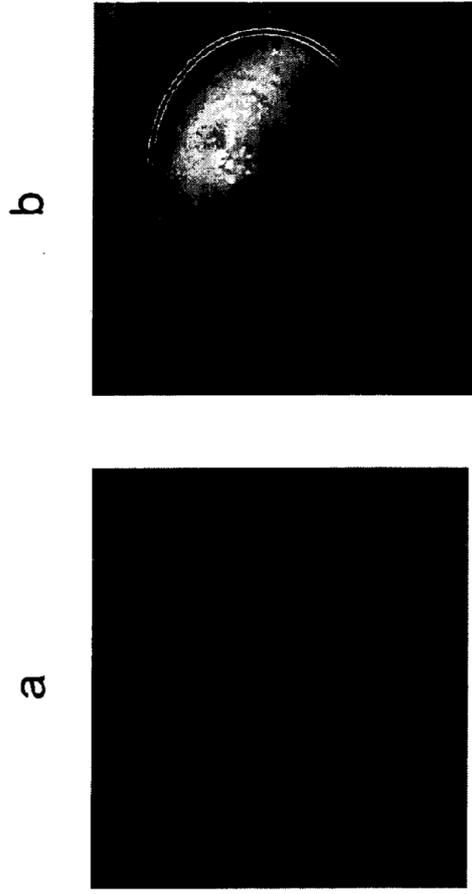


Fig. 5



Fig. 6

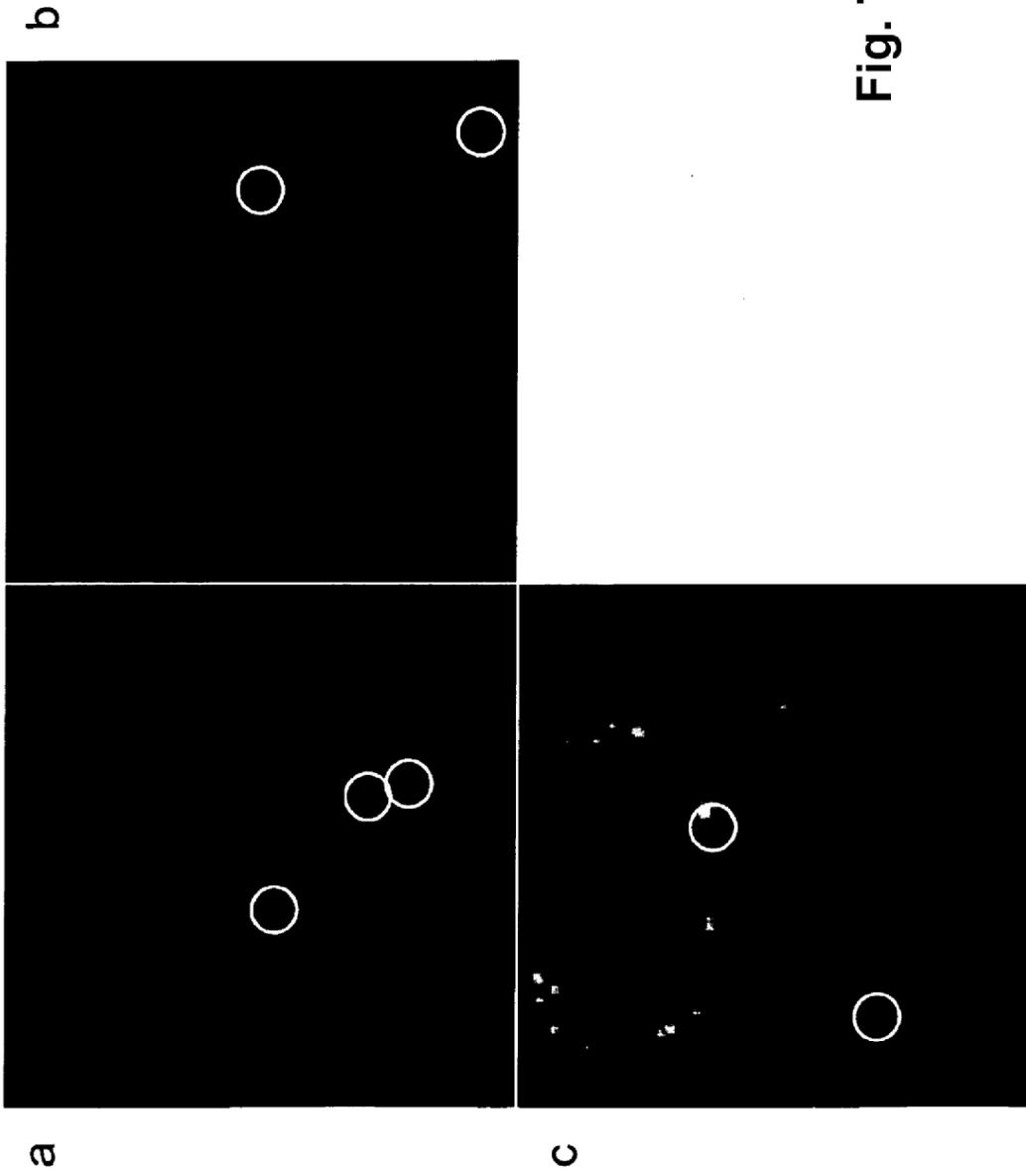
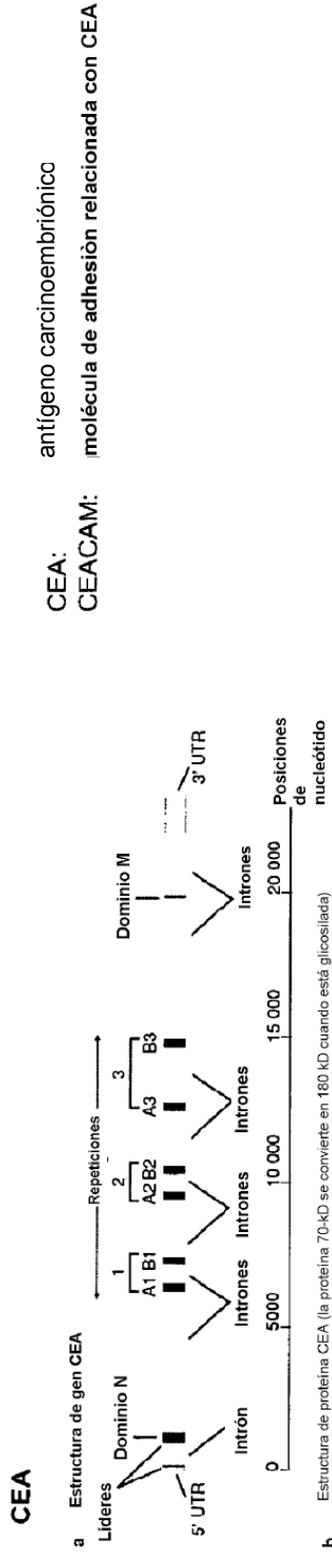


Fig. 7

Nuevo sistema de CEA/adhesinas



Macromolécula compleja altamente glicosilada con un peso molecular de aproximadamente 20 kDa

Miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas

Dominio N-terminal, que es homólogo con respecto al dominio variable de Ig (tipo IgV)

Fig. 8

Representación esquemática del antígeno carcinoembrionario (CEA), gen y proteína humanos

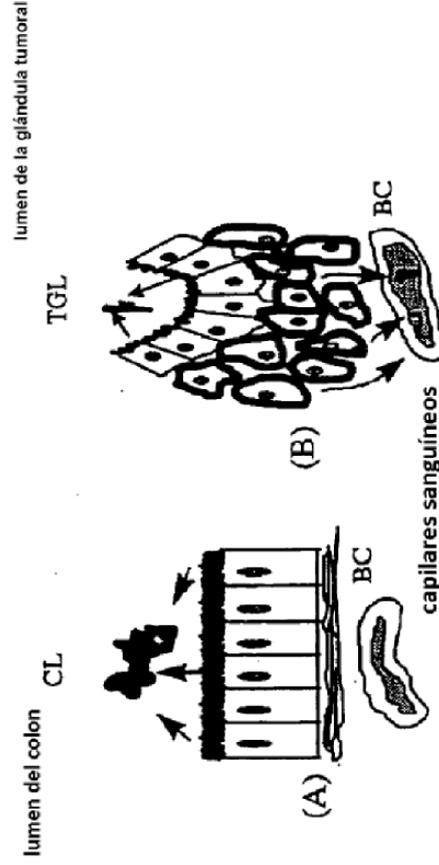
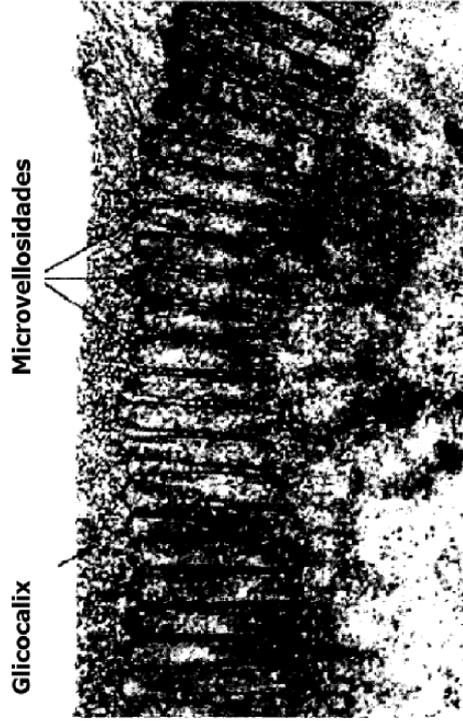
Expert Reviews in Molecular Medicine © 2000 Cambridge University Press

Nuevo sistema de CEA/adhesinas

CEA

presente también en tejido normal: en la colina en el epitelio cilíndrico y en las células caliciformes (CEACAM6 también)

en la superficie apical de los enterocitos maduros: en la región apical de Glycocalyx/Microvillus



CEA es un marcador tumoral sérico

Hammarström, 1999: "El CEA ha demostrado ser un antígeno diana adecuado para la detección de carcinomas colorrectales primarios y metastásicos y otros carcinomas".

Fig. 9

Nuevo sistema de CEA/adhesinas

CEACAM6 (=NCA)

La expresión de NCA (antígeno reactante transversal inespecífico, también: CEACAM6) está altamente regulada en el carcinoma colorrectal.

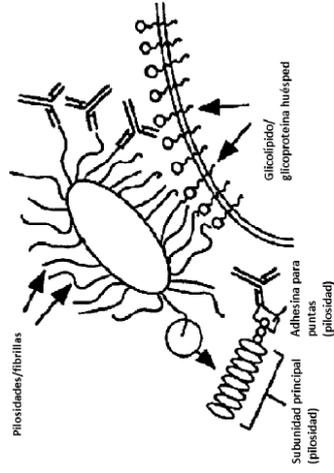
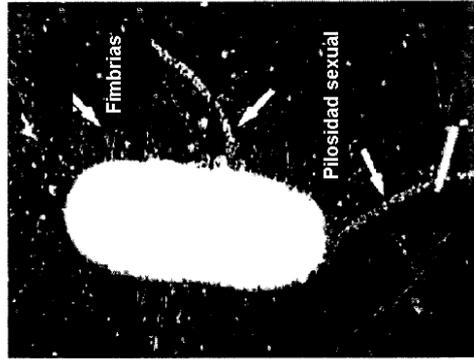
	Pólipos	Tamaño del pólipos (mm)	Expresión de CEACAM6*	
			Pólipos	Mucosa normal
Pólipos hiperplásicos				
1‡		0,5 X 1,0	++	+
2		1,5 X 0,5	+/-	+
3‡		1,0 X 1,0	++	+
4‡		1,5 X 1,0	++	+
5		2,0 X 0,5	++	+
6		2,0 X 2,0	+	+
7‡		2,0 X 2,0	++	+
8‡		2,0 X 2,0	++	+
Adenomas tubulares				
9‡		1,5 X 1,0	++	+
10‡		2,0 X 1,5	++	+
11		2,0 X 1,5	+	+
12		2,5 X 2,0	++	+
13		3,0 X 2,0	++	+
14‡		3,0 X 3,0	++	+
15		4,0 X 2,0	+	+
16‡		5,0 X 5,0	++	+
17		>5	++	+
18		<5	++	+
19		<10	++	+
20		14,0 X 12,0	++	+
Adenomas tubulovillosos				
21		4,0 X 4,0	++	+
22		<5	++	+
23		>5	++	+
24		11,0 X 11,0	++	+
Adenoma con atipia				
25		14,0 X 10,0	++	+

Fig. 10

Nuevo sistema de CEA/adhesinas

Fig. 11

Adhesinas

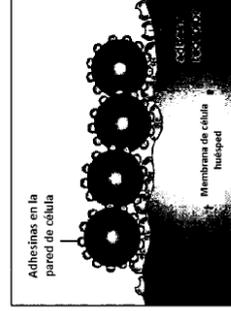


La adhesina DraE se encuentra en las puntas de las fimbrias

Las células *E. coli*, que expresan adhesinas de la familia Dr (subfamilia DrCEA), se unen a proteínas de superficie celular (relacionadas con) CEA. CEA y CEACAM6 sirven como moléculas receptoras de algunas de las adhesinas Dr: AfaE-I, Afa-III, DraE, DaaE

La familia Dr de las adhesinas está asociada a diarrea e infecciones del tracto urogenital (DAEC).

“Afa” representa adhesinas afimbriales y, por tanto, no están localizadas en fimbrias, sino directamente en la superficie bacteriana.



Preparación	Gen	En vector	Gen	En vector	0 min	20 min	30 min	60 min
1	NCA_N-domain	pGBKT7	DraE	pGADT7	24	1037	2015	4266
2	NCA_N-domain	pGBKT7	vacío	pGADT7	3	4	6	5
3	vacío	pGBKT7	DraE	pGADT7	2	14	23	49
4	vacío	pGBKT7	vacío	pGADT7	9	9	9	10

Fig. 14