

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 695 226**

51 Int. Cl.:

C09K 11/02 (2006.01)

C09K 11/58 (2006.01)

C09K 11/88 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

C01G 5/00 (2006.01)

C01B 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.08.2014** **PCT/TR2014/000317**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2016** **WO16024924**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2014** **E 14816442 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018** **EP 3194527**

54 Título: **Puntos cuánticos catiónicos de calcogenuro de plata que emiten en el IR cercano**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.01.2019

73 Titular/es:

KOC UNIVERSITESI (100.0%)
Rumeli Feneri Yolu Sariyer
34450 Istanbul, TR

72 Inventor/es:

YAGCI ACAR, HAVVA y
DEMIR, FATMA

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 695 226 T3

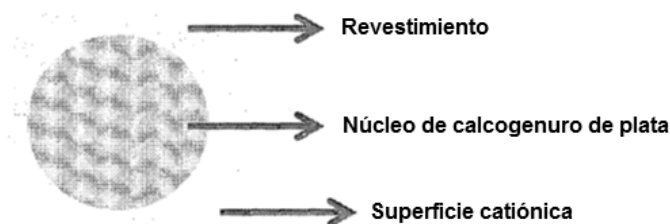
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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

Puntos cuánticos catiónicos de calcogenuro de plata que emiten en el IR cercano

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a nuevos puntos cuánticos catiónicos de calcogenuro de plata que emiten en el Infrarrojo Cercano (IRC) con revestimientos mixtos (Figura 1) que son capaces de emisiones de ancho de banda estrecho en el IRC con altos rendimientos cuánticos, alta eficiencia de transfección y baja citotoxicidad, y el método de síntesis y los usos de los mismos.



15 **Figura 1.** La ilustración del punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata con un revestimiento binario

Breve descripción de la técnica relacionada

20 Los Puntos Cuánticos (PC) son nanopartículas semiconductoras confinadas cuánticamente. Los PC muestran propiedades de luminiscencia cuando se excitan a una longitud de onda adecuada y muestran, en parte, una longitud de onda de emisión dependiente del tamaño, como se sabe en la técnica. Los Puntos Cuánticos ofrecen muchas ventajas sobre los tintes fluorescentes orgánicos tradicionales debido a sus propiedades únicas tales como 1) absorbancia continua y ancho de banda de emisión estrecho, 2) capacidad de excitar Puntos Cuánticos que emiten a diferentes longitudes de onda simultáneamente a una única longitud de onda de excitación, 3) capacidad de ajustar la longitud de onda de emisión mediante el tamaño del cristal semiconductor y/o por medio de la 25 composición del Punto Cuántico en una región espectral amplia, 4) gran sección transversal de absorbancia y alta absorptividad molar, 5) larga vida útil luminiscente que permite un mayor tiempo de análisis/detección. Asimismo, la superficie de los PC puede funcionalizarse como hidrófila o hidrófoba, para su suspensión en un medio acuoso u orgánico (oleoso). Por lo tanto, finalmente, los puntos cuánticos (PC) están reemplazando a los fluoróforos orgánicos.

30 En el campo de la biotecnología y la medicina, la ventana espectral donde los puntos cuánticos se excitan y emiten es muy crítica. La mejor ventana espectral normalmente se acepta como 700-900 nm, donde el tejido natural tiene absorbancia y luminiscencia mínimas o nulas. Esto no solo proporciona un mejor contraste en la formación de imágenes, sino que también proporciona la posibilidad de que los fotones penetren o se desplacen varios centímetros en el tejido, permitiendo de esta manera una formación de imágenes de tejido relativamente más profunda.

35 Una desventaja importante de los Puntos Cuánticos es el problema de la toxicidad. Las estructuras más comunes, tales como calcogenuros de cadmio, normalmente se excitan en un intervalo UV y emiten en la región visible, que no es la ventana espectral deseada, y estos puntos cuánticos son tóxicos. Hay diferentes enfoques para resolver estos problemas: uno de los cuales es la modificación de la superficie de los puntos cuánticos con materiales biocompatibles. Por ejemplo, se divulga un punto cuántico encapsulado con carbohidrato en una solicitud de patente, el documento WO 2005/093422 A2, de 2005. Otro ejemplo de revestimientos biológicos se presenta en la 40 Solicitud de Patente EP 1 868 938 A2, donde se sintetiza un punto cuántico de CdTe encapsulado con glutatión. Análogamente, se informa también de diversas estructuras de tipo núcleo/carcasa o núcleo/carcasa/carcasa, donde la carcasa de nuevo es un calcogenuro, normalmente con una banda prohibida más ancha, y preferentemente libre de Cd. (N. Chen et al. Biomaterials 33 (2012), 1238-1244)

45 Otra limitación en esta área es el desafío de sintetizar un punto cuántico de buena calidad. Buena calidad significa relativamente monodisperso, con un ancho de banda de emisión estrecho y que tenga un alto rendimiento cuántico. En general, los puntos cuánticos de buena calidad se preparan en disolventes orgánicos, a partir de materiales de partida relativamente tóxicos a altas temperaturas (200-400 °C). Por lo tanto, las partículas hidrófobas resultantes 50 resultan ser inadecuadas para aplicaciones biomédicas y las superficies de tales PC se modifican con moléculas orgánicas que permitirán también la suspensión de estas partículas en medio acuoso. Sin embargo, este proceso consume tiempo, es caro y normalmente provoca pérdida en las propiedades de luminiscencia y un desplazamiento

en la longitud de onda de luminiscencia, y puede dar como resultado también la agregación de partículas. La síntesis acuosa de puntos cuánticos es una alternativa para la síntesis orgánica, pero este enfoque, la mayor parte del tiempo, da como resultado puntos cuánticos con una distribución de tamaño más amplia, un ancho de banda más amplio y un peor rendimiento cuántico (M.-C. Castanon et al. *Materials Letters*, 2005; 59: 529)

Los puntos cuánticos catiónicos son nanomateriales prometedores en aplicaciones biológicas, especialmente en estudios de suministro de genes. El polímero catiónico más destacado es polietilenimina (PEI) para el suministro de genes. La polietilenimina (25 kDa, ramificada) se acepta como criterio de referencia en aplicaciones de suministro de genes debido a su alta eficiencia de transfección. El polímero se ha usado para sintetizar puntos cuánticos que se usarán en aplicaciones biológicas. Los puntos cuánticos de CdS revestidos de PEI se prepararon con un amplio perfil de emisión (tal como un blanco) y con rendimientos cuánticos de hasta 60-70 % a temperatura ambiente. Sin embargo, estos puntos cuánticos emiten en la región visible y tienen un problema de toxicidad.

Asimismo, la mayor parte del Ag_2X (X:S, Se y Te)-PCIRC en la bibliografía se sintetizaron por métodos de preparación orgánicos. Los ejemplos de tales estudios se dan en las siguientes referencias; Du Y., et al. *JACS* 2010; 132:1470-1; Jiang P. et al., *Chemistry of Materials* 2011;24:3-5; Sahu A. et al. *JACS* 2011; 133: 6509-12 y Yarema M. et al. *ACS Nano*. 2011; 5: 3758. Estos puntos cuánticos emiten en el intervalo de longitud de onda de 700-1100 nm, de con rendimientos cuánticos muy bajos (hasta 2 %).

Recientemente, hay algunos informes sobre la síntesis de Ag_2X -PCIRC en medio acuoso. Acar et al., prepararon PCIRC de Ag_2S revestidos de ácido 2-mercaptopropionico que emitían en el intervalo de 780-950 nm con rendimientos cuánticos de hasta el 17 %, que mejoraban hasta el 39 % tras el envejecimiento. Estos PCIRC de Ag_2S tienen el rendimiento cuántico más alto presentado hasta ahora (J. Mater. Chem., 2012, 22, 14674). Yang et al., informaron de PC de Ag_2S -BSA sintetizados en medio acuoso con emisiones entre 1050-1295 nm, que es el segundo intervalo de IRC (Yan et al, *Nanotechnology*, 2013, 24, 055706). Se prepararon también PC de Ag_2S estabilizados con glutatión y presentaron con un rendimiento cuántico del 0,96-1,97 % con una emisión entre 960-1050 nm (Tan et al., *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2013, 6, 18-23). Gui et al. han presentado PCIRC de Ag_2S sintetizados en un medio acuoso con una capa de revestimiento de polímero que termina en amina, multidentado (Gui et al, *Nanoscale*, 2014, 6 5467-5473).

En la Solicitud de Patente WO 2012/163078 A1, se sintetiza un punto cuántico basado en sulfuro de plata con un revestimiento o revestimientos hidrófilos, y se reivindica que tenga un alto rendimiento de fluorescencia y estabilidad, alta biocompatibilidad y tamaño homogéneo. También se presenta en esta solicitud de patente un método para sintetizar este PC mediante una ruta de síntesis sencilla, fácil de controlar y fácil de implementar. Aunque el método de síntesis se reivindica como conveniente, el método definido implica dos etapas de síntesis en las que la primera etapa produce partículas hidrófobas solubles orgánicas a 80-350 °C y la segunda etapa implica la transferencia de las partículas a una fase acuosa mediante intercambio de ligandos de la molécula hidrófoba con una hidrófila. Como se ha mencionado anteriormente, este método provoca un desplazamiento del pico de emisión hacia longitudes de onda más largas y algún ensanchamiento en el pico de emisión. Asimismo, aquellas partículas tienen un tamaño de núcleo cristalino de aproximadamente 5 nm y luminiscencia de aproximadamente 1200 nm. Esto cae dentro de la segunda ventana de IRC y es caro, y se requiere un detector de InGaAs de baja sensibilidad para el detector de luminiscencia.

En este sentido, es evidente que no hay una solución para todos estos obstáculos en la técnica anterior; siendo los problemas una apropiada ventana de emisión, tal como 700-900 nm, rendimientos cuánticos bajos, citotoxicidad, eficiencia de transfección y condiciones moderadas para el método de síntesis. En la bibliografía no hay ningún ejemplo de un método para sintetizar tal punto cuántico mediante una ruta acuosa, de una sola etapa y a baja temperatura. En este caso, en esta invención se reivindica un punto cuántico catiónico novedoso es capaz de ser luminiscente en el intervalo del IR cercano deseado a la longitud de onda de 700-900 nm, con un rendimiento cuántico mejorado drásticamente y una alta eficiencia de transfección y baja toxicidad y también un método para sintetizar tal punto cuántico mediante una única etapa y una reacción acuosa a bajas temperaturas.

La tecnología detrás de esta invención es el revestimiento mixto de los puntos cuánticos y el uso de calcogenuro de plata como punto cuántico no tóxico que emite el IR cercano. Con el enfoque de revestimiento mixto que se sigue en esta invención, se sugiere, por lo tanto, un empaquetado denso sobre la superficie del punto cuántico para problemas relacionados con defectos que pueden existir, que dan como resultado acontecimientos de acoplamiento no radiativos y se elimina la baja luminiscencia. Se ha demostrado que un enfoque de revestimiento mixto muestra un efecto sinérgico sobre la estabilización y reducción del tamaño de partícula. En el enfoque de revestimiento mixto, una pequeña molécula, preferentemente una molécula tiolada, y una macromolécula capaz de unirse a una superficie de cristal de calcogenuro de plata, se usaron como un material de revestimiento para el cristal semiconductor. La adición de pequeñas moléculas cerca de los revestimientos poliméricos da como resultado la limitación del crecimiento cristalino y ha mejorado la pasificación de la superficie, puesto que se unen a la superficie fuertemente y más densamente en los sitios que quedan sin pasificar por el revestimiento polimérico grande. Por lo tanto, se ha probado que los revestimientos mixtos producen partículas más pequeñas con una intensidad de luminiscencia más grande en comparación con puntos cuánticos revestidos únicamente con un revestimiento polimérico.

Teniendo en cuenta este enfoque, los puntos cuánticos catiónicos acuosos de sulfuro de plata en el IR cercano (Cat-Ag₂S-PC), con emisión máxima a aproximadamente 800-850 nm, con rendimientos cuánticos de hasta 150 % con respecto a LDS (tinte láser IR cercano 798 LDS, rendimiento cuántico del 14 % que presentó el productor) se sintetizan a temperatura ambiente en medio acuoso. Esta ventana de luminiscencia es adecuada para la detección con detectores de Si sensibles y baratos. Los altos rendimientos cuánticos son grandes ventajas para penetración/profundidad de formación de imágenes mejorada y la relación señal/ruido y más eficientes que una alta concentración (Won et al, Molecular Imaging, Vol 11, N.º 4, pág. 338-352, 2012). Los estudios citotóxicos realizados sobre varios puntos cuánticos (Cat-Ag₂S-PC) demostraron la mejora significativa de la citocompatibilidad en comparación con polietilenimina de 25 kDa, que es aceptada como el criterio de referencia para la transfección de genes. Asimismo, con los estudios de captación de células se demuestra que los Cat-Ag₂S-PC son internalizados por las células y pueden usarse como sondas ópticas en formación de imágenes ópticas. Asimismo, en estudios *in vitro* demostraron que los Cat-Ag₂S-PC son capaces de condensar y proteger GFP y las eficiencias de transfección se potencian en comparación con PEI.

Sumario de la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a un punto cuántico catiónico que emite en el IR cercano, novedoso, que es capaz de ser luminiscente en el intervalo de IR cercano deseado a la longitud de onda de 800-850 nm, con rendimiento cuántico mejorado y alta eficiencia de transfección y baja toxicidad. El punto cuántico es un calcogenuro de plata seleccionado de un grupo que comprende sulfuro de plata, seleniuro de plata, telururo de plata o una mezcla con un revestimiento mixto, donde el revestimiento comprende al menos 2 tipos diferentes de materiales siendo uno una macromolécula seleccionada de un grupo de polímeros que comprenden polietilenimina, poli(dimetilaminoetil metacrilato), poli(amido amina) (PAMAM), ácido poli-L-láctico (PLLA), dendrímeros con grupos terminales amino tales como PAMAM y quitosano, y siendo el otro una molécula pequeña seleccionada del grupo que comprende tiolatos, carboxilatos y aminas.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método para la síntesis en una sola etapa de puntos cuánticos de calcogenuro de plata revestidos que incluye las etapas de:

- a) Hacer reaccionar la sal de plata soluble en agua y la fuente de calcogenuro soluble en agua en un medio acuoso en presencia de los materiales de revestimiento, a temperatura ambiente, en atmósfera inerte entre pH 5,5-11 y
- b) Agitar la solución para el crecimiento de cristales a temperatura ambiente
- c) Posteriormente, lavar el punto cuántico resultante con agua

El tercer aspecto de la invención se refiere a un punto cuántico catiónico que emite en el IR cercano, novedoso, con un revestimiento mixto que tiene citocompatibilidad, rendimiento cuántico y eficiencia de transfección mejoradas, y que se sintetiza mediante una única etapa, teniendo lugar la reacción homogénea en solución acuosa a temperaturas bajas.

Y un aspecto final de la invención es el uso de estos puntos cuánticos de calcogenuro de plata en sensores, células solares sensibilizadas por punto cuántico, aplicaciones de etiquetado fluorescente y médicas, tales como formación de imágenes médicas que incluyen detección de tumores, marcado, terapia incluyendo suministro de fármacos y transfección.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Espectros de fotoluminiscencia de Cat-Ag₂S-PC preparados con diferentes relaciones PEI/2MPA (moles de Ag:moles de S = 4, Reacción a temperatura ambiente y pH 10, tiempo de reacción: 5 min).

Figura 2. Espectros de fotoluminiscencia de Cat-Ag₂S-PC preparados con relaciones PEI/2MPA de 60/40 y 80/20 a pH 7,5, 9 y 10 (moles de Ag:moles de S = 4, moles de Ag:moles de PEI = 1:3, moles de Ag:moles de 2-MPA = 1:2; Reacción a temperatura ambiente, tiempo de reacción: 5 min).

Figura 3. Imágenes TEM de Cat-Ag₂S-PC con PEI/2MPA 80/20 sintetizados a pH 9,0 distribuciones de partícula a) 20 nm y b) escala de 5 nm c) difracción de la red cristalina de Ag₂S d) distancia interplanar entre un plano determinado por una imagen enfocada.

Figura 4. Imágenes confocales de células HeLa tratadas con Cat-Ag₂S-PC. IR cercano (a), transmisión (b), imagen combinada (c) de una célula individual. El color rojo muestra los puntos cuánticos. Las flechas muestran los PC en la célula.

Figura 5. Ensayos de MTT que ilustran el porcentaje de viabilidad celular de las células HeLa expuestas a ión Ag⁺ libre, Cat-Ag₂S-PC con PEI/2MPA 80/20 sintetizado a pH 9, 2-MPA Ag₂S revestido con 2-MPA y Ag₂S revestido con PEI. Las concentraciones están basadas en la concentración ión Ag⁺ en soluciones de PC. Este intervalo de concentración corresponde a 4,6-115 µg PC/ml.

Descripción detallada de la invención

Un aspecto de la invención es un punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata que emite en el IR cercano con un revestimiento mixto, donde el calcogenuro se selecciona de un grupo que comprende sulfuro de plata (Ag_2S), seleniuro de plata (Ag_2Se), telururo de plata (Ag_2Te) y mezclas de los mismos, y el revestimiento mixto comprende al menos dos tipos de materiales, ambos capaces de unirse a la superficie del calcogenuro de plata y siendo uno una macromolécula seleccionada de un grupo de polímeros que comprenden polietilenimina, poli(dimetilaminoetil metacrilato), dendrímero de poli(amido amina) (PAMAM), dendrímeros con grupos terminales amina y quitosano y siendo el otro una molécula pequeña seleccionada de un grupo de moléculas pequeñas que comprenden tiolatos, carboxilatos y aminas. En una realización preferida de la invención, el calcogenuro de plata se selecciona para que sea sulfuro de plata (Ag_2S). En otra realización preferida de la invención, el material de revestimiento macromolecular se selecciona para que sea polietilenimina (PEI) y más preferentemente una PEI ramificada de 25 kDa. En otra realización preferida de la invención, el revestimiento de molécula pequeña se selecciona para que sea una molécula pequeña tiolada soluble en agua y preferentemente un ácido propiónico y, más preferentemente, ácido 2-mercaptopropiónico.

Una realización preferida de la invención es un punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata que emite en el IR cercano, como se ha descrito anteriormente, donde el calcogenuro de plata se selecciona para que sea sulfuro de plata (Ag_2S), con el revestimiento mixto comprendiendo al menos 2 tipos de materiales, uno de los cuales se selecciona para que sea polietilenimina y el otro se selecciona para que sea una molécula pequeña tiolada y, preferentemente, es un ácido propiónico y, más probablemente, es ácido 2-mercaptopropiónico.

En una realización preferencia de la invención, el punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata que emite en el IR cercano, donde el calcogenuro de plata se selecciona para que sea sulfuro de plata (Ag_2S), con el revestimiento mixto comprendiendo al menos 2 tipos de materiales, uno de los cuales se selecciona para que sea polietilenimina y el otro se selecciona para que sea una molécula pequeña tiolada y, preferentemente, sea un ácido propiónico y, más preferentemente, sea ácido 2-mercaptopropiónico.

La realización más preferida de esta invención se refiere a un punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata que emite en el IR cercano como se ha descrito anteriormente, donde el calcogenuro de plata se selecciona para que sea sulfuro de plata (Ag_2S), uno del material de revestimiento se selecciona para que sea polietilenimina, preferentemente polietilenimina ramificada de 25 kDa, y el otro material de revestimiento se selecciona para que sea ácido 2-mercaptopropiónico y el punto cuántico se caracteriza por que la relación molar de polietilenimina (PEI) a ácido 2-mercaptopropiónico usada en la síntesis varía entre 60/40 y 80/20.

Otra realización preferida de la invención se refiere a un punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata que emite en el IR cercano (Cat- Ag_2X -PC) como se ha descrito anteriormente, donde el punto cuántico se caracteriza adicionalmente por que la relación molar de la fuente de catión de plata al material de revestimiento total usada en la síntesis es 1/5.

Otra realización preferida de la invención es un punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata que emite en el IR cercano (Cat- Ag_2X -PC) como se ha descrito anteriormente, donde el punto cuántico se caracteriza adicionalmente por que la relación molar de la fuente de catión de plata a la fuente de sulfuro usada en la síntesis es 4.

La realización más preferida de la invención es un punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata que emite en el IR cercano (Cat- Ag_2X -PC) como se ha descrito anteriormente, donde el calcogenuro de plata se selecciona para que sea sulfuro de plata (Ag_2S), uno del material de revestimiento se selecciona para que sea polietilenimina, preferentemente polietilenimina ramificada de 25 kDa, y el otro material de revestimiento se selecciona para que sea ácido 2-mercaptopropiónico y el punto cuántico se caracteriza como:

- i. La relación molar de polietilenimina (PEI) a ácido 2-mercaptopropiónico usada en la síntesis es 80/20
- ii. La relación molar de fuente de catión plata a material de revestimiento total usada en la síntesis es 1/5 y
- iii. La relación molar de fuente de catión plata a fuente de sulfuro usada en la síntesis es 4.

Otro aspecto de la invención es un método para sintetizar un punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata que emite en el IR cercano con un revestimiento mixto, donde el calcogenuro de plata se selecciona del grupo que comprende sulfuro de plata (Ag_2S), seleniuro de plata (Ag_2Se), telururo de plata (Ag_2Te) y mezclas de los mismos, y el revestimiento mixto comprende al menos 2 tipos de materiales ambos de los cuales son capaces de unirse a la superficie del calcogenuro de plata y siendo uno una macromolécula catiónica seleccionada de un grupo de polímeros que comprenden polietilenimina, poli(dimetilaminoetil metacrilato), poli(amido amina) (PAMAM), ácido poli-L-láctico (PLLA), dendrímeros con grupos terminales amina y quitosano y siendo el otro una molécula pequeña seleccionada de un grupo de moléculas pequeñas que comprenden tiolatos, carboxilatos y aminas, y el método se caracteriza como de una sola etapa, homogéneo, acuoso y teniendo lugar el método a temperatura ambiente.

Otra realización seleccionada de la invención se refiere a un método para sintetizar un punto cuántico catiónico de

calcogenuro de plata que emite en el IR cercano como se ha descrito anteriormente, que comprende las etapas de

- i. Hacer reaccionar una sal de plata soluble en agua y una fuente de calcogenuro soluble en agua en un medio acuoso en presencia de materiales de revestimiento a temperatura ambiente, a un pH que varía de 5-11 en atmósfera inerte y

- 5 ii. Agitar la mezcla para el crecimiento del cristal y
- iii. Posteriormente lavar el punto cuántico resultante con agua

Una realización preferida de la invención es un método para sintetizar un punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata que emite en el IR cercano con un revestimiento binario como se ha descrito anteriormente, donde el

- 10 calcogenuro de plata se selecciona para que sea sulfuro de plata (Ag_2S).

Otra realización preferida de la invención está relacionada con un método para sintetizar un punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata que emite en el IR cercano con un revestimiento binario, donde los materiales de revestimiento se seleccionan de al menos dos tipos de materiales, uno de los cuales es un revestimiento polimérico catiónico y el otro es uno seleccionado de un grupo de moléculas pequeñas con una afinidad para la superficie cristalina del calcogenuro de plata como se ha descrito anteriormente. En una realización más preferida de la invención el revestimiento polimérico se selecciona de polietilenimina y el otro revestimiento se selecciona de un grupo de moléculas pequeñas que comprende tiolatos, carboxilatos y aminas.

- 15

Otra realización de la invención es el método para sintetizar un punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata como se ha descrito anteriormente, donde uno del material de revestimiento es una macromolécula seleccionada de un grupo de polímeros que comprenden polietilenimina, poli(dimetilaminoetil metacrilato), poli(amido amina) (PAMAM), ácido poli-L-láctico (PLLA), dendrímeros con grupos terminales amina y quitosano, y el otro se selecciona para que sea una molécula pequeña tiolada y preferentemente sea un ácido propiónico y, más probablemente, sea

- 20
- 25 ácido 2-mercaptopropiónico.

Otra realización preferida de la presente invención es el método para sintetizar el punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata como se ha descrito anteriormente, donde el calcogenuro de plata se selecciona para que sea sulfuro de plata (Ag_2S) con el revestimiento mixto que comprende al menos 2 tipos de materiales, uno de los cuales se selecciona para que sea polietilenimina y el otro se selecciona para que sea una molécula pequeña tiolada y, preferentemente, sea un ácido propiónico y, más probablemente, sea ácido 2-mercaptopropiónico.

- 30

Otra realización preferida de la invención se refiere a un método para sintetizar el punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata como se ha descrito anteriormente, donde el calcogenuro de plata se selecciona para que sea sulfuro de plata (Ag_2S), uno del material de revestimiento se selecciona para que sea polietilenimina, preferentemente polietilenimina ramificada de 25 kDa, y el otro material de revestimiento se selecciona para que sea ácido 2-mercaptopropiónico y dicho método se caracteriza por que la relación molar usada de polietilenimina (PEI) a ácido 2-mercaptopropiónico se selecciona para que esté entre 60/40 y 80/20.

- 35

Otra realización preferida también de la invención trata de un método para sintetizar el punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata como se ha descrito anteriormente, donde el calcogenuro de plata se selecciona para que sea sulfuro de plata (Ag_2S), uno del material de revestimiento se selecciona para que sea polietilenimina, preferentemente polietilenimina ramificada de 25 kDa, y el otro material de revestimiento se selecciona para que sea ácido 2-mercaptopropiónico y el método se caracteriza por que la relación molar usada de fuente de catión plata a material de revestimiento total es 1/5.

- 40
- 45

Una realización especializada de la invención trata de un método para sintetizar el punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata como se ha descrito anteriormente, donde el calcogenuro de plata se selecciona para que sea sulfuro de plata (Ag_2S), uno del material de revestimiento se selecciona para que sea polietilenimina, preferentemente polietilenimina ramificada de 25 kDa, y el otro material de revestimiento se selecciona para que sea ácido 2-mercaptopropiónico y el método se caracteriza por que la relación molar usada de fuente de catión plata a fuente de sulfuro es 4.

- 50

Una realización preferida de la invención se refiere a un método para sintetizar el punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata como se ha descrito anteriormente, donde el calcogenuro de plata se selecciona para que sea sulfuro de plata (Ag_2S), uno del material de revestimiento se selecciona para que sea polietilenimina, preferentemente polietilenimina ramificada de 25 kDa, y el otro material de revestimiento se selecciona para que sea ácido 2-mercaptopropiónico y el método se caracteriza de la siguiente manera:

- 55

- 60 i. La relación molar usada de polietilenimina (PEI) a ácido 2-mercaptopropiónico es 80/20
- ii. La relación molar de fuente de catión plata a materiales de revestimiento totales se establece a 1/5
- iii. La relación molar de fuente de catión plata a la fuente de sulfuro es 4 y
- iv. El pH de la mezcla de reacción se ajusta a un valor entre 5,5-11,0.

El tercer aspecto de la invención se refiere un punto cuántico catiónico que emite en el IR cercano, novedoso, con un revestimiento mixto donde el calcogenuro de plata se selecciona de un grupo que comprende sulfuro de plata

- 65

(Ag₂S), seleniuro de plata (Ag₂Se), telururo de plata (Ag₂Te) y mezclas de los mismos, y el revestimiento mixto comprende al menos 2 tipos de materiales ambos capaces de unirse a la superficie del calcogenuro de plata, y siendo uno una macromolécula seleccionada de un grupo de polímeros que comprenden polietilenimina, poli(dimetilaminoetil metacrilato), poli(amido amina) (PAMAM), ácido poli-L-lactida (PLLA), dendrímeros con grupos

terminales amina y quitosano, y siendo el otro una molécula pequeña seleccionada de un grupo de moléculas pequeñas que comprenden tiolatos, carboxilatos y amina que tiene un rendimiento cuántico mejorado y eficiencia de transfección y se sintetiza mediante una única etapa, teniendo lugar la reacción homogénea en solución acuosa a bajas temperaturas, y preferentemente comprende las etapas de:

- i. Hacer reaccionar una sal de plata soluble en agua y una fuente de calcogenuro soluble en agua en un medio acuoso en presencia de los materiales de revestimiento a temperatura ambiente, un pH que varía de 5-11 en atmósfera inerte y
- ii. Agitar la mezcla y
- iii. Posteriormente, lavar el punto cuántico resultante con agua

En una realización preferida de la invención, el punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata que emite en el IR cercano sintetizado como se ha descrito anteriormente se caracteriza por que el calcogenuro de plata se selecciona para que sea sulfuro de plata (Ag₂S).

Otra realización preferida de la invención es el punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata que emite en el IR cercano como se ha descrito anteriormente, donde uno de los materiales de revestimiento se selecciona para que sea polietilenimina y el otro para que sea una molécula pequeña seleccionada de un grupo de moléculas pequeñas que comprende tiolatos, carboxilatos y aminas.

Otra realización de la invención es el punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata que emite en el IR cercano como se ha descrito anteriormente, donde uno del material de revestimiento es una macromolécula seleccionada de un grupo de polímeros que comprenden polietilenimina, poli(dimetilaminoetil metacrilato), poli(amido amina) (PAMAM), ácido poli-L-lactida (PLLA), dendrímeros con grupos terminales amina y quitosano, y el otro se selecciona para que sea una molécula pequeña tiolada y, preferentemente, un ácido propiónico y, más probablemente, sea ácido 2-mercaptopropiónico.

Otra realización de la invención es el punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata que emite en el IR cercano sintetizado como se ha descrito anteriormente, donde el calcogenuro de plata se selecciona para que sea sulfuro de plata (Ag₂S), uno del material de revestimiento se selecciona para que sea polietilenimina, preferentemente polietilenimina ramificada de 25 kDa, y el otro material de revestimiento se selecciona para que sea ácido 2-mercaptopropiónico.

Otra realización preferida de la invención es un punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata que emite en el IR cercano como se ha descrito anteriormente, donde el calcogenuro de plata se selecciona para que sea sulfuro de plata (Ag₂S), uno del material de revestimiento se selecciona para que sea polietilenimina, preferentemente polietilenimina ramificada de 25 kDa, y el otro material de revestimiento se selecciona para que sea ácido 2-mercaptopropiónico y el punto cuántico donde el punto cuántico se caracteriza por que la relación molar usada de polietilenimina (PEI) a ácido 2-mercaptopropiónico en la síntesis varía entre 60/40 y 80/20.

Otra realización de la invención es el punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata que emite en el IR cercano como se ha descrito anteriormente, donde el calcogenuro de plata se selecciona para que sea sulfuro de plata (Ag₂S), uno del material de revestimiento se selecciona para que sea polietilenimina, preferentemente polietilenimina ramificada de 25 kDa, y el otro material de revestimiento se selecciona para que sea ácido 2-mercaptopropiónico, donde el punto cuántico se caracteriza adicionalmente por que la relación molar de la fuente de catión plata al material de revestimiento total usada en la síntesis es 1/5.

Otra realización de la invención es un punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata que emite en el IR cercano como se ha descrito anteriormente, donde el calcogenuro de plata se selecciona para que sea sulfuro de plata (Ag₂S), uno del material de revestimiento se selecciona para que sea polietilenimina, preferentemente polietilenimina ramificada de 25 kDa, y el otro material de revestimiento se selecciona para que sea ácido 2-mercaptopropiónico y el punto cuántico se caracteriza adicionalmente por que la relación molar de fuente de catión plata a fuente de sulfuro usada en la síntesis es 4.

Otra realización de la invención es el punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata que emite en el IR cercano como se ha descrito anteriormente, donde el calcogenuro de plata se selecciona para que sea sulfuro de plata (Ag₂S), uno del material de revestimiento se selecciona para que sea polietilenimina, preferentemente polietilenimina ramificada de 25 kDa, y el otro material de revestimiento se selecciona para que sea ácido 2-mercaptopropiónico y el punto cuántico se caracteriza por que:

- i. La relación molar de polietilenimina (PEI) a ácido 2-mercaptopropiónico usada en la síntesis es 80/20
- ii. La relación molar de la fuente de catión plata al material de revestimiento total usada en la síntesis es 1/5

- iii. La relación molar de la fuente de catión plata a la fuente de sulfuro usada en la síntesis es 4 y
- iv. El pH de la mezcla de reacción se ajusta a un valor entre 5,5-11,0.

- Un aspecto final de la invención es el uso del punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata que emite el IR cercano con un revestimiento mixto, donde el revestimiento comprende al menos dos tipos diferentes de materiales como se ha descrito anteriormente, en sensores, células solares sensibilizadas con punto cuántico, etiquetado fluorescente y aplicaciones médicas tales como formación de imágenes médicas incluyendo detección y marcado de tumores, terapia incluyendo suministro de fármacos y transfección.
- El punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata que emite el IR cercano puede usarse especialmente como sondas ópticas, agentes de transfección y agentes diana para una enfermedad específica.

- Los Puntos Cuánticos tienen un gran potencial en el campo de la biotecnología y la medicina. Los perfiles de absorción ancha y emisión estrecha de los puntos cuánticos permiten la excitación de diferentes puntos cuánticos a una única longitud de onda, pero la emisión desde diferentes puntos cuánticos a diferentes longitudes de onda, dependiendo del tamaño de cristal del PC. Esta propiedad de los PC es muy ventajosa para el marcado; incluyendo péptidos, oligonucleótidos, células, tejidos y similares. El marcado fluorescente conocido también como etiquetado fluorescente se define como un fluoróforo - normalmente una molécula orgánica - que se fija químicamente a una biomolécula para la detección de dicha proteína, anticuerpo, oligonucleótido, aminoácido, etc. El largo tiempo útil de luminiscencia de los puntos cuánticos con respecto a los fluoróforos orgánicos, la excitación simultánea de puntos cuánticos que emiten a diferentes longitudes de onda a una única longitud de onda de excitación, y un mayor coeficiente de extinción hace que los puntos cuánticos sean buenos candidatos para el etiquetado fluorescente. Considerando la región IRC, la ausencia de fluoróforos orgánicos hace que los puntos cuánticos IRC sean muy atractivos para el etiquetado fluorescente. Estos proporcionan también medios valiosos para la formación de imágenes ópticas para seguimiento y diagnóstico. Se considera que esta capacidad de los puntos cuánticos para cruzar la membrana celular es un aspecto crítico para el marcado de células y aplicaciones de formación de imágenes. La "formación de imágenes médicas" es otra área de aplicación en la que los puntos cuánticos indicados en la presente invención pueden ser útiles. La formación de imágenes médicas es un método para crear imágenes del cuerpo humano para fines principalmente de diagnóstico. La "detección de tumores" es una ramificación de la formación de imágenes médicas en la que pueden usarse los puntos cuánticos. Los puntos cuánticos pueden usarse también para fines de terapia y, preferentemente, como vehículos de suministro de fármaco específicos para una enfermedad. Los fármacos pequeños, tales como fármacos quimioterapéuticos y/u oligonucleótidos, pueden conjugarse a puntos cuánticos. La aplicación de suministro de genes puede realizarse también mediante puntos cuánticos catiónicos, que es un proceso de introducción de ADN, ARNs, ARNm extraño en células hospedadoras, y realizada principalmente para terapia génica y modificaciones genéticas. Los puntos cuánticos conjugados con fármacos son materiales teranósticos valiosos, donde la conjugación con ligandos específicos para enfermedad o tejido, tales como moléculas, anticuerpos, péptidos y proteínas proporciona un suministro específico para el sitio/tejido/enfermedad de los PC y, por tanto, del agente terapéutico. La fluorescencia de los PC teranósticos proporcionan también oportunidad de supervisar la influencia del agente terapéutico suministrado al sitio diana con formación de imágenes ópticas. Las ondas ópticas que se usan en esta invención pueden definirse como los dispositivos de seguimiento químico.

- Pueden utilizarse Puntos Cuánticos como sondas ópticas en una diversidad de sensores que detectan un producto químico, un ión o un proceso donde la interacción de los puntos cuánticos con las especies diana potencia o reduce la luminiscencia del punto cuántico. Un intervalo de absorbancia amplio de los puntos cuánticos también es útil en aplicaciones de célula solar sensibilizadas con punto cuántico. Los puntos cuánticos IRC tienen una fuerte absorbancia en la región visible, que permite una utilización potenciada de la energía solar con puntos cuánticos de IRC en comparación con aquellos que absorben UV y emiten en el intervalo visible, tal como calcogenuros de cadmio. Los puntos cuánticos que emiten en el IRC como se describe en el presente documento pueden usarse como sondas ópticas para sensores y como sensibilizadores en células solares.

Definiciones

- Los puntos cuánticos como se usan aquí en esta invención se refieren a nanocristales luminiscentes que se fabrican de materiales semiconductores y que presentan un efecto de confinamiento cuántico. Los puntos cuánticos catiónicos se refieren a puntos cuánticos que tienen superficies externas catiónicas, en otras palabras, que están revestidos con materiales orgánicos con naturaleza catiónica. Los materiales catiónicos se refieren a polímeros catiónicos en esta invención. Los polímeros catiónicos que pueden usarse como un revestimiento para puntos cuánticos catiónicos pueden enumerarse como sigue: polietilenimina, poli(dimetilaminoetil metacrilato), poli(amido amina) (PAMAM), ácido poli-L-lactida (PLLA), dendrímeros con grupos terminales amina y quitosano. Un ejemplo de los polímeros usados en esta invención es polietilenimina (PEI). La PEI puede estar en forma lineal o ramificada; y los pesos moleculares pueden variar de 1.800-70.000 Da.

- Un revestimiento mixto como se usa en el presente documento se refiere a un "revestimiento binario", y difiere del revestimiento doble, y el punto cuántico resultante difiere de los puntos cuánticos de tipo núcleo/carcasa. Los materiales de revestimiento usados en esta invención pueden clasificarse en dos grupos, uno de los cuales es

"polímero catiónico" también denominado "macromolécula" o revestimiento macromolecular, que puede definirse como moléculas grandes que se crean por polimerización de subunidades más pequeñas y aquellos que se usan en esta invención se han enumerado anteriormente.

- 5 El otro material de revestimiento se selecciona de un grupo que comprende moléculas pequeñas solubles en agua con capacidad para unirse a la superficie cristalina del calcogenuro de plata, tales como tiolatos, aminas y carboxilatos. Las moléculas pequeñas como se usa aquí en esta invención se refieren a compuestos orgánicos de bajo peso molecular. Los ejemplos de estas moléculas pequeñas solubles en agua adecuadas para su uso en la presente invención incluyen, aunque sin limitación, ácido tioglicólico, ácido 3-mercaptopropiónico, ácido 2-mercaptopropiónico, tioglicerol, glutatión y cistamina.

La mezcla de calcogenuro de plata como se usa en el presente documento se refiere a Ag_2S , Ag_2Se y Ag_2Te en una mezcla en forma de aleación o una mezcla física. La mezcla de calcogenuro de plata puede referirse también a estructuras de tipo núcleo/carcasa que comprenden, aunque sin limitación, calcogenuros de plata tales como $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{Ag}_2\text{S}$; $\text{Ag}_2\text{Te}/\text{Ag}_2\text{S}$; $\text{Ag}_2\text{Te}/\text{Ag}_2\text{S}$, $\text{Ag}_2\text{S}/\text{CdS}$, $\text{Ag}_2\text{S}/\text{AgInS}$, $\text{AgS}/\text{CdS}/\text{ZnS}$.

En esta descripción detallada de la invención, se usan algunas referencias ejemplares para fines ilustrativos únicamente de las mismas, y debe entenderse que la invención no está limitada al alcance de estas realizaciones particulares. La terminología usada en el presente documento es con fines descriptivos, y no para limitar el alcance de la invención.

La transfección, como se usa aquí en la presente invención se refiere a un proceso en el que los ácidos nucleicos se suministran a una célula.

25 Método de síntesis general

Todas las reacciones se realizaron en una atmósfera inerte. Típicamente, una sal de plata soluble en agua y 0,25 equimolar de fuente de calcogenuro se disuelven por separado en agua desoxigenada. Las cantidades deseadas de los materiales de revestimiento (revestimiento mixto) se añaden a la solución de plata y el pH de la solución se ajustó al valor deseado usando soluciones de NaOH y CH_3COOH . La solución de calcogenuro se añadió a la mezcla de plata y revestimiento con agitación mecánica vigorosa a 5000 rpm a temperatura ambiente (25°C). Durante la reacción, se tomaron muestras en diferentes zonas de tiempo para seguir el crecimiento de las partículas. Las soluciones de punto cuántico preparadas se lavaron con agua desionizada usando filtros ultra-centrífugos Amicon (corte a 30.000 Da) y se almacenaron en la oscuridad a 4°C . Los ejemplos de sales de plata solubles en agua adecuadas para su uso en la presente invención incluyen, aunque sin limitación, nitrato de plata, acetato de plata, propionato de plata, sulfato de plata, butirato de plata, isobutirato de plata, benzoato de plata, tartrato de plata, salicilato de plata, malonato de plata, succinato de plata y lactato de plata. Los ejemplos de fuentes de calcogenuro adecuadas para su uso en la presente invención incluyen, aunque sin limitación, sulfuro de sodio (Na_2S); seleniuro de sodio (Na_2Se); telururo de sodio (Na_2Te); sulfuro de hidrógeno (H_2S); seleniuro de hidrógeno (H_2Se); telururo de hidrógeno (H_2Te); tioacetamida; tioureas; hidrógeno telururo sódico (NaHTe); hidrógeno seleniuro sódico (NaHSe).

Métodos de caracterización general

Los espectros de absorbancia de los puntos cuánticos de calcogenuro de plata preparados se registraron en el intervalo de 300-1100 nm, y el tamaño de cristal de los PC se calculó a partir del comienzo de la absorción determinado a partir del espectro de absorbancia usando la ecuación de Brus (ecuación 1):

$$\Delta E = \frac{h^2 \pi^2}{8R^2} \left[\frac{1}{m_e} + \frac{1}{m_h} \right] - 1,8 \frac{e^2}{\epsilon_{\text{Ag}_2\text{S}} 4\pi\epsilon_0 R} \quad (1)$$

50 Donde R es el radio del nanocrystal, m_e (0,286 m_0) y m_h (1,096) son las masas efectivas respectivas de electrón y agujero para el núcleo inorgánico y $\epsilon_{\text{Ag}_2\text{S}}$ (5,95) es la constante dieléctrica y ΔE es la diferencia de energía de la banda prohibida entre el semiconductor a granel y el nanocrystal.

Los espectros de fluorescencia de los PC se registraron en un dispositivo casero equipado con un detector de silicio amplificado sensible sobre el intervalo de longitud de onda de 400-1100 nm junto con un amplificador de seguridad. Se usó un láser de onda continua de doble frecuencia Nd: vanadato para excitar las muestras a 532 nm. Se usaron un reflector de oro cóncavo y un monocromador de Czerny-Turner de 0,5 metros para recoger y emitir imágenes. Se usó un filtro de paso largo con una transmisión del 90 % entre 550-1100 nm. Los datos se corrigieron con la respuesta espectral del sistema de detección.

60 El rendimiento cuántico de los PC se calculó de acuerdo con la fórmula proporcionada a continuación $\phi_s = \phi_r (I_s/I_r) (A_r/A_s) (n_s/n_r)$, donde ϕ_s , I_s , A_s y n_s son QY, área de pico de emisión, intensidad de absorción integrada e índice de refracción de los PC, respectivamente, y ϕ_r , I_r , A_r y n_r son los parámetros correspondientes de LDS 790 para tinte

IRC en metanol (rendimiento cuántico presentado como 14 % por el productor). Para los cálculos de QY se prepararon cinco soluciones diferentes de PC y el tinte de referencia a cinco concentraciones diferentes.

El análisis TEM de nanopartículas se realizó usando un Microscopio Electrónico de Transmisión JEOL JEM-ARM200CFEG UHR (JEOL, Japón). El tamaño hidrodinámico y el potencial zeta de las nanopartículas acuosas se midieron con un Nano-ZS Malvern Zetasizer.

Los Puntos Cuánticos se digirieron con una mezcla ácido nítrico al 65 % - ácido sulfúrico al 96 % y se diluyeron a ciertos volúmenes. Las concentraciones de ión Ag^+ en las soluciones se midieron por ICP-OES y se calcularon usando una curva patrón de concentraciones conocidas de ión Ag^+ .

Ensayos *in vitro*

Se cultivaron líneas celulares HeLa en Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero bovino fetal al 10 % (v/v) y antibióticos (Penicilina/Estreptomicina) en una incubadora humidificada con CO_2 al 5 % a 37 °C.

Se cultivaron 50.000 HeLa en placas y se incubaron durante 18 h. Después de la incubación, el medio de cultivo se repuso y las células se incubaron con solución de Punto Cuántico con una concentración de ión Ag^+ de 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 6 horas. Las células se lavaron con PBS (pH 7,2) y se fijaron con 4 % de para-formaldehído durante 15 minutos. Se usó un sistema de microscopio confocal casero equipado con un objetivo de inmersión en aceite de 60x (NA:1,49) y un detector de Si para formar las imágenes de internalización de PC por las células. Brevemente, las células se pusieron sobre la platina del microscopio de exploración láser confocal y salieron a 532 nm mediante láser.

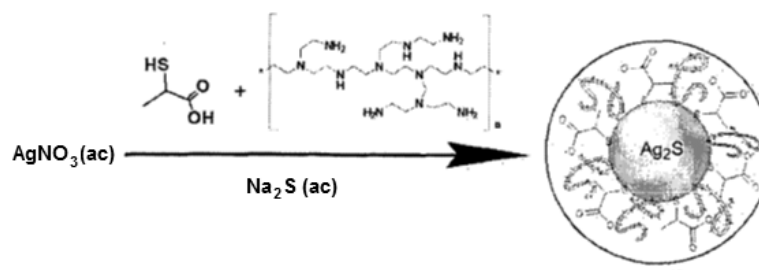
Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la presente invención y no pretenden limitar el alcance de la invención. La Tabla 1 enumera parámetros de reacción para la síntesis de PC de Ag_2S revestido de PEI, PC de Ag_2S revestido de 2MPA, PC de Ag_2S catiónicos con revestimiento mixto a pH 10 y las propiedades de los PC de Ag_2S resultantes. La Tabla 2 enumera las propiedades de puntos los cuánticos catiónicos de sulfuro de plata a diferentes valores de pH.

Ejemplo 1

Método de síntesis general y caracterización de partículas de nanopartículas (Cat- Ag_2S -PC) de sulfuro de plata (Ag_2S) revestidas de polietilenimina (PEI)/ácido 2-mercaptopropiónico

Todas las reacciones se realizaron en una atmósfera inerte. Típicamente, se añadieron PEI y 2-MPA a una solución acuosa de AgNO_3 (0,25 mmol en 75 ml de agua MilliQ desoxigenada) y el pH de la solución se ajustó al valor deseado usando soluciones de NaOH y CH_3COOH (2,5 M). Se añadió una solución de Na_2S (0,0625 mmol en 25 ml de agua desoxigenada) a la solución de PEI/2MPA/ AgNO_3 con agitación mecánica vigorosa a temperatura ambiente (25 °C) (Esquema 1). Se extrajeron muestras de la mezcla de reacción para la evaluación del crecimiento de las partículas a través de un espectrofotómetro y un espectrofluorómetro UV-Vis. Normalmente, el crecimiento de cristales se detiene a los 5 min, por lo tanto, todas las reacciones comparativas se interrumpieron con nitrógeno líquido (después de 5 minutos de crecimiento de cristal, se lavaron con agua desionizada usando filtros ultracentrífugos Amicon (corte a 30.000 Da) y se almacenaron en la oscuridad a 4 °C.



Esquema 1 Síntesis acuosa de Ag_2S PCIRC revestidos de PEI y 2-MPA

Los Cat- Ag_2S -PC preparados tienen PEI y 2-MPA como material de revestimiento sobre la superficie. La relación entre PEI y 2-MPA se estudió para obtener nanopartículas estables con una alta eficiencia cuántica. La relación PEI a 2-MPA se cambió a 100/0, 90/10, 80/20, 60/40, 0/100 (Tabla 1). La Figura 1 es el gráfico de absorbancia normalizada de los Cat- Ag_2S -PC preparados. Como se representa en la figura, las mejores relaciones PEI/2-MPA son 60/40 y 80/20.

A las relaciones de PEI/2-MPA de 60/40 y 80/20, las reacciones se llevaron a cabo también a pH 5,5, 7,5, 9 y 11. La mejor luminiscencia se obtuvo a pH 10 con una composición de PEI/2-MPA 60/40 y pH 9 para PEI/2MPA 80/20 (Figura 2). Además, los picos de emisión con PEI/2-MPA 60/40 de los Cat-Ag₂S-PC tienen dos máximos de emisión y tienen una escasa estabilidad coloidal a valores de pH por debajo de 9. Sin embargo, los Cat-Ag₂S-PC con PEI/2MPA 80/20 son estables y tienen una fuerte emisión.

Las propiedades de los Cat-Ag₂S-PC con revestimiento binario como se describe en el presente documento también están influidas por el pH del medio. La Tabla 2 muestra los cambios en las propiedades de partícula de los Cat-Ag₂S-PC sintetizados con la relación PEI/2MPA de 80/20 a pH 9 y a temperatura ambiente con el pH después de la síntesis y purificación. A pH 7,4, el rendimiento cuántico es el doble en comparación con pH 9 y alcanzó el 166 % a pH 5,5.

Las imágenes TEM de las partículas revelan partículas principalmente esféricas con tamaños de aproximadamente 2-4 nm (Figura 3).

Tabla 1 Efecto de las relaciones PEI/2-MPA sobre las propiedades de Cat-Ag₂S-PC

PEI (%)	2-MPA (%)	pH de la reacción	$\lambda_{\text{abs(corte)}}$ ^a (nm)	Tamaño ^b (nm)	Banda prohibida (eV)	$\lambda_{\text{em (máx)}}$ (nm)	FWHM, nm	Dh ^c (nm)	Pot. Zeta (mV)
100	0	10	906	2,94	1,37	-	-	4,0	51
90	10	10	674	2,23	1,48	838	175	2,9	34
80	20	10	761	2,48	1,63	819	173	3,5	28
60	40	10	777	2,52	1,60	817	168	3,8	36
0	100	7,5	806	2,61	1,54	837	128	7,10	-62

^aComienzo de absorbancia. ^bCalculado mediante la ecuación de Brus. ^cDiámetro hidrodinámico medido por DLS a pH 7,4 y presentado como el promedio en número.

Tabla 2 Influencia del pH sobre las propiedades de Ag₂S-PEI/2MPA Cat-Ag₂S-PC*

pH	$\lambda_{\text{abs(corte)}}$ ^a (nm)	Tamaño ^b (nm)	Banda prohibida (eV)	$\lambda_{\text{em (máx)}}$ (nm)	FWHM, nm	Dh ^c (nm)	Pot. Zeta (mV)	QY (%)
5,5	783	2,54	1,59	812	151	9,4	63	166
7,4	783	2,54	1,59	828	150	8,9	60	150
9,0	783	2,54	1,59	825	170	8,0	32	77

^aComienzo de absorbancia. ^bCalculado mediante la ecuación de Brus. ^cDiámetro hidrodinámico medido por DLS y presentado como el promedio en número. ^dRendimiento cuántico calculado con respecto a un tinte LDS 798 del IR cercano (Ag:S = 4, Ag:PEI = 1:4, Ag:2-MPA = 1:1, Temp = TA, pH de reacción = 9, 5 min reacción). *Se usaron puntos cuánticos de Ag₂S sintetizados con 80 % PEI, 20 % 2-MPA a pH 9,0.

Ejemplo 2

Método de síntesis de nanopartículas de sulfuro de plata (Ag₂S) revestidas de polietilenimina (PEI)/ácido 2-mercaptopropiónico con una relación molar 60/40 de PEI/ácido 2-mercaptopropiónico:

Se añadieron $2,14 \times 10^{-3}$ mmol de PEI (0,75 mmol de -NH₂) y 0,5 mmol de 2-MPA (0,5 mmol de -SH) a una solución acuosa de AgNO₃ (0,25 mmol en 75 ml de agua MilliQ desoxigenada) y el pH de la solución se ajustó a 10. Se añadió una solución de Na₂S (0,0625 mmol en 25 ml de agua desoxigenada) a la solución de PEI/2MPA/AgNO₃ con agitación mecánica vigorosa a temperatura ambiente (25 °C) (Se extrajeron muestras de la mezcla de reacción para la evaluación del crecimiento de las partículas mediante un espectrofotómetro y espectrofluorómetro UV-Vis). Los PC se lavaron con agua desionizada usando filtros ultra-centrífugos Amicon (corte a 30.000 Da) y se almacenaron en la oscuridad a 4 °C.

Ejemplo 3

Método de síntesis de nanopartículas de sulfuro de plata (Ag₂S) revestidas de polietilenimina (PEI)/ácido 2-mercaptopropiónico con una relación molar 80/20 de PEI/ácido 2-mercaptopropiónico:

Se añadieron $2,856 \times 10^{-3}$ mmol de PEI (1 mmol de -NH₂) y 0,25 mmol de 2-MPA (0,25 mmol de -SH) a una solución acuosa de AgNO₃ (0,25 mmol en 75 ml de agua MilliQ desoxigenada) y el pH de la solución se ajustó a 9. Se añadió una solución de Na₂S (0,0625 mmol en 25 ml de agua desoxigenada) a la solución de PEI/2MPA/AgNO₃ con agitación mecánica vigorosa a temperatura ambiente (25 °C) (Se extrajeron muestras de la mezcla de reacción para la evaluación del crecimiento de las partículas mediante un espectrofotómetro y espectrofluorómetro UV-Vis). Los PC se lavaron con agua desionizada usando filtros ultra-centrífugos Amicon (corte a 30.000 Da) y se almacenaron en la oscuridad a 4 °C.

Ejemplo 4

Estudios de internalización de células *in vitro* para nanopartículas de sulfuro de plata (Ag₂S) revestidas de polietilenimina (PEI)/ácido 2-mercaptopropiónico.

Se usaron puntos cuánticos de Ag_2S sintetizados con una relación molar 80/20 de PEI/2MPA como se ha descrito en el ejemplo 3 para la internalización de células *in vitro* y la formación de imágenes ópticas de los PC en las células. Brevemente, se cultivaron 50.000 HeLa y se cultivaron durante 18 h. Después de la incubación, el medio de cultivo se repuso y las células se incubaron con solución de Punto Cuántico con una concentración de ión Ag^+ de 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 6 horas. Las células se lavaron con PBS (pH 7,2) y se fijaron con 4 % de para-formaldehído durante 15 minutos. Se usó un sistema de microscopio confocal casero equipado con un objetivo de inmersión de aceite de 60x (NA:1,49) y un detector de Si para formar imágenes de internalización de PC por las células. Brevemente, tanto las células tratadas con PC como las no tratadas se pusieron en la platina del microscopio de exploración láser confocal y salieron a 532 nm mediante láser. Se detectó una emisión significativa de las células tratadas con PC, sin embargo, no se detectó emisión ni autofluorescencia de las células no tratadas en una escala igual de intensidad de emisión. El estudio prueba la captación eficiente de los PC y la efectividad de la emisión IRC en el IRC en formación de imágenes de células sin la complicación debida a la autofluorescencia de las células (Figura 4).

Ejemplo 5

Ensayos de citotoxicidad para nanopartículas de sulfuro de plata (Ag_2S) revestidas de polietilenimina (PEI)/ácido 2-mercaptopropiónico

Para la evaluación de la citotoxicidad se cultivaron células HeLa en placas de 96 pocillos en medio completo a 37 °C y 5 % CO_2 durante 24 h. En el segundo día, el medio se repuso y los Puntos Cuánticos se añadieron al medio de cultivo a concentraciones de 1-25 $\mu\text{g Ag}^+/\text{ml}$ y se incubaron durante otras 24 h. En el tercer día, las células se lavaron con PBS. Se añadió una solución de MTT (bromuro de tiazolil azul tetrazolio (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) a las células y se incubó durante 4 h. Se disolvió formazano púrpura con DMSO:Etanol (1:1) mediante agitación suave durante 15 min. La absorbancia del formazano se midió a 600 nm con una referencia a 630 nm en un lector de microplacas. Se midió también la absorbancia de Punto Cuántico en medio completo y se restó de la solución de MTT para la corrección. La citocompatibilidad de Puntos Cuánticos de Ag_2S revestidos de 100 % polietilenimina, revestidos de 100 % ácido 2-mercaptopropiónico y revestidos de PEI/2MPA 80/20 se ensayó en células HeLa a concentraciones de 1-25 $\mu\text{g Ag}^+/\text{ml}$ (Figura 5). Se midió también la toxicidad del ión Ag^+ libre y de PEI, para comparación. En este intervalo de concentración, el Ag^+ libre no provoca ninguna muerte celular significativa, lo que es ventajoso en comparación con cadmio, mercurio y plomo. Los resultados pueden resumirse como sigue: los PC de Ag_2S revestidos con 100 % de 2MPA no son tóxicos; la polietilenimina es altamente tóxica, incluso a un nivel de 2,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PEI; pero la citotoxicidad de la polietilenimina disminuye drásticamente cuando esta se une a la superficie de Ag_2S ; tanto Ag_2S con 100 % PEI como PEI/2MPA 80/20 no mostraron una caída significativa en la viabilidad celular.

REIVINDICACIONES

1. Un punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata que emite en el IR cercano con un revestimiento mixto donde el calcogenuro de plata se selecciona de un grupo que comprende sulfuro de plata (Ag_2S), seleniuro de plata (Ag_2Se), telururo de plata (Ag_2Te) y mezclas de los mismos, y el revestimiento mixto comprende al menos 2 tipos de materiales ambos capaces de unirse a la superficie del calcogenuro de plata, y siendo uno una macromolécula seleccionada de un grupo de polímeros que comprenden polietilenimina, poli(dimetilaminoetil metacrilato), un dendrímero de poli(amido amina) (PAMAM), dendrímeros con grupos terminales amina y quitosano, y siendo el otro una molécula pequeña seleccionada de un grupo de moléculas pequeñas que comprende tiolatos, carboxilatos y aminas.
2. El punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata que emite en el IR cercano con el revestimiento mixto como se ha descrito en la reivindicación 1 donde el calcogenuro de plata se selecciona para que sea sulfuro de plata (Ag_2S).
3. El punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata que emite en el IR cercano con el revestimiento mixto como se ha descrito en la reivindicación 1 donde uno del material de revestimiento se selecciona para que sea polietilenimina y el otro para que sea una molécula pequeña seleccionada de un grupo de moléculas pequeñas que comprende tiolatos, carboxilatos y aminas.
4. El punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata que emite en el IR cercano con el revestimiento mixto como se ha descrito en la reivindicación 1 donde uno del material de revestimiento es una macromolécula seleccionada del grupo de polímeros que comprende polietilenimina, poli(dimetilaminoetil metacrilato), dendrímeros de poli(amido amina) (PAMAM), dendrímeros con grupos terminales amina y quitosano, y el otro se selecciona para que sea una molécula pequeña tiolada y, preferentemente, sea un ácido propiónico y, más preferentemente, sea ácido 2-mercaptopropiónico.
5. El punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata que emite en el IR cercano con el revestimiento mixto como se ha descrito en la reivindicación 1 donde el calcogenuro de plata se selecciona para que sea sulfuro de plata (As_2S_3), comprendiendo el revestimiento mixto al menos 2 tipos de materiales uno de los cuales se selecciona para que sea polietilenimina y el otro se selecciona para que sea una molécula pequeña tiolada y, preferentemente, sea un ácido propiónico y, más preferentemente, sea ácido 2-mercaptopropiónico.
6. El punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata que emite en el IR cercano con el revestimiento mixto como se ha descrito en la reivindicación 5 donde el calcogenuro de plata se selecciona para que sea sulfuro de plata (As_2S_3), uno del material de revestimiento se selecciona para que sea polietilenimina, preferentemente polietilenimina ramificada de 25 kDa, y el otro material de revestimiento se selecciona para que sea ácido 2-mercaptopropiónico y el punto cuántico se caracteriza por que la relación molar de polietilenimina (PEI) a ácido 2-mercaptopropiónico usada en la síntesis que varía entre 60/40 y 80/20.
7. El punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata que emite en el IR cercano de acuerdo con la reivindicación 6 donde el punto cuántico se caracteriza además por que la relación molar de la fuente de catión plata al material de revestimiento total usada en la síntesis es 1/5.
8. El punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata que emite en el IR cercano de acuerdo con las reivindicaciones 6-7 donde el punto cuántico se caracteriza además por que la relación molar de la fuente de catión plata a la fuente de sulfuro usada en la síntesis es 4.
9. El punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata que emite en el IR cercano de acuerdo con la reivindicación 5 donde el calcogenuro de plata se selecciona para que sea sulfuro de plata (Ag_2S), uno del material de revestimiento se selecciona para que sea polietilenimina, preferentemente polietilenimina ramificada de 25 kDa, y el otro material de revestimiento se selecciona para que sea ácido 2-mercaptopropiónico, y el punto cuántico se caracteriza por que:
 - i. la relación molar de polietilenimina (PEI) a ácido 2-mercaptopropiónico usada en la síntesis es 80/20
 - ii. la relación molar de la fuente de catión plata al material de revestimiento total usada en la síntesis es 1/5 y
 - iii. la relación molar de la fuente de catión plata a la fuente de sulfuro usada en la síntesis es 4.
10. Un método para sintetizar un punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata que emite en el IR cercano con un revestimiento mixto donde el calcogenuro de plata se selecciona de un grupo que comprende sulfuro de plata (Ag_2S), seleniuro de plata (Ag_2Se), telururo de plata (Ag_2Te) y mezclas de los mismos, y el revestimiento mixto comprende al menos 2 tipos de materiales ambos capaces de unirse a la superficie del calcogenuro de plata y siendo uno una macromolécula seleccionada de un grupo de polímeros que comprenden polietilenimina, poli(dimetilaminoetil metacrilato), un dendrímero de poli(amido amina) (PAMAM), dendrímeros con grupos terminales amina y quitosano, y siendo el otro una molécula pequeña seleccionada de un grupo de moléculas pequeñas que comprende tiolatos, carboxilatos y aminas, y el método se caracteriza como un método de una sola etapa, homogéneo, acuoso, que tiene lugar a temperatura ambiente.

11. Un método para sintetizar un punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata que emite en el IR cercano como se ha descrito en la reivindicación 10 que comprende las etapas de

- i. hacer reaccionar una sal de plata soluble en agua y una fuente de calcogenuro soluble en agua en un medio acuoso en presencia de los materiales de revestimiento a temperatura ambiente, a un pH que varía de 5-11 en atmósfera inerte y
- ii. agitar la mezcla para el crecimiento del cristal y
- iii. posteriormente, lavar el punto cuántico resultante con agua

12. El método para sintetizar el punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata como se ha descrito en las reivindicaciones 10-11 donde el calcogenuro de plata se selecciona para que sea sulfuro de plata (Ag_2S).

13. El método para sintetizar el punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata como se ha descrito en las reivindicaciones 10-11 donde uno del material de revestimiento se selecciona para que sea polietilenimina, y el otro sea una molécula pequeña seleccionada de un grupo de moléculas pequeñas que comprende tiolatos, carboxilatos y aminas.

14. El método para sintetizar el punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata como se ha descrito en las reivindicaciones 10-11 donde uno del material de revestimiento es una macromolécula seleccionada de un grupo de polímeros que comprenden polietilenimina, poli(dimetilaminoetil metacrilato), dendrímeros de poli(amido amina) (PAMAM), dendrímeros con grupos terminales amina y quitosano, y el otro se selecciona para que sea una molécula pequeña tiolada y, preferentemente, sea un ácido propiónico y, más preferentemente, sea ácido 2-mercaptopropiónico.

15. El método para sintetizar el punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata como se ha descrito en las reivindicaciones 10-11 donde el calcogenuro de plata se selecciona para que sea sulfuro de plata (Ag_2S), comprendiendo el revestimiento mixto al menos 2 tipos de materiales, uno de los cuales se selecciona para que sea polietilenimina y el otro se selecciona para que sea una molécula pequeña tiolada y, preferentemente, sea un ácido propiónico y, más preferentemente, sea ácido 2-mercaptopropiónico.

16. El método para sintetizar el punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata como se ha descrito en la reivindicación 15, donde el calcogenuro de plata se selecciona para que sea sulfuro de plata (Ag_2S), uno del material de revestimiento se selecciona para que sea polietilenimina, preferentemente polietilenimina ramificada de 25 kDa, y el otro material de revestimiento se selecciona para que sea ácido 2-mercaptopropiónico, y el método se caracteriza por que la relación molar usada de polietilenimina (PEI) a ácido 2-mercaptopropiónico se selecciona para que esté entre 60/40 y 80/20.

17. El método para sintetizar el punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata como se ha descrito en la reivindicación 16, donde el calcogenuro de plata se selecciona para que sea sulfuro de plata (Ag_2S), uno del material de revestimiento se selecciona para que sea polietilenimina, preferentemente polietilenimina ramificada de 25 kDa, y el otro material de revestimiento se selecciona para que sea ácido 2-mercaptopropiónico, y el método se caracteriza por que la relación molar usada de fuente de catión plata a material de revestimiento total es 1/5.

18. El método para sintetizar el punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata como se ha descrito en las reivindicaciones 16-17, donde el calcogenuro de plata se selecciona para que sea sulfuro de plata (Ag_2S), uno del material de revestimiento se selecciona para que sea polietilenimina, preferentemente polietilenimina ramificada de 25 kDa, y el otro material de revestimiento se selecciona para que sea ácido 2-mercaptopropiónico, y el método se caracteriza por que la relación molar usada de fuente de catión plata a fuente de sulfuro es 4.

19. El método para sintetizar el punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata como se ha descrito en la reivindicación 15, donde el calcogenuro de plata se selecciona para que sea sulfuro de plata (Ag_2S), uno del material de revestimiento se selecciona para que sea polietilenimina, preferentemente polietilenimina ramificada de 25 kDa, y el otro material de revestimiento se selecciona para que sea ácido 2-mercaptopropiónico y el método se caracteriza como sigue:

- i. la relación molar usada de polietilenimina (PEI) a ácido 2-mercaptopropiónico es 80/20
- ii. la relación molar de fuente de catión plata a material de revestimiento total es 1/5
- iii. la relación molar usada de fuente de catión plata a fuente de sulfuro es 4 y
- iv. el pH de la mezcla de reacción se ajusta a un valor entre 5,5-11,0.

20. Uso del punto cuántico catiónico de calcogenuro de plata que emite en el IR cercano como se ha descrito en las reivindicaciones anteriores en detectores, células solares sensibilizadas con punto cuántico, etiquetado fluorescente y aplicaciones médicas tales como formación de imágenes médicas incluyendo la detección y marcado de tumores, terapia incluyendo suministro de fármacos y transfección.

Figura 1.

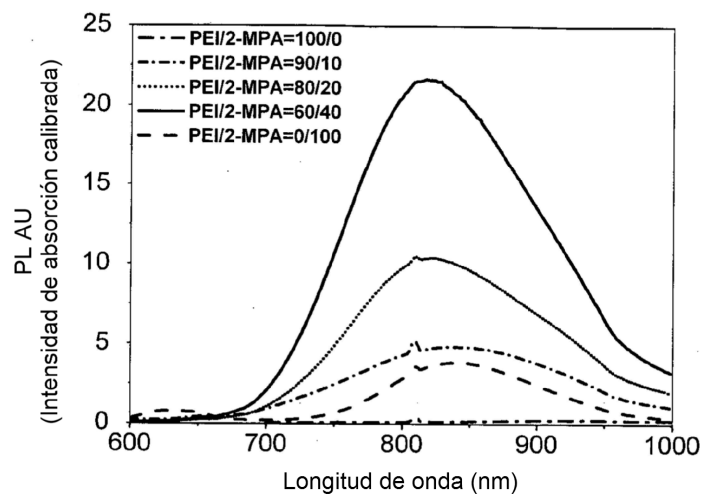


Figura 2.

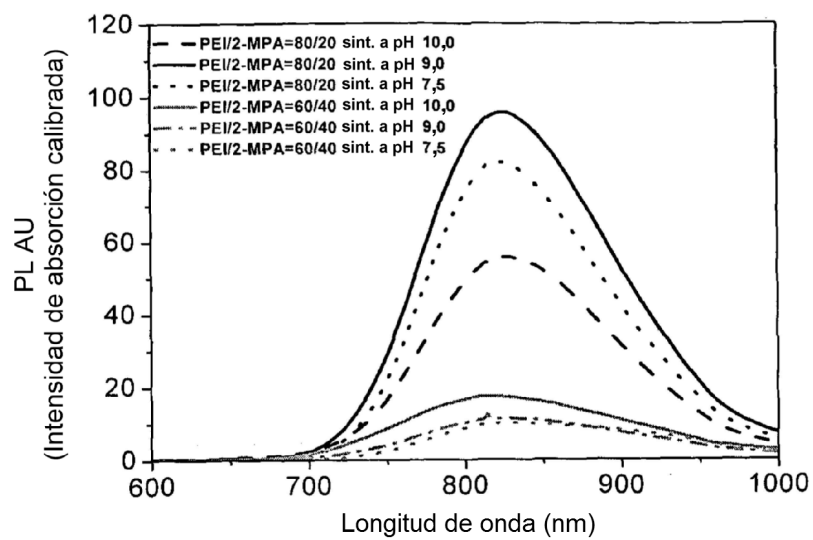


Figura 3.

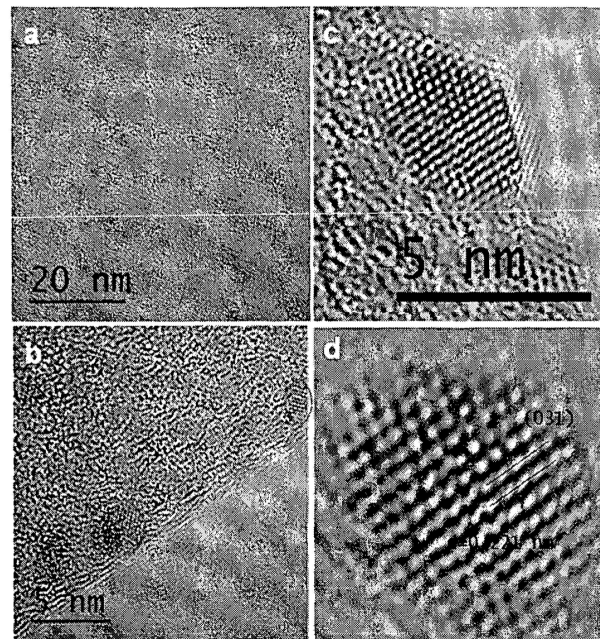


Figura 4.

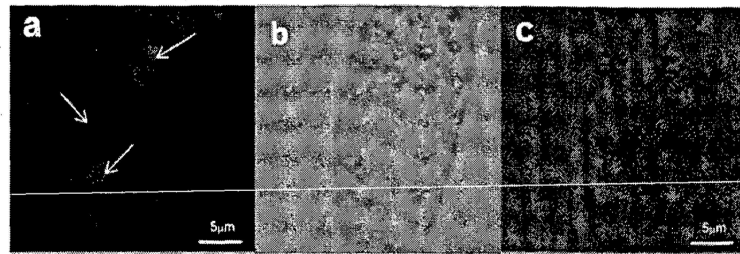


Figura 5.

