

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 649**

51 Int. Cl.:

A61K 49/18 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

B82Y 15/00 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2011 PCT/EP2011/056972**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2011 WO11135101**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2011 E 11716589 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 2563408**

54 Título: **Nanopartículas ultrafinas con matriz de poliorganosiloxano funcionalizada y que incluye complejos metálicos; su procedimiento de obtención y sus aplicaciones en formación de imágenes médicas**

30 Prioridad:

30.04.2010 FR 1053389

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

18.11.2019

73 Titular/es:

**NANO H (33.3%)
2 place de l'Europe Bâtiment A Parc d'activités
GVIO
38070 Saint Quentin Fallavier, FR;
UNIVERSITÉ LYON 1 CLAUDE BERNARD (33.3%)
y
INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES
APPLIQUÉES DE LYON (33.3%)**

72 Inventor/es:

**LUX, FRANÇOIS;
TILLEMENT, OLIVIER;
SAINT JEAN, MAXIME;
MOWAT, PIERRE;
PERRIAT, PASCAL;
ROUX, STÉPHANE y
MIGNOT, ANNA**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 731 649 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 ultrafinas con matriz de poliorganosiloxano funcionalizada y que incluye complejos metálicos; su procedimiento de obtención y sus aplicaciones en formación de imágenes médicas

5

Sector de la técnica

La presente divulgación se refiere a nuevas nanopartículas híbridas biocompatibles de tamaño muy pequeño, útiles en concreto para el diagnóstico y/o la terapia.

10

Contempla su procedimiento de obtención y sus aplicaciones.

En el campo del diagnóstico, puede tratarse de sondas para el marcaje biológico dotado de propiedades magnéticas, fluorescentes o radioactivas, agentes de contraste para la formación de imágenes por resonancia magnética IRM, para la formación de imágenes por escintigrafía SPECT (tomografía computarizada por emisión de fotón único), para la formación de imágenes por escintigrafía PET (tomografía por emisión de positrones) para la formación de imágenes por fluorescencia, para la formación de imágenes ópticas, para la formación imágenes por rayos X o para formación de imágenes multimodales.

15

En el campo terapéutico, los usos previstos son los de agentes radiosensibilizadores o radioactivos para la radioterapia (p. ej., curieterapia), para la neutrón-terapia, agentes para PDT (terapia fotodinámica), agentes de vectorización de moléculas con efecto terapéutico o agentes de marcaje celular.

20

En los dos campos mencionados anteriormente, las nanopartículas en cuestión pueden ser agentes de direccionamiento de sitios terapéuticos o de diagnóstico *in vivo*.

25

Estado de la técnica

Los prerequisites para las nanopartículas aplicadas al diagnóstico y/o a la terapia son, entre otros:

30

- una alta concentración de agentes activos (para la detección de una señal como agente de contraste para el diagnóstico y/o para la acción terapéutica),
- una buena rigidez molecular apreciable para una buena vectorización y/o en formación de IRM,
- una muy buena estabilidad coloidal en un medio biológico,
- una excelente biocompatibilidad,
- una accesibilidad (es decir, facilidad de acceso a la zona de interés) y una eficiencia cada vez mayor para el direccionamiento terapéutico, en particular con respecto a los tumores,
- una buena eliminación renal *in vivo*,
- una biodistribución *in vivo* favorable y adaptada (sin retención de las nanopartículas por los órganos o retención preferencial en los órganos diana).

35

40

La IRM es una de las técnicas más utilizadas para el diagnóstico médico, ya que combina las ventajas de ser no invasiva, rápida y segura para el paciente. Se basa en la observación de la relajación de los protones del agua que depende directamente de los campos magnéticos (el campo magnético importante B_0 y los campos de radiofrecuencia), de la secuencia de impulsos, del entorno del agua en el organismo. La interpretación de las imágenes da acceso a la identificación de la mayoría de los tejidos. El contraste puede aumentarse mediante dos tipos de agentes: agentes de contraste positivos T_1 y negativos T_2 .

45

En el contexto de la invención, se presta especial atención a estos agentes de contraste positivos, es decir, en T_1 , que permiten un aclaramiento de la imagen ya que el contacto del agua con el agente de contraste permite reducir el tiempo de relajación longitudinal: T_1 . Como ejemplos de agentes de contraste T_1 utilizados en clínica, se puede citar: Gd(III)DTPA o Gd(III)DOTA.

50

Los agentes de contraste en T_2 son aquellos que permiten reducir el tiempo de relajación transversal. Las nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas encapsuladas son ejemplos de agentes T_2 utilizados en clínica.

55

Los agentes de contraste en T_1 son preferibles con los agentes de contraste en T_2 , debido al contraste positivo que proporcionan. Desafortunadamente, la no especificidad, el bajo contraste que causan, su rápida excreción renal y sus propiedades dependientes del campo restringen aún más su aplicación. Además, una concentración local de iones gadolinio que a menudo es baja hace que sea difícil la detección de anomalías médicas de un tamaño inferior a unos pocos centímetros de tamaño. Por ende, sería deseable poder emplear un direccionamiento del sitio específico *in vivo* utilizando elementos cargados de gadolinio. En este sentido, los nanoobjetos presentan varias ventajas: concentración local de Gd más elevada y mayor relaxividad (r_1) con gadolinio debido a la mayor masa y rigidez de las nanopartículas. Más allá de la mejora del contraste, también se busca limitar la concentración de agentes de contraste en el cuerpo humano.

60

Todos estos aspectos atenúan la utilidad de los compuestos moleculares (los agentes T_1 comerciales presentados anteriormente son de hecho agentes moleculares, este no es el caso de los agentes T_2 , pero estos son menos interesantes como consecuencia del contraste negativo que proporcionan) como agentes de contraste.

65

Un enfoque multimodal se lleva a cabo para estas partículas. Este enfoque consiste en emplear un conjunto de nanopartículas que comprenden varios agentes de contraste moleculares. Permite combinar no solo diferentes técnicas de formación de imágenes, sino también diferentes técnicas de terapia al reagrupar varios agentes activos en terapia en un mismo conjunto de nanopartículas. Los agentes activos en formación de imágenes y los agentes activos en terapia pueden ser idénticos o diferentes entre sí.

Este enfoque parece ser particularmente adecuado para el desarrollo de medicamentos en teranóstica. Se puede añadir en concreto otras funciones de formación de imágenes (luminiscencia, escintigrafía ...), funciones terapéuticas (liberación de principios activos, radiosensibilización, curieterapia...), así como funciones de direccionamiento biológico para una concentración de agentes terapéuticos en la zona de interés.

Los compuestos moleculares, debido a su pequeño tamaño, no permiten en general combinar varios agentes activos, es decir, varias propiedades en un mismo conjunto (falta de espacio en un compuesto molecular).

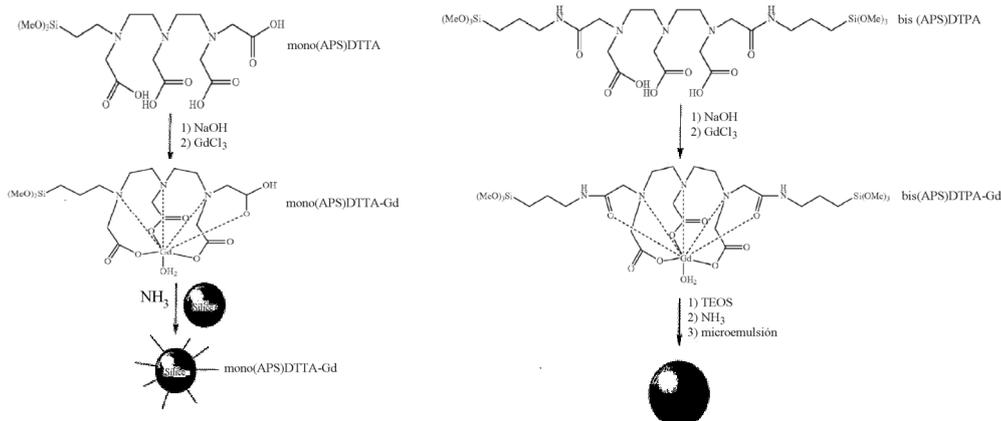
El documento FR-2867180-B1 describe nanopartículas, sondas híbridas para el marcaje biológico (fluorescencia-luminiscencia-radioactividad), para la detección (reconocimiento) o el seguimiento de sustancias específicas, denominadas dianas. Dichas sondas se utilizan particularmente para la citometría de flujo, histología, ensayos inmunológicos o microscopía de fluorescencia, tanto para el estudio de materiales biológicos como de materiales no biológicos. Las nanopartículas de acuerdo con el documento FR-2867180-B1 tienen una estructura núcleo/coraza (*core/shell*) cuyo núcleo está compuesto de al menos 90 % en peso, de Gd_2O_3 , es decir, de un óxido de tierras raras opcionalmente dopado con una tierra rara o un actínido, y cuya coraza es un recubrimiento constituido principalmente por polisiloxano obtenido por hidrólisis/condensación sol/gel de aminopropiltriethoxisilano (APTES) y tetraetoxisilano (TEOS) en presencia de trietilamina. El diámetro de esta estructura núcleo/coraza es por ejemplo de 8,5; 11,5 o 9,2 nm. La coraza de poliorganosiloxano (POS) puede estar funcionalizada, es decir, injertada con un colorante marcador (fluoresceína) o un ligando biológico como un ácido nucleico.

El documento FR-2922106-A1 describe el uso de nanopartículas híbridas radiosensibilizadoras, con una alta concentración de óxidos de lantánido, como radiosensibilizadoras que actúan en combinación con la radiación para inducir una respuesta más eficaz y aumentar la eficacia terapéutica. Estas nanopartículas tienen una estructura núcleo/coraza cuyo núcleo (diámetro, p. ej., 1,5 nm) está compuesto por Gd_2O_3 (opcionalmente combinado en una mezcla 50/50 con óxido de holmio), y cuya coraza es un recubrimiento constituido principalmente por polisiloxano obtenido por hidrólisis/condensación sol/gel de aminopropiltriethoxisilano (APTES) y tetraetoxisilano (TEOS) en presencia de trietilamina. El diámetro de esta estructura de núcleo/coraza es por ejemplo de 2,7 nm. La coraza POS se funcionaliza a continuación, es decir, se injerta ya sea por medio de un poliol como polietilenglicol, o por medio de un agente quelante, p. ej., ácido dietilentriamina pentaacético (DTPA). Este tipo de nanopartícula núcleo/coraza funcionalizada tiene por ejemplo un diámetro total de 11,7 nm.

El documento FR-2930890-A1 desvela nuevos agentes de radioterapia diana o curieterapia (radionucleidos) constituidos por nanopartículas con una alta concentración de óxido u oxohidróxido de tierras raras radiactivas. Estas nanopartículas son por ejemplo nanopartículas constituidas por un núcleo de óxido de holmio recubierto con polisiloxano funcionalizado. El núcleo se obtiene por disolución de sales de cloruro de holmio en dietilenglicol. El tamaño de este núcleo es de aproximadamente 1,5 nm. La capa de polisiloxano funcionalizado con un espesor de 0,5 nm se sintetiza por vía sol-gel, a partir principalmente de APTES y TEOS. Las partículas así recubiertas se funcionalizan luego con PEG250 o con ácido dietilentriaminopentaacético dianhídrido (DTPABA). La suspensión así preparada se liofiliza. Los tamaños hidrodinámicos son para el núcleo: 1,5 nm; después del recubrimiento: 3,1 nm y después de la funcionalización con DTPABA: 3,6 nm; después de la liofilización: 4,0 nm.

Las nanopartículas de acuerdo con estos tres documentos FR-2867180-B1, FR-2922106-A1 y FR-2930890-A1 tienen en concreto un interés particular, su coraza de polisiloxano que mejora su biocompatibilidad. Su pequeño tamaño también es una virtud en términos de eliminación renal (depuración) y biodistribución *in vivo*. Sin embargo, el elemento activo como agente de contraste T1 en IRM en estas nanopartículas, a saber por ejemplo el gadolinio presente en el centro del núcleo de óxido de lantánido, es considerablemente menos accesible por el agua que el de la superficie o el que sería complejado por DTPA o DOTA en el interior o sobre la superficie de la capa de polisiloxano. Esto da como resultado una menor eficacia del objeto por átomo de gadolinio para estas nanopartículas de tipo núcleo/coraza. Además, si es posible lograr diámetros de menos de 10 nm para estas nanopartículas con núcleo de óxido de gadolinio, por ejemplo, esto se lleva a cabo reduciendo el tamaño de la capa externa de polisiloxano. Esto puede dar como resultado problemas de disolución del núcleo debido a la protección más débil proporcionada por una capa reducida de polisiloxano. Esto conlleva riesgos de toxicidad relacionados con concentraciones locales elevadas de gadolinio.

El documento WO2007124131-A desvela nanopartículas híbridas útiles como agentes multimodales de contraste en formación de imágenes en concreto IRM. Estas nanopartículas híbridas comprenden una matriz polimérica inorgánica a base de sílice (u orgánica: poliacrilato-polilactida) y una pluralidad de complejos de coordinación que incluyen cada uno un grupo quelante funcionalizado (DTTA-DTPA-DOTA), un ion metálico paramagnético (lantánido/actínido), Gd-Mn), un luminóforo (fluoresceína). El radical de funcionalización es por ejemplo un aminopropil-(trimetoxisililo).



Las nanopartículas de sílice obtenidas de este modo tienen un diámetro del orden de 40 nm. Estas nanopartículas no tienen una estructura núcleo/coraza y, por lo tanto, a priori, no tienen los inconvenientes asociados. Sin embargo, su tamaño de varias decenas de nanómetros es un serio obstáculo en términos de eliminación *in vivo*.

Roux *et al* (Imaging Med 2010 2(2), 211-223) divulgan nanopartículas compuestas de un núcleo de óxido de gadolinio recubierto con una coraza de polisiloxano cuyo espesor está comprendido entre 2 y 18 nm.

Faure *et al* (Nanotechnology 2008, vol. 19, n.º 48, página 485103) también divulgan nanopartículas núcleo-coraza funcionalizadas con estreptavidina.

Söderlind *et al* (Nanotechnology 2008, vol. 19, n.º 8 página 85608) divulgan nanopartículas de GdFeO₃ de tamaño comprendido entre 3,5 y 5 nm.

Barbillon *et al* (Nanotechnology 2008, vol. 19, n.º 3, página 35705) divulgan nanopartículas luminiscentes que incluyen un núcleo de Gd₂O₃ y una coraza o cubierta de polisiloxano funcionalizada con estreptavidina.

Louis *et al* (Chemistry of Materials, 2005, vol. 17, n.º 7 página 1673-1682) se refieren a nanopartículas de estructura núcleo/coraza doblemente luminiscentes para la detección biológica.

Bridot *et al* (Journal of Materials Chemistry, 2009, vol. 19, n.º 16, página 2328, Journal of American Chemical Society, 2007, vol. 129, n.º 16, páginas 5076-5084) divulgan nuevamente nanopartículas núcleo Gd₂O₃/coraza polisiloxano.

El documento WO2005/061009 describe micropartículas de PMMA (ácido polimetilmetacrílico) en cuya superficie se pueden injertar moléculas portadoras como dendrímeros que contienen funcionalidades aminas.

Koole *et al* (Nanobiotechnology, 2009, vol. 1 (5), páginas 475-491) divulgan agentes de contraste multimodales que pueden tener una estructura núcleo/coraza o formados por una heteroestructura.

Voisin *et al* (2007) describen nanopartículas de SiO₂ y nanopartículas de alúmina modificadas por un aminoácido, para unir complejos Gd³⁺-DTPA a sus superficies.

La técnica anterior no divulga nanopartículas que combinan un tamaño muy pequeño, por ejemplo, inferior a 20 nm, y una alta tasa de carga en el agente de contraste, p. ej., T1 para IRM (gadolinio).

El tamaño muy pequeño de las nanopartículas es esencial para obtener *in vivo* una buena eliminación renal y una biodistribución adecuada.

La tasa de carga elevada en complejos magnéticos combinada con el tamaño y la rigidez del objeto permite obtener un r₁ por objeto y por átomo de gadolinio considerable (superior al del ion libre y aún más de los compuestos moleculares) lo que se requiere tener en formación de imágenes (p. ej., IRM) un fuerte incremento y una respuesta correcta a altas frecuencias.

Objeto de la invención

La invención se define en las reivindicaciones.

La presente divulgación tiene por objeto cumplir al menos uno de los siguientes objetivos:

(i) proporcionar nuevas nanopartículas que sean útiles especialmente como agentes de contraste en formación

de imágenes (p. ej., IRM) y/o en otras técnicas de diagnóstico y/o como agentes de terapia, y que sean más eficientes que las nanopartículas del mismo tipo conocidas;

5 (ii) proponer nuevas nanopartículas a base de polímeros silícicos, metales (p. ej., tierras raras) y agentes quelantes, que sean útiles especialmente como agentes de contraste en formación de imágenes (p. ej., IRM) y/o en otras técnicas de diagnóstico y/o como agentes de terapia, y que combinen un tamaño pequeño (por ejemplo inferior a 20 nm) y una alta tasa de carga de metales (p. ej., tierras raras), en particular para tener en formación de imágenes (p. ej., IRM) un fuerte incremento (vinculado por ejemplo a una fuerte relaxividad r_1) y una respuesta correcta (mayor relaxividad) a altas frecuencias;

10 (iii) proponer nuevas nanopartículas a base de polímeros silícicos, metales (p. ej., tierras raras) y agentes quelantes, que sean útiles especialmente como agentes de contraste en formación de imágenes (p. ej., IRM) y/o en otras técnicas de diagnóstico y/o como agentes de terapia, y que tengan una buena rigidez molecular apreciable en formación de imágenes IRM;

15 (iv) proponer nuevas nanopartículas a base de polímeros silícicos, metales (p. ej., tierras raras) y agentes quelantes, que sean útiles especialmente como agentes de contraste en formación de imágenes (p. ej., IRM) y/o en otras técnicas de diagnóstico y/o como agentes de terapia, y que tengan una excelente biocompatibilidad;

(v) proponer nuevas nanopartículas a base de polímeros silícicos, metales (p. ej., tierras raras) y agentes quelantes, que sean útiles especialmente como agentes de contraste en formación de imágenes (p. ej., IRM) y/o en otras técnicas de diagnóstico y/o como agentes de terapia, y que tengan una muy buena estabilidad coloidal en un medio biológico;

20 (vi) proponer nuevas nanopartículas a base de polímeros silícicos, metales (p. ej., tierras raras) y agentes quelantes, que sean útiles especialmente como agentes de contraste en formación de imágenes (p. ej., IRM) y/o en otras técnicas de diagnóstico y/o como agentes de terapia, y que tengan una excelente accesibilidad (el pequeño tamaño de partículas les permite acceder con más facilidad a las zonas de interés) y siempre una mejor eficiencia para el direccionamiento terapéutico, en particular con respecto a los tumores;

25 (vii) proponer nuevas nanopartículas a base de polímeros silícicos, metales (p. ej., tierras raras) y agentes quelantes, que sean útiles especialmente como agentes de contraste en formación de imágenes (p. ej., IRM) y/o en otras técnicas de diagnóstico y/o como agentes de terapia, y que tengan una alta concentración de activos;

(viii) proponer nuevas nanopartículas a base de polímeros silícicos, metales (p. ej., tierras raras) y agentes quelantes, que sean útiles especialmente como agentes de contraste en formación de imágenes (p. ej., IRM) y/o en otras técnicas de diagnóstico y/o como agentes de terapia, y que muestran *in vivo* una buena eliminación renal (depuración) y una biodistribución favorable y adecuada;

35 (ix) proponer nuevas nanopartículas a base de polímeros silícicos, metales (p. ej., tierras raras) y agentes quelantes, que sean útiles especialmente como agentes de contraste en formación de imágenes (p. ej., IRM) y/o en otras técnicas de diagnóstico y/o como agentes de terapia, y que puedan utilizarse como plataforma que permita combinar numerosas funcionalidades (además de las de IRM): funciones de formación de imágenes (fluorescencia, escintigrafía...) o terapéuticas (radiosensibilización, curiterapia, fototerapia dinámica...);

40 (x) proponer nuevas nanopartículas a base de polímeros silícicos, metales (p. ej., tierras raras) y agentes quelantes, que sean útiles especialmente como agentes de contraste en formación de imágenes (p. ej., IRM) y/o en otras técnicas de diagnóstico y/o como agentes de terapia, y cuya toxicidad relacionada con los metales (p. ej., tierras raras) que contiene se reduce;

(xi) proponer un nuevo procedimiento de obtención de nanopartículas como las mencionadas en los objetivos (i) a (x) anteriores;

(xii) proponer nuevas suspensiones de nanopartículas como las mencionadas en los objetivos (i) a (x) anteriores;

45 (xiii) proponer nuevas composiciones de diagnóstico, de contraste en formación de imágenes (p. ej., IRM), de terapia o de marcaje celular, a base de nanopartículas como las mencionadas en los objetivos (i) a (x) anteriores.

Estos objetivos, entre otros, se logran mediante la presente divulgación que se refiere en un primer de sus aspectos a nanopartículas caracterizadas

50 (i) por que comprende cada una

- una matriz de poliorganosiloxano (POS) que incluye cationes (p. ej., metálicos) M^{n+} ($n = 2$ a 6), preferentemente de tierras raras, opcionalmente en parte en forma de un óxido y/o un oxohidróxido metálico (M), asociado opcionalmente con cationes dopantes D^{m+} ($m = 2$ a 6), preferentemente una tierra rara distinta de M, un actínido y/o un elemento de transición;
- un injerto de funcionalización C^1 de agente quelante que es:

* derivado de un agente quelante C^1 ,

* vinculado a la matriz POS por un enlace covalente -Si-C-,

60 * y en cantidad suficiente para poder complejar todos los cationes M^{n+} y D^{m+} ; estando el injerto C^1 preferentemente en exceso con respecto a los cationes M^{n+} y D^{m+} ; el agente quelante C^1 del cual se deriva el injerto C^1 corresponde a una o más especies diferentes;

- opcionalmente otro injerto de funcionalización Gf^* vinculado a la matriz POS por un enlace covalente -Si-C-, pudiendo Gf^* derivarse de:

65

- * un compuesto hidrófilo (PEG),
- * un compuesto que incluye un principio activo PA1,
- * un compuesto diana,
- * un compuesto luminiscente (p. ej., fluoresceína);

5

- (ii) por que su diámetro d_1 está comprendido entre 1 y 20 nm, preferentemente entre 1 y 10 nm;
- (iii) y opcionalmente por que llevan un principio activo PA2, idéntico o diferente a PA1.

10

En un segundo aspecto, la divulgación tiene por objeto un procedimiento de obtención de las nanopartículas de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones precedentes caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

15

a Síntesis de núcleos a base de un óxido y/o un oxohidróxido metálico (M), preferentemente de tierras raras, al menos en parte en forma catiónica M^{n+} ($n = 2$ a 6), opcionalmente dopado con un dopante (D), preferentemente una tierra rara diferente de M, un actínido y/o un elemento de transición; esta síntesis consiste esencialmente en mezclar una base (preferentemente una base fuerte como NaOH) con una sal de M disuelta en un disolvente preferentemente seleccionado entre el grupo que comprende alcoholes (ventajosamente DEG);

20

b Recubrimiento de los núcleos de la etapa (a) con poliorganosiloxano (POS) que consiste esencialmente en emplear una técnica de sol/gel de hidrólisis-condensación de especies silícicas y alcoxilanos, en presencia de una base o de un ácido y opcionalmente de un principio activo PA1 y/o PA2;

25

c Recubrimiento de la funcionalización de los núcleos recubiertos de la etapa (b) que consiste esencialmente en poner estos núcleos recubiertos de la etapa (b) en contacto con un precursor de injertos de funcionalización C^1 , (preferentemente derivado de un agente quelante $C1$ seleccionado entre los productos definidos a continuación), y opcionalmente en presencia de un injerto de funcionalización Gf^* (preferentemente un compuesto hidrófilo y/o un compuesto que incluye un principio activo PA1 y/o un compuesto diana biológico y/o un compuesto luminiscente seleccionado entre los productos definidos a continuación);

30

d Purificación de las nanopartículas recubiertas en exceso/funcionalizadas de diámetro d_0 , preferentemente por filtración tangencial, diálisis y/o por precipitación/lavado;

35

e Disolución de los núcleos M de nanopartículas recubiertas en exceso/funcionalizadas en la etapa (c) que consiste esencialmente en ponerlos en contacto con un agente modificador del pH y/o un agente quelante $C2$ apto para complejar la totalidad o parte de los cationes M^{n+} y D^{m+} , de modo que el diámetro d_0 de las nanopartículas se reduce a un valor d_1 comprendido entre 1 y 20 nm, preferentemente entre 1 y 10 nm; siendo este agente quelante $C2$ seleccionado entre los productos quelantes que se definen a continuación;

f Opcionalmente, la adición de una sal catiónica destinada a ser al menos en parte complejada por el agente quelante C^1 ;

pudiendo las etapas (c), (d), (e), (f) realizarse en un orden diferente o al mismo tiempo.

40

En el caso de que todo el núcleo se haya disuelto durante la etapa (c), la etapa (e) llega a ser opcional.

En un tercer aspecto, la divulgación tiene por objeto una suspensión de nanopartículas y el extracto seco de dicha suspensión.

45

En un cuarto aspecto, la divulgación tiene por objeto un líquido inyectable que comprende estas nanopartículas.

En un quinto aspecto, la divulgación tiene por objeto:

50

- una composición de ayuda al diagnóstico, preferentemente una composición de contraste,
- una composición terapéutica,
- o una composición de marcaje celular,

caracterizada por que comprende nanopartículas de acuerdo con la invención y/u obtenidas por el procedimiento de acuerdo con la invención y/o la suspensión de acuerdo con la invención y/o preparada a partir del material sólido de acuerdo con la invención.

55

Definiciones

60

En todo este texto, cualquier singular denota indistintamente un singular o un plural. Las definiciones de los términos utilizados en el contexto de la presente descripción y expuestas a continuación, corresponden a una terminología de acuerdo con la invención y se dan de manera no limitativa.

65

- APTES denota (3-aminopropil)triethoxisilano.
- BAPTA denota ácido 1, 2-bis-2-aminofenoxietano-N,N,N',N'-tetraacético.
- DEG denota dietilenglicol.
- DOTA denota ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético.

- DOTA-NHS denota ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético N-hidroxisuccinimida.
- DTPA denota ácido dietilentriaminopentaacético.
- DTPABA denota dianhídrido del ácido dietilentriaminopentaacético.
- DTTA denota ácido dietilentriamintetraacético.
- 5 ○ EDTA denota ácido etilendiamintetraacético.
- EGTA denota ácido etilenglicol-ácido bis(2-aminoetiléter)-N,N',N'-tetraacético.
- EXAFS denota: "Estructura fina de absorción de rayos X extendida".
- IRM denota "Formación de imágenes por resonancia magnética".
- NOTA denota ácido 1,4,7-triazaciclononano-N,N',N'-triacético.
- 10 ○ PDT denota: "Terapia fotodinámica".
- PET denota: "Tomografía por emisión de positrones" o escintigrafía PET.
- PEG denota polietilenglicol.
- POS denota poliorganosiloxano.
- PPG denota polipropilenglicol.
- 15 ○ SPECT denota: "Tomografía computarizada por emisión de fotón único" o escintigrafía SPECT.
- TEOS denota tetraetoxisilano.
- TEM denota microscopía electrónica de transmisión.
- XPS denota: "Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X".
- Un compuesto "hidrófilo" denota un compuesto que tiene una fuerte afinidad por el agua, por "*fuerte*" se entiende, por ejemplo, un compuesto que puede disolverse o dispersarse homogéneamente en agua a temperatura ambiente hasta más de 100 gramos por litro de solución.
- 20 ○ "*alquilo*", denota una cadena hidrocarbonada saturada, lineal o ramificada, opcionalmente sustituida (p. ej., por uno o más alquilos), preferentemente de 1 a 10 átomos de carbono, por ejemplo de 1 a 8 átomos de carbono, más preferentemente de 1 a 7 átomos de carbono.
- 25 Los ejemplos de grupos alquilo son en concreto metilo, etilo, isopropilo, n-propilo, terc-butilo, isobutilo, n-butilo, n-pentilo, isoamilo y 1,1-dimetilpropilo.
- La parte alquilo del grupo alcoxi es como se define anteriormente,
- "*cicloalquilo*" denota un grupo hidrocarbonado saturado mono o policíclico, preferentemente mono o bicíclico, que presenta preferentemente de 3 a 10 átomos de carbono, más preferentemente de 3 a 8.
- 30 ○ "*grupo hidrocarbonado saturado policíclico*", denota un grupo que presenta dos o más anillos cíclicos unidos entre sí por enlaces π y/o condensados de dos en dos.
- Ejemplos de grupos cicloalquilo policíclicos son adamantano y norbornano.
- Ejemplos de grupos cicloalquilo monocíclicos son ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo.
- 35 ○ "*arilo*", denota un grupo hidrocarbonado aromático, que tiene de 6 a 18 átomos de carbono, monocíclico o policíclico y preferentemente monocíclico o bicíclico. Debe entenderse que, en el contexto de la divulgación, por "*grupo aromático policíclico*", se entiende un grupo que presenta dos o más anillos aromáticos, condensados (ortocondensados u orto y pericondensados) entre sí, es decir, que presentan, de dos en dos, al menos dos carbonos en común.
- 40 Dicho grupo hidrocarbonado aromático ("*arilo*") está opcionalmente sustituido, por ejemplo, con uno o más alquilos C1-C3, uno o más grupos hidrocarbonados halogenados (p. ej., CF₃), uno o más alcoxi (p. ej., CH₃O) o uno o más grupos hidrocarbonados que comprenden una o más unidades de cetona (p. ej., CH₃CO-).
- A modo de ejemplo de arilo, se puede mencionar los radicales fenilo, naftilo, antrilo y fenantrilo, fenilo p-clorofenilo; m-clorofenilo; dicloro-3,5-fenilo; triclorofenilo; tetraclorofenilo; o-, p- o m-tolilo; α,α,α -trifluorotolilo; xililos como dimetil-2,3-fenilo; dimetil-3,4-fenilo. Estos grupos pueden estar opcionalmente halogenados, o pueden seleccionarse entre radicales cianoalquilos.
- 45 Los halógenos son, por ejemplo, flúor, cloro, bromo y yodo, preferentemente cloro o flúor.
- "*arilalquilo*" denota un grupo alquilo como se ha definido anteriormente, sustituido con uno o más grupos arilo en su cadena hidrocarbonada, siendo el grupo arilo como se ha definido anteriormente. Los ejemplos son bencilo y trifenilmetilo.
- 50 ○ "*alquenilo*" denota una cadena hidrocarbonada insaturada, lineal o ramificada, sustituida o no, que presenta al menos un doble enlace olefínico, y más preferentemente un único doble enlace. Preferentemente, el grupo "alquenilo" presenta 2 a 8 átomos de carbono, más preferentemente 2 a 6 átomos de carbono. Esta cadena hidrocarbonada comprende opcionalmente al menos un heteroátomo tal como O, N, S. Los ejemplos preferidos de grupos alquenilo son grupos vinilo, alilo y homoalilo.
- 55 ○ "*alquinilo*" denota de acuerdo con la divulgación, una cadena hidrocarbonada insaturada, lineal o ramificada, sustituida o no, que presenta al menos un triple enlace acetilénico, y más preferentemente un único enlace triple. Preferentemente, el grupo alquinilo presenta de 2 a 8 átomos de carbono, más preferentemente de 2 a 6 átomos de carbono. A modo de ejemplo, se puede mencionar el grupo acetilenilo así como el grupo propargilo. Esta
- 60 cadena hidrocarbonada comprende opcionalmente al menos un heteroátomo tal como O, N, S.

Descripción detallada de la invención

Nanopartículas

65 Las nanopartículas pueden definirse por su estructura matricial de POS que incluye una funcionalización quelante C¹

resultante de un agente quelante C1 y que conduce a la formación de complejos $[M^{n+}]/[C^1]$ o incluso $[D^{m+}]/[C^1]$, y, de acuerdo con una modalidad opcional pero sin embargo preferida, de injertos de funcionalización Gf * por ejemplo resultantes de:

- 5
 - un compuesto hidrófilo (PEG);
 - un compuesto que incluye un principio activo PA1;
 - un compuesto diana;
 - y/o un compuesto luminiscente (fluoresceína).

10 Las nanopartículas también pueden definirse por su modo de obtención. Las nanopartículas así definidas constituyen en sí mismas otro objeto de la presente divulgación y se caracterizan por que la matriz POS de cada nanopartícula se obtiene a partir de una nanopartícula de diámetro d_0 , que comprende:

- 15
 - un núcleo a base de un óxido y/o un oxohidróxido metálico (M), preferentemente de tierras raras, al menos en parte en forma catiónica M^{n+} ($n = 2$ a 6), opcionalmente dopado con un dopante (D), preferentemente una tierra rara diferente de M, un actínido y/o un elemento de transición;
 - al menos una capa de recubrimiento a base de POS;
 - y, opcionalmente, un recubrimiento excesivo a base de un agente de funcionalización, preferentemente seleccionado entre agentes quelantes de funcionalización C1 aptos para secuestrar cationes y/o compuestos diana y/o compuestos que incluyen un principio activo PA1 y/o compuestos hidrófilos y/o compuestos luminiscentes;

20 estando dicha nanopartícula sometida a la disolución del núcleo M, preferentemente mediante un agente modificador del pH y/o un agente quelante C2, idéntico o diferente a C1, apto para complejar la totalidad o parte de los cationes M^{n+} y D^{m+} , de modo que el diámetro d_0 de la nanopartícula se reduce a un valor d_1 comprendido entre 1 y 20 nm, preferentemente entre 1 y 10 nm.

25 Estas nanopartículas, por lo tanto, tienen la peculiaridad de estar "sin núcleo", o más precisamente de no presentar un núcleo. No comprende un núcleo cristalizado. Más específicamente, no comprenden un núcleo encapsulado por al menos un recubrimiento.

30 Para ilustrar esto, se hará referencia, sin limitación, a las figuras 1 y 2 adjuntas. La figura 1 es una imagen de TEM (aumento de microscopio x 600.000) de partículas precursoras de las nanopartículas de acuerdo con la presente divulgación. Estas partículas precursoras están formadas por núcleos de óxido metálico M (óxido de gadolinio), recubiertos con polisiloxano y funcionalizados con un agente complejante C¹ (p. ej., DOTA anhidro). Los tamaños observados están comprendidos entre 3 y 5 nm.

35 Las moléculas de DOTA no son visibles en TEM, solo se observa el núcleo recubierto. La figura 2 adjunta es una imagen en TEM después de la disolución de los núcleos, tomada en las mismas condiciones que la imagen de la figura. No se observan partículas con un núcleo, mientras que el análisis químico local indica la presencia de gadolinio en la zona observada.

40 Una característica esencial de estas partículas ultrafinas proviene de su tamaño muy pequeño, del orden de unos pocos nanómetros. En estos tamaños muy pequeños (inferiores o iguales a, en orden creciente de preferencia 20; 18; 15; 12; 10; 8; 5; 3 nanómetros), las partículas presentan un comportamiento casi molecular, permitiendo:

- 45
 - una muy buena estabilidad coloidal en un medio biológico,
 - una biodistribución favorable con una posibilidad de eliminación por las vías naturales apropiadas, es decir, una biodistribución renal sin captación en los órganos vitales, mientras que presenta un tiempo de retención más largo que el de los complejos moleculares, su aspecto más masivo permite también evitar una difusión excesiva,
 - una mejor accesibilidad y eficacia para la detección de tumores,
 - una posibilidad de insertar una alta concentración de elementos activos, es decir, obtener una gran tasa de agentes quelantes injertados sobre la matriz de polisiloxano y en la misma y obtener una relación C1 significativa en silicio, ventajosamente superior o igual a, en un orden creciente de preferencia, 1; 5; 10; 20; 30; 40; 50 % en masa. Para la búsqueda de una señal dada o un efecto terapéutico relacionado con el elemento complejado, esto limita la inyección del elemento exógeno de silicio.

55 Con respecto al tamaño, se puede observar que estas nanopartículas también se caracterizan por su masa molar (en kDa) superior o igual a, en un orden creciente de preferencia, 2, 3, 5, e inferior o igual a, en un orden creciente de preferencia, 200, 100, 50, 20, 10.

60 Su muy buena estabilidad y compatibilidad química son dos características muy importantes de estas nanopartículas. Su cadena principal de base está formada por POS, es decir, principalmente por compuestos que comprenden Si, C, H, O y N, base siliconas, compuestos conocidos por su muy buena compatibilidad biológica y baja toxicidad. Los elementos activos adicionales, como los cationes metálicos se insertan en las partículas mediante complejación gracias a moléculas estables y fiables para aplicaciones biológicas. La concentración residual de iones libres puede entonces controlarse y mantenerse muy por debajo de los umbrales de toxicidad críticos. Los intercambios de cationes complejados con cationes endógenos también pueden controlarse utilizando

en una misma partícula una parte de las funciones quelantes C¹. La posibilidad de adición a las nanopartículas de complejación libres (p. ej., C2) de cationes metálicos permite garantizar que la liberación accidental de M (p. ej., gadolinio) o incluso D, pueda ser compensada inmediatamente por la complejación por otro agente quelante, reduciendo así los riesgos de toxicidad relacionada con la naturaleza del gadolinio.

5 Estas nanopartículas de POS "sin núcleo" comprenden una alta densidad de injertos quelantes C¹ unidos (o no C2) de manera covalente a la cadena principal (matriz) de POS.

10 Preferentemente, los agentes quelantes C1 y/o C2 están presentes en las nanopartículas en una cantidad tal que la totalidad o parte de los iones, en particular los cationes Mⁿ⁺ e incluso D^{m+} no están libres sino que están complejados. Más preferentemente, el porcentaje másico de los elementos M y D implicados en los enlaces M-O-M o M-O-D o D-O-D o M-O-Si o D-O-Si, en relación con el número total de elementos M y D, inferior o igual a, en un orden creciente de preferencia 10; 5; 2, 1; 0,5; 10⁻¹; 10⁻²; 10⁻³.

15 El número de agentes quelantes C¹ y/o C2 en las nanopartículas es superior al número de cationes restantes Mⁿ⁺ y/o D^{m+}, o incluso otros cationes (p. ej., Ca⁺⁺, Mg⁺) opcionalmente añadidos además de Mⁿ⁺ y/o D^{m+}.

Este porcentaje de enlaces (óxidos) M-O-M o M-O-D o D-O-D o M-O-Si o D-O-Si se puede medir mediante las técnicas conocidas de tipo EXAFS, XPS, espectroscopía vibracional, microscopía electrónica de transmisión junto con análisis estructurales, etc.

20 Esta medida permite evaluar el número de enlaces específicos del núcleo, esta medida permite una medición cuantitativa de la presencia o no del núcleo, también permite evaluar las especies M o D que podrían disolverse fácilmente y encontrarse en forma iónica en solución.

25 Los agentes quelantes C1 pueden injertarse en la superficie de las partículas de polisiloxano o insertarse directamente en la matriz POS. Una parte o la totalidad de estos agentes quelantes están destinados a complejar cationes Mⁿ⁺ (p. ej., gadolinio) o incluso D^{m+}. Otra parte de estos agentes quelantes puede servir para la complejación de cationes endógenos para asegurar una buena compatibilidad con los medios biológicos encontrados.

30 Preferentemente, al menos 1 % y preferentemente al menos 10 % de los agentes quelantes C¹ no están complejados por cationes Mⁿ⁺, o incluso D^{m+}.

Una de las principales ventajas de las nanopartículas de acuerdo con la divulgación es que M y/o D pueden ser un agente activo en la formación de imágenes (p. ej., un agente de contraste) y/o en terapia.

35 De hecho, M/Mⁿ⁺ (p. ej., gadolinio) o incluso D/D^{m+} presentan propiedades notables para aplicaciones biológicas en formación de imágenes y/o en terapia, como por ejemplo propiedades magnéticas, fluorescentes, radiactivas, (elemento de número atómico elevado) o radiosensibilizadores (X, gamma, beta, neutrón).

40 Estas nanopartículas, por lo tanto, pueden utilizarse como un agente de contraste en sistemas de formación de imágenes como: IRM, escintigrafía SPECT, escintigrafía PET, formación de imágenes por fluorescencia, escáneres de rayos X.

Además de la funcionalización quelante C¹, estas nanopartículas pueden modificarse (funcionalización) en la superficie mediante compuestos hidrófilos (PEG) y/o cargarse de manera diferente para adaptar su biodistribución en el organismo y/o permitir un buen marcaje celular, en particular para el seguimiento de terapias celulares.

45 Además, se pueden funcionalizar en la superficie mediante compuestos diana biológicos, para acceder preferentemente a ciertas zonas de interés del organismo, en particular a las zonas tumorales. De esta manera, el agente portado por estas nanopartículas se concentra en la zona de interés sin tener que aumentar muy significativamente las cantidades inyectadas como es el caso actualmente.

50 La funcionalización también se puede realizar mediante compuestos que incluyen un principio activo PA1 y/o compuestos luminiscentes (fluoresceína).

55 De ello resulta que las posibilidades de usos terapéuticos como agente radiosensibilizante en combinación con radioterapias, neutrón-terapias, como agente radioactivo para tratamientos de curieterapia, como agente para la PDT (terapia fotodinámica) o como agente de vectorización de moléculas con un efecto terapéutico.

60 Una característica esencial de estas partículas ultrafinas proviene de su tamaño muy pequeño, del orden de unos pocos nanómetros. En estos tamaños muy pequeños (inferiores o iguales a, en un orden creciente de preferencia 20; 18; 15; 12; 10; 8; 5; 3 nanómetros), las partículas presentan un comportamiento casi molecular, permitiendo:

- una muy buena estabilidad coloidal en un medio biológico,
- una biodistribución favorable con una posibilidad de eliminación por las vías naturales apropiadas, es decir, una biodistribución renal sin captación en los órganos vitales, mientras que presenta un tiempo de retención más largo que el de los complejos moleculares, su aspecto más masivo permite también evitar una difusión excesiva,
- una mejor accesibilidad y eficacia para la detección de tumores,

→ una posibilidad de insertar una alta concentración de elementos activos, es decir, obtener una gran tasa de agentes quelantes C1 injertados sobre la matriz de polisiloxano y en la misma y obtener una relación C1 significativa en silicio, ventajosamente superior o igual a, en un orden creciente de preferencia, 1; 5; 10; 20; 30; 40; 50 % en masa. Para la búsqueda de una señal dada o un efecto terapéutico relacionado con el elemento complejado, esto limita la inyección del elemento exógeno de silicio.

Con respecto al tamaño, se puede observar que estas nanopartículas también se caracterizan por su masa molar (en kDa) superior o igual a, en un orden creciente de preferencia, 2, 3, 5, e inferior o igual a, en un orden creciente de preferencia, 200, 100, 50, 20, 10.

Su muy buena estabilidad y compatibilidad química son dos características muy importantes de estas nanopartículas. Su cadena principal de base está formada por POS, es decir, principalmente por compuestos que comprenden Si, C, H, O y N, base de siliconas, compuestos conocidos por su muy buena compatibilidad biológica y baja toxicidad. Los elementos activos adicionales, como los cationes metálicos se insertan en las partículas mediante complejación gracias a moléculas estables y fiables para aplicaciones biológicas. La concentración residual de iones libres puede entonces controlarse y mantenerse muy por debajo de los umbrales de toxicidad críticos. Los intercambios de cationes complejados con cationes endógenos también pueden controlarse utilizando en una misma partícula una parte de los agentes quelantes C1. La posibilidad de adición a las nanopartículas de complejación libres de cationes metálicos permite garantizar que la liberación accidental de M (p. ej., gadolinio) o incluso D, pueda ser compensada inmediatamente por la complejación por otro agente quelante, reduciendo así los riesgos de toxicidad relacionada con la naturaleza del gadolinio.

Otra característica de estas nanopartículas es el mantenimiento del carácter rígido de los objetos y de la geometría global de las partículas después de la inyección. Esta fuerte rigidez tridimensional es proporcionada por la matriz de polisiloxano, en la que la mayoría de los silicios están unidos a 3 o 4 átomos de silicio por medio de un puente de oxígeno. La combinación de esta rigidez con su pequeño tamaño permite aumentar la relaxividad de estas nanopartículas para las frecuencias intermedias (20 a 60 MHz) en comparación con los compuestos comerciales (complejos a base de Gd-DOTA, por ejemplo), pero también para las frecuencias superiores a 100 MHz presentes en las IRM de alto campo de nueva generación.

Esta rigidez, no presente en los polímeros, también es una ventaja para la vectorización y accesibilidad de las moléculas diana.

Además, debe enfatizarse que la biocompatibilidad de estas nanopartículas no es la menor de sus cualidades.

Fórmula general

Las nanopartículas de acuerdo con la divulgación también se caracterizan por la siguiente fórmula general:



con:

- ♦ C¹ son injertos de funcionalización formados por radicales hidrocarbonados monovalentes, idénticos o diferentes entre sí, agentes quelantes y cada uno conectado a Si por un enlace Si-C;
- ♦ R son radicales monovalentes, idénticos o diferentes entre sí, que constituyen un injerto de funcionalización conectado a Si mediante un enlace Si-C, y que preferentemente comprenden un grupo hidrófilo y al menos un átomo de N u O;
- ♦ Mⁿ⁺ son cationes metálicos idénticos o diferentes entre sí con n = 2 a 6;
- ♦ D^{m+} son cationes metálicos idénticos o diferentes entre sí con m = 2 a 6;
- ♦ Gf* son injertos de funcionalización distintos de C¹ y formados por radicales hidrocarbonados monovalentes, idénticos o diferentes entre sí, conectado cada uno a Si por un enlace Si-C y que pueden ser resultantes de:

- un compuesto hidrófilo (PEG);
- un compuesto que incluye un principio activo PA1;
- un compuesto diana;
- un compuesto luminiscente (fluoresceína);

- ♦ a superior o igual a 0,01 e inferior o igual a 0,8; con preferencia a ≥ d + e;
- ♦ b inferior o igual a 0,7;
- ♦ c superior o igual a 0,5 e inferior a 1,9;
- ♦ g superior o igual a 0 e inferior a 0,3;
- ♦ e + f superior o igual a 0,01 e inferior o igual a 0,8;
- ♦ e + f inferior o igual que a;
- ♦ a + b + 2c + d + g = 4;
- ♦ a + b + g comprendido entre 0,25 y 0,95.

Los radicales hidrocarbonados monovalentes son p. ej., alquilos, cicloalquilos, arilos, arilalquilos, alquénilos o alquinilos.

La cantidad de silicio de la matriz POS con respecto a otros constituyentes

5 La relación atómica [(M/Si) * 100] es otro parámetro representativo de las nanopartículas de acuerdo con la divulgación. De este modo, estas nanopartículas se caracterizan por una relación de % atómico [(M/Si) x 100] comprendido entre 10 y 60, preferentemente entre 25 y 40.

10 De acuerdo con otra característica notable de la divulgación, 1 a 80 %, y preferentemente 20 a 60 %, de las sílices de silicio de la matriz POS de las nanopartículas se unen, mediante un enlace de silano Si-C, a al menos un agente quelante C¹.

15 En otras palabras, 25 a 95 % y preferentemente 40 a 60 % de los átomos de silicio de la matriz POS se unen covalentemente a un átomo de carbono.

20 Ventajosamente, al menos 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 60 %, de acuerdo con un orden creciente de preferencia, las sílices de la matriz POS de las nanopartículas se unen, por un enlace de silano Si-C, a al menos un grupo de funcionalización quelante C¹, y/o a al menos otro injerto de funcionalización Gf* unido a la matriz POS por un enlace covalente -Si-C-, Gf* pudiendo ser resultante de:

- o un compuesto hidrófilo (PEG);
- o un compuesto que incluye un principio activo PA1;
- o un compuesto diana;
- o un compuesto luminiscente (fluoresceína).

25 En un modo preferido de realización en el que cada una de las nanopartículas comprende al menos una capa externa que comprende un injerto de funcionalización quelante C¹ injertado en la superficie de la matriz POS; se espera que entre 1 y 80 %, idealmente 20 y 60 % de los átomos de silicio, estén unidos por enlaces Si-C al injerto de funcionalización quelante C¹.

Multimodalidad

35 Ventajosamente, estas nanopartículas pueden prepararse para presentar una multimodalidad de propiedades, es decir, que son multimodales, en concreto debido a los diferentes cationes Mⁿ⁺, o incluso D^{m+}, que comprenden, que están complejados por C¹, y que son útiles como agentes de contraste en la formación de imágenes y/o como agentes terapéuticos. Por ejemplo, las mismas nanopartículas presentan:

- un comportamiento de agente de contraste para al menos dos de las técnicas de detección, por ejemplo IRM y escintigrafía o IRM y fluorescencia,
- o dos comportamientos diferentes de agente terapéutico,
- o al menos un comportamiento de agente de contraste y al menos un comportamiento de agente terapéutico.

45 Estas nuevas nanopartículas pueden utilizarse como una plataforma que permite combinar numerosas funcionalidades (además de las de IRM): funciones de formación de imágenes (fluorescencia, escintigrafía...) y/o funciones terapéuticas (radiosensibilización, curieterapia, fototerapia dinámica...).

Relaxividad

50 Preferentemente, las nanopartículas de acuerdo con la divulgación tienen una relaxividad r₁ por ion Mⁿ⁺ que es superior 5 mM⁻¹ (del ion Mⁿ⁺).s⁻¹ preferentemente 10 mM⁻¹ (del ion Mⁿ⁺).s⁻¹ para una frecuencia de 20 MHz.

Más preferentemente, estas nanopartículas tienen una relaxividad r₁ por ion Mⁿ⁺ a 60 MHz, que es superior o igual a la relaxividad r₁ por ion Mⁿ⁺ a 20 MHz.

55 La relaxividad r₁ considerada aquí es una relaxividad por ion Mⁿ⁺ (por ejemplo, gadolinio). r₁ se extrae de la siguiente fórmula: $1/T_1 = [1/T_1]_{\text{agua}} + r_1 [M^{n+}]$

Elementos activos metálicos (cationes) M y dopantes D

60 Preferentemente, M y D se seleccionan entre los siguientes grupos de elementos: lantánidos, elementos de transición, actínidos, elementos de las columnas Ib, IIa, IIIa, IIIb, Va, VIb, VIIb, VIII de la tabla periódica de acuerdo con "The Merck Index - Undécima edición"; preferentemente en los subgrupos que comprenden:

- o los siguientes lantánidos: Gd, Dy, Eu, Tb, Nd, Yb, Er, Ho, Lu;

65

- Ib: Cu, Ag, Au;
- IIa: Ca, Mg;
- IIIa: Ga, In;
- IIIb: Y;
- 5 ○ Va: Bi;
- VIb: Cr, Mo;
- VIIb: Mn, Tc;
- VIII: Fe, Ru, Pt, Rh, Ir.

10 Gd, Dy son muy adecuados p. ej., para las nanopartículas útiles como agente de contraste de IRM.

Eu, Tb, Nd, Yb, Er son muy adecuados p. ej., para nanopartículas útiles como agente de fluorescencia.

Ho, Lu son muy adecuados p. ej., para nanopartículas útiles como agente de curieterapia.

15 Lu, Yb, Gd, Ho son adecuados p. ej., para nanopartículas útiles como agente de radiosensibilización.

Localización de elementos activos metálicos (cationes) M y dopantes D

20 De acuerdo con una característica ventajosa de la divulgación, los cationes M^{n+} y/o D^{m+} están ubicados en la superficie de las nanopartículas.

De ello se deduce que estos cationes están cerca de las moléculas de agua y, por lo tanto, pueden tener en particular un efecto significativo de la mejora de contraste T1 en IRM. Esta mejora en el rendimiento de las nanopartículas de acuerdo con la divulgación, es un control, entre otros, de la ubicación de los cationes M^{n+} y/o D^{m+} en la superficie.

25

Agentes quelantes C1, C2 o C3

30 Ventajosamente, el quelante C1, C2 se selecciona entre los siguientes productos:

- los productos del grupo de ácidos policarboxílicos poliaminados y sus derivados, y más preferentemente aún en el subgrupo que comprende: DOTA, DTPA, EDTA, EGTA, BAPTA, NOTE y sus mezclas;
- los productos del grupo que comprende porfirina, cloro, 1,10-fenantrolina, biperidina, terpiridina, ciclam, triazacilononano, sus derivados y sus mezclas;
- 35 ○ y sus mezclas.

Como ejemplos de agentes quelantes, se puede mencionar aquellos que comprenden una unidad de DTPA, DOTA, DTDTPA (DTPA ditiolada) o una unidad de ácido succínico.

40 Si M es un lantánido, C1, C2 se selecciona ventajosamente entre aquellos que presentan propiedades complejantes de los lantánidos, en particular aquellos cuya constante de complejación $\log(K_{C1})$ es superior a 15, preferentemente 20. (p. ej., DTPA o DOTA).

Compuestos hidrófilos

De acuerdo con una disposición privilegiada de la divulgación, los compuestos hidrófilos a partir de los cuales se derivan los injertos de funcionalización se seleccionan entre el grupo de polioles, preferentemente del subgrupo que comprende glicoles, azúcares y sus mezclas; dextranos, siendo particularmente preferidos PEG y PPG.

50 De acuerdo con una alternativa, estos compuestos hidrófilos se pueden seleccionar entre aquellos que tienen masas molares inferiores a 2,000 g/mol, preferentemente inferiores a 800 g/mol. Los ejemplos de compuestos hidrófilos con su masa molar (Mw) preferida se dan a continuación:

- 55 - Polí(etilenglicol)bis(carboximetil)éter (PEG) $250 < Mw < 2000 \text{ g.mol}^{-1}$;
- Polioxietileno bis(amina), $250 < Mw < 2000 \text{ g.mol}^{-1}$;
- O-metil-O'-succinilpolietilenglicol, Mw del orden de 2000 g.mol^{-1} ;
- Metoxipolietilenglicilamina Mw del orden de 750 g.mol^{-1} ;
- Ácido succínico y mercaptosuccínico;
- 60 - Azúcares, en particular glucosa y sus derivados, por ejemplo, dextranos;
- Aminoácidos o péptidos hidrófilos (ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, cisteína, serina, treonina, glicina ...);
- Y sus mezclas.

65 Más generalmente, los compuestos hidrófilos comprenden ventajosamente funciones alcoholes o ácidos carboxílicos o aminas o amidas o ésteres o éter-óxidos o sulfonatos o fosfonatos o fosfinatos y se unirán, preferentemente de manera covalente, a al menos un 10 % de los átomos de silicio de POS de la matriz.

Huelga decir que el agente quelante C1, C 2 puede ser un compuesto hidrófilo y viceversa.

El principio activo PA1 o PA2 diferente de $[M^{n+}]/[C1]$ et $[D^{m+}]/[C1]$.

5 De acuerdo con una modalidad interesante de la divulgación, las nanopartículas llevan un principio activo PA2, a través de enlaces químicos lábiles, seleccionados preferentemente entre el grupo de enlaces químicos lábiles que comprenden: amida, -SS-, o un enlace capaz de ser lisado por una enzima específica.

10 De acuerdo con otra modalidad interesante, el principio activo PA1 o PA2 (p. ej., incluido en un injerto de funcionalización o complejoado por C1) se selecciona entre el grupo de moléculas terapéuticas, compuestos magnéticos, compuestos radiactivos o capaces de convertirse después de la activación.

Compuestos diana biológicos

15 La elección de las dianas biológicas se realiza entre las siguientes familias de biovectores, utilizadas en formación de imágenes y/o en terapia, preferentemente en el grupo de especies capaces de reconocer y específicamente vincularse con zonas de interés biológicas y, por lo tanto, permitir un direccionamiento de dichas zonas. Puede tratarse, p. ej., de: proteínas, glicoproteínas, lipoproteínas, polipéptidos, péptidos (p. ej., RGD), peptidomiméticos, colorantes, azúcares, oligosacáridos, neuromediadores, aminas cuaternarias, aptámeros, anticuerpos y combinaciones de dichos compuestos.

20

Compuestos luminiscentes

Los compuestos luminiscentes se seleccionan entre el grupo de fluoróforos orgánicos o inorgánicos.

25 Huelga decir que cada producto:

- agente quelante C1, C2;
- un compuesto hidrófilo;
- 30 ○ un principio activo PA1 o PA2;
- un compuesto diana biológico;
- o un compuesto luminiscente;

puede poseer las características de la totalidad o parte de los otros productos.

35

Procedimiento

La invención también se refiere a un procedimiento de obtención de nanopartículas, en concreto del tipo de las definidas anteriormente. Este procedimiento se caracteriza por que comprende las etapas (a), (b), (c), (d), (e) ((f): opcional) definidos anteriormente; las etapas (c), (d), (e), (f) se pueden realizar en un orden diferente o al mismo tiempo

40

La etapa (a) consiste más precisamente en la práctica de formar una nanopartícula del tipo núcleo/coraza con un núcleo de óxido de lantánido (por vía poliol modificado) y una coraza de polisiloxano (por sol/gel), este objeto tiene por ejemplo un tamaño de alrededor de 10 nm (preferentemente 5 nanómetros). Un núcleo de óxido de lantánido de tamaño muy pequeño (adaptable a menos de 10 nm) se puede preparar en un alcohol mediante uno de los procedimientos descritos en las siguientes publicaciones (P. Perriat *et al.*, J. Coll. Int. Sci, 2004, 273, 191; O. Tillement *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 2007, 129, 5076 y P. Perriat *et al.*, J. Phys. Chem. C, 2009, 113, 4038).

45

De acuerdo con la etapa (b), estos núcleos pueden recubrirse con una capa de polisiloxano siguiendo, por ejemplo, un protocolo descrito en las siguientes publicaciones (C. Louis *et al.*, Chem. Mat, 2005, 17, 1673 y O. Tillement *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 2007, 129, 5076).

50

En la etapa (c), se injertan agentes quelantes específicos de los cationes metálicos contemplados sobre la superficie del polisiloxano; también puede insertarse una parte en el interior de la capa pero el control de la formación del polisiloxano es complejo y el simple injerto exterior da, en estos tamaños muy pequeños, una proporción de injerto suficiente.

55

La etapa de purificación (d) consiste más precisamente en separar las nanopartículas de los residuos de síntesis mediante un método de diálisis o filtración tangencial, en una membrana que incluye poros de tamaño adecuado.

60

En la etapa posterior (e), el núcleo se destruye por disolución (por ejemplo, modificando el pH o introduciendo moléculas complejantes en la solución). Esta destrucción del núcleo permite luego una dispersión de la capa de polisiloxano (de acuerdo con un mecanismo de colapso o corrosión lenta), lo que permite finalmente obtener un objeto de polisiloxano de morfología compleja, cuyas dimensiones características son del orden de magnitud del

65

espesor de la capa de polisiloxano, es decir, mucho más pequeño que los objetos hasta ahora desarrollados. También se obtiene un alto contenido de agentes quelantes C1 ya que estos se injertan inicialmente en la superficie del polisiloxano y por que en estos tamaños muy pequeños la superficie se refiere a una proporción muy alta del material de la partícula, la relación de superficie a volumen varía en función del tamaño en $1/r$ (radio). Durante el

- 5 mecanismo de colapso de esta estructura, otros complejos también pueden fijarse hasta una saturación en las superficies "frescas" recién formadas. Se consigue así contenidos de complejantes ampliamente superiores a los que se hubieran obtenido mediante una funcionalización de superficie convencional de partículas de sílice más finas, sujeto a la disponibilidad de tales partículas.
- 10 El hecho de retirar el núcleo permite de este modo pasar de un tamaño de partículas de aproximadamente 5 nanómetros de diámetro a un tamaño de aproximadamente 3 nanómetros. Además, esta operación permite aumentar el número de M (p. ej., gadolinio) en nm^3 en comparación con una nanopartícula de polisiloxano teórica del mismo tamaño pero que comprende M (p. ej., gadolinio) únicamente en la superficie.
- 15 El número de M para un tamaño de nanopartículas se puede evaluar gracias a la relación atómica M/Si medida por EDX.

Productos derivados de nanopartículas

- 20 La presente divulgación tiene asimismo por objeto:
- Una suspensión de nanopartículas como se ha definido anteriormente y/u obtenidas mediante el procedimiento descrito *supra*.
 - Una suspensión de nanopartículas como se ha definido anteriormente y/u obtenidas mediante el procedimiento
- 25 descrito *supra*, caracterizada por que comprende un agente quelante C1 libre de iones M^{n+} o D^{m+} .
- Un material sólido obtenido por eliminación del líquido, preferentemente por liofilización de la suspensión de nanopartículas como se ha definido anteriormente y/u obtenidas mediante el procedimiento descrito *supra*.
 - Un líquido inyectable que comprende nanopartículas como se ha definido anteriormente y/u obtenidas mediante el procedimiento descrito *supra*, y/o suspensión de estas nanopartículas y/o preparado a partir del material sólido
- 30 mencionado anteriormente.

Aplicaciones

La presente divulgación también se refiere a las aplicaciones de estas nanopartículas, que incluyen en concreto:

- 35
- A una composición de ayuda al diagnóstico, preferentemente una composición de contraste, caracterizada por que comprende nanopartículas como se ha definido anteriormente y/u obtenidas mediante el procedimiento descrito *supra* y/o la suspensión mencionada anteriormente y/o preparado a partir del material sólido definido anteriormente.
 - A una composición terapéutica caracterizada por que comprende nanopartículas como se ha definido anteriormente y/u obtenidas mediante el procedimiento descrito *supra* y/o la suspensión mencionada anteriormente y/o preparado a partir del material sólido definido anteriormente.
 - A una composición terapéutica que comprende nanopartículas como se ha definido anteriormente y/u obtenidas mediante el procedimiento descrito *supra* y/o la suspensión mencionada anteriormente y/o preparada a partir del material sólido definido anteriormente, para el tratamiento de cánceres o enfermedades neurodegenerativas, en particular para el direccionamiento de los sitios a tratar.
 - A una composición de marcaje celular caracterizada por que comprende nanopartículas como se ha definido anteriormente y/u obtenidas mediante el procedimiento descrito *supra* y/o la suspensión mencionada anteriormente y/o preparado a partir del material sólido definido anteriormente.
- 40
- 45
- 50

Ejemplos

Material y métodos

- 55
- La medición del tamaño de las nanopartículas en suspensión coloidal se lleva a cabo mediante espectroscopia de correlación de fotones (PCS) en un Zetasizer Nano-S de Malvern.
 - El tamaño de partículas también se puede medir por microscopía electrónica de transmisión (TEM), en un microscopio JEOL 2010 con una tensión de aceleración de 200 kV. Una gota de solución coloidal diluida se coloca en una rejilla de carbono para su análisis.
- 60
- La centrifugación de las soluciones se lleva a cabo utilizando una centrífuga Allegra 25R de Beckman Coulter, a una velocidad de 4100 rpm.
 - En el contexto de la purificación, la filtración tangencial de las soluciones se lleva a cabo a través de una membrana de 5 kDa, en tubos de Vivaspin de 20 ml de Sartorius Stedim Biotech, hasta obtener una dilución de las impurezas superior a 1000. Para esto, los tubos Vivaspin también se centrifugan a 4100 rpm.
- 65
- La liofilización de las partículas se lleva a cabo bajo vacío dinámico a 0,15 mbar y $-2\text{ }^\circ\text{C}$ en un liofilizador CHRIST

Alpha 1-2.

- Los análisis químicos por difracción de rayos X (EDX) se llevan a cabo en un microscopio electrónico de barrido Philips XL20. Para cada muestra, se deposita una gota de solución acuosa sobre un soporte de carbono. Después del secado, la superficie se metaliza con una capa de oro de 10 nm de espesor. Para el análisis químico, se promedian tres mediciones en tres zonas de aproximadamente 50 μm x 50 μm . Los porcentajes de cada elemento se obtienen en porcentajes atómicos.
- La señal de las partículas en relajometría se mide utilizando un analizador Bruker Minispec MQ60 NMR, con un campo magnético de 1,4T.

10 Ejemplo 1. Síntesis del núcleo de óxido de gadolinio

Se prepara una solución disolviendo una cantidad de 11 g/l de sal de cloruro de gadolinio ($\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) en un volumen de 375 ml de dietilenglicol (DEG). A la solución obtenida, se lleva a cabo una adición de 375 ml de una solución de sosa 0,1 mol/l a temperatura ambiente en 15 horas.

La figura 3 adjunta muestra la distribución de tamaño de los núcleos de óxido de gadolinio, medida en el DEG por PCS; promedio: 3,6 nm.

20 Ejemplo 2. Funcionalización de los núcleos de óxido de gadolinio con DTPABA

Alrededor de los núcleos de óxido de gadolinio del ejemplo 1, se sintetiza una capa de polisiloxano funcionalizado por vía sol-gel. Para hacer esto, la solución de los núcleos de 750 ml se calienta a 40 °C en un baño de aceite, con agitación. 787 μl de APTES, 502 μl de TEOS y 1913 μl de una solución acuosa de trietilamina 0,1 mol/l se añaden a la solución de núcleos. Estas adiciones se repiten una segunda vez después de 24 horas de espera. La solución se deja luego durante 48 horas a 40 °C con agitación. Se obtiene partículas del núcleo-corteza que tienen un tamaño de aproximadamente 5 nm con funciones de amina en la superficie. La figura 4 adjunta muestra la distribución de tamaño de los núcleos recubiertos de polisiloxano, medida en el DEG por PCS; promedio: 4,9 nm.

Acto seguido se dispersan 3.135 g de DTPABA en 150 ml de dimetilsulfóxido (DMSO). Luego, se añaden 750 ml de solución de núcleos de óxido de gadolinio a la solución DTPABA. La mezcla se agita durante 24 horas.

Las nanopartículas se precipitan luego por centrifugación en cuatro bidones de 500 ml de acetona. Luego se retira la acetona y las partículas se redispersan en 100 ml de agua en total. Luego se purifican por filtración tangencial. Las impurezas de gran tamaño se retiran por filtración con una jeringa, a través de una membrana de 0,2 μm .

Se obtienen partículas que tienen un tamaño de aproximadamente 5,5 nm. La figura 5 adjunta muestra la distribución de tamaño de los núcleos recubiertos con polisiloxano, funcionalizados con DTPABA, medida en agua por PCS; promedio: 5,6 nm.

La figura 6 adjunta muestra el seguimiento de la síntesis en granulometría: en línea de trazos (----) la distribución del tamaño de los núcleos solos; en la línea continua gruesa (-) la distribución del tamaño de los núcleos recubiertos de polisiloxano; en línea continua fina (\square) la distribución de tamaños de núcleos recubiertos con polisiloxano y funcionalizados con DTPABA.

La figura 7 adjunta muestra la imagen en TEM de las partículas funcionalizadas con DTPABA; los tamaños observados están comprendidos entre 4 y 6 nm.

La solución acuosa de nanopartículas puede almacenarse durante varios meses en un refrigerador después de la liofilización, en microplacas selladas herméticamente.

El análisis químico realizado por espectroscopia de masas por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) en el Servicio Central de Análisis de Solaize proporciona los siguientes resultados en porcentajes atómicos: carbono al 70,6 %, nitrógeno al 14,3 %, gadolinio al 4,9 %.

55 Ejemplo 3. Disolución del núcleo de las partículas de óxido de gadolinio funcionalizadas con DTPABA utilizando ácido clorhídrico

A las partículas del ejemplo 2, dispersadas en agua, se añade ácido clorhídrico concentrado hasta la obtención de un pH igual a 2.5. Se deja agitar una noche.

La solución se purifica por filtración tangencial para eliminar los iones Gd^{3+} que se han disuelto del núcleo de las partículas. Se obtienen partículas que tienen un tamaño de aproximadamente 3,5 nm. La figura 8 adjunta muestra la distribución de tamaño de las partículas reducidas con ácido clorhídrico, medida en agua por PCS; promedio: 3,4 nm.

La señal de las partículas de relajometría $r_1 = 1/T_1$ disminuyó en un 27 %. Se observó un ataque químico importante

con la disolución forzada por ataque ácido. La fuerte disminución de la relajometría lo confirma.

Por otra parte, el análisis químico realizado por EDX da una relación atómica de gadolinio/silicio de 22,1 %. Con respecto a las partículas del ejemplo 2, se observa que un 54 % del gadolinio se ha disuelto por ataque ácido.

5 **Ejemplo 4. Disolución del núcleo de las partículas de óxido de gadolinio funcionalizadas con DTPABA utilizando DTPA libre**

10 A las partículas del ejemplo 2, dispersadas en agua, se añade DTPA libre con gran exceso. El pH de la solución se ajusta a 7. Se deja agitar una noche.

15 La solución se purifica por filtración tangencial, para eliminar los iones Gd^{3+} que se han disuelto del núcleo de las partículas y se complejan con DTPA libre. Se obtienen partículas que tienen un tamaño de aproximadamente 4 nm. La figura 9 adjunta muestra la distribución de tamaño de las partículas disminuidas con la adición de DTPA, medida en agua por PCS; promedio: 4,3 nm.

20 Además, la señal de las partículas en relajometría r_1 disminuyó en un 71 % en comparación con las partículas del ejemplo 2. Se observa un ataque químico muy importante del núcleo por disolución forzada por la complejación. También es probable una pérdida de Gd^{3+} complejada en DTPA inyectados en la superficie, lo que explica la mayor disminución de la señal en relajometría en comparación con el ejemplo 3.

25 Por otra parte, el análisis químico realizado por EDX da una relación atómica de gadolinio/silicio de 10,8 %. Con respecto a las partículas del ejemplo 2, se observa que el 78 % de gadolinio se ha eliminado por la complejación del DTPA.

30 Para evaluar la pérdida de Gd^{3+} complejados en DTPA inyectados en la superficie, se seleccionó añadir nuevos iones Gd^{3+} para llenar estos complejos. Una cantidad de iones Gd^{3+} equivalente a la pérdida en la etapa anterior se disuelve en agua. El pH de esta solución se reduce a 6,5. Esta solución se añade luego a las nanopartículas de tamaño disminuido. Se deja agitar una noche.

35 La solución se purifica por filtración tangencial para eliminar los iones Gd^{3+} que no han sido complejados por DTPA. Se obtienen partículas que tienen un tamaño de aproximadamente 3,5 nm. La figura 10 adjunta muestra la distribución de tamaño de las partículas disminuidas con la adición de DTPA, luego con la adición de Gd^{3+} , medida en agua por PCS; promedio: 3,7 nm.

Además, la señal de las partículas en relajometría r_1 aumentó en un 123 % en comparación con las partículas de tamaño disminuido. Por lo tanto, se observa que el llenado de los DTPA que se quedan vacíos con los iones Gd^{3+} traídos a la solución. El tamaño de partículas se mantiene casi sin cambios.

40 La figura 11 resume los experimentos de reducción de tamaños anteriores: en una línea continua gruesa (-) la distribución del tamaño de las partículas iniciales; en la línea continua fina (□) la distribución del tamaño de partículas disminuidas con HCl; en la línea discontinua (----) la distribución del tamaño de partículas disminuidas con DTPA libre.

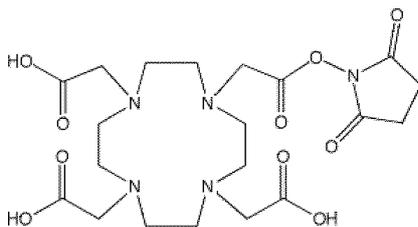
45 **Ejemplo 5. Disolución de los núcleos de óxido de gadolinio recubiertos con polisiloxano, directamente utilizando un gran exceso de DTPABA**

50 Las partículas se sintetizan de acuerdo con el protocolo descrito en el ejemplo 2, pero varían la cantidad de DTPABA añadida para la funcionalización. Esta cantidad varía de una relación DTPABA/APTES de 0,5 a 3. El número de APTES se elige como parámetro puesto que representa el número de funciones potencialmente reactivas en la superficie de las partículas.

55 La figura 23 adjunta muestra la variación del tamaño (a la izquierda) y la señal de relajometría (a la derecha), con el número de DTPABA añadido para la funcionalización. La señal de relajometría se mide en solución acuosa diluida por 10. Para pequeñas cantidades de DTPABA, las nanopartículas conservan un tamaño grande. En cambio, para las cantidades de DTPABA elevadas, el tamaño de las partículas que se ven en PCS disminuye ya que el núcleo de las partículas se disuelve. Para los valores de 2 y 3 DTPABA/APTES, el núcleo de las partículas se destruye por completo, y el tamaño de las partículas se estanca a aproximadamente 2 nm. La señal de relajometría de las partículas disminuye proporcionalmente con el tamaño, lo que refleja la disminución proporcional de la cantidad de gadolinio presente en los núcleos.

60

Ejemplo 6. Funcionalización de los núcleos de óxido de gadolinio con DOTA-NHS y purificación



Alrededor de los núcleos de óxido de gadolinio del ejemplo 1, se sintetiza una capa de polisiloxano funcionalizado por vía sol-gel. Para hacer esto, la solución de los núcleos de 750 ml se calienta a 40 °C en un baño de aceite, con agitación. 787 µl de APTES acoplado a 0,75 mg de fluoresceína isotiocianato (FITC), 502 µl de TEOS y 1913 µl de una solución acuosa de trietilamina a 0,1 mol/l se añaden a la solución de núcleos. Estas adiciones se repiten una segunda vez después de 24 horas de espera y una tercera vez después de 48 horas de espera. La solución se deja luego durante 48 horas a 40 °C con agitación. Se obtienen partículas de núcleo-coraza que tienen un tamaño de aproximadamente 5 nm, con funciones de amina en superficie. La figura 12 adjunta muestra la distribución de tamaños de los núcleos recubiertos con polisiloxano, medida en DEG por PCS; promedio: 4,7 nm.

1,12 g de DOTA-NHS se dispersan en 20 ml de etanol anhidro. Luego se añaden 100 ml de la solución de núcleos de óxido de gadolinio a la solución de DOTA-NHS. La mezcla se agita durante 24 horas.

Las nanopartículas se precipitan luego en 500 ml de acetona. Luego, la acetona se retira y las partículas se vuelven a dispersar en 20 ml de agua. Luego se purifican por filtración tangencial. Las impurezas de gran tamaño se retiran por filtración con una jeringa, a través de una membrana de 0,2 µm. Se obtienen partículas que tienen un tamaño de aproximadamente 7 nm. La figura 13 adjunta muestra la distribución de tamaño de los núcleos recubiertos con polisiloxano funcionalizados con DOTA-NHS, medida en agua por PCS; promedio: 6,8 nm.

La figura 14 adjunta muestra el seguimiento de la síntesis anterior en granulometría: en línea continua fina (□) la distribución de tamaño de los núcleos solos; línea discontinua (----) la distribución del tamaño de los núcleos recubiertos con polisiloxano; en la línea continua gruesa (-) la distribución de tamaño de los núcleos recubiertos con polisiloxano y funcionalizados con DOTA-NHS.

25 **Ejemplo 7. Disolución del núcleo de partículas de óxido de gadolinio funcionalizadas con DOTA-NHS utilizando DTPA libre**

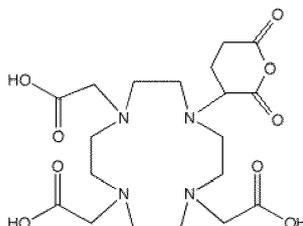
A las partículas del ejemplo 6, dispersadas en agua, se añade DTPA libre con gran exceso. El pH de la solución se ajusta a 7. Se deja agitar una noche.

La solución se purifica por filtración tangencial para eliminar los iones Gd³⁺ que se han disuelto del núcleo de las partículas. Se obtienen partículas que tienen un tamaño de aproximadamente 3,5 nm. La figura 15 adjunta muestra la distribución de tamaño de las partículas disminuidas con la adición de DTPA, medida en agua por PCS; promedio: 3,7 nm.

Además, la señal de las partículas en relajometría r1 disminuyó en un 84 %, lo que indica una fuerte disminución en la cantidad de gadolinio presente en las partículas.

La figura 16 adjunta muestra el experimento de reducción de tamaños: en una línea continua gruesa (-) la distribución de tamaño de las partículas iniciales; en línea continua fina (□) la distribución del tamaño de partículas disminuidas con DTPA libre.

45 **Ejemplo 8. Funcionalización de núcleos de óxido de gadolinio con ácido 2,2',2''-(10-(2,6-dioxotetrahydro-2H-piran-3-il)-1,4,7,10-tetraazacyclododecano-1,4,7-triil)triacético (DOTAGA anhidro)**



Alrededor de los núcleos de óxido de gadolinio del ejemplo 1, se sintetiza una capa de polisiloxano funcionalizado por vía sol-gel. Para hacer esto, la solución de los núcleos de 750 ml se calienta a 40 °C en un baño de aceite, con agitación. 787 µl de APTES acoplado a 0,75 mg de FITC, 502 µl de TEOS y 1913 µl de una solución acuosa de trietilamina a 0,1 mol/l se añaden a la solución de núcleos. Estas adiciones se repiten una segunda vez después de

24 horas de espera y una tercera vez después de 48 horas de espera. La solución se deja luego durante 48 horas a 40 °C con agitación. Se obtienen partículas de núcleo-coraza que tienen un tamaño de aproximadamente 4,5 nm, con funciones amina en superficie. La figura 17 adjunta muestra la distribución de tamaño de los núcleos recubiertos con polisiloxano, medida en DEG por PCS; promedio: 4,7 nm.

5 El tamaño de las partículas también se mide por TEM. La figura 18 adjunta muestra la imagen en TEM de los núcleos recubiertos con polisiloxano, dispersos utilizando el injerto de polietilenglicol; los tamaños observados están comprendidos entre 4 y 5 nm.

10 Seguidamente se dispersan 0,619 g de DOTA anhidro en 20 ml de DMSO. Luego, se añaden 100 ml de la solución de núcleos de óxido de gadolinio a la solución DOTAGA anhidro. La mezcla se agita durante 24 horas.

Ejemplo 9. Purificación de partículas de óxido de gadolinio funcionalizadas con DOTA anhidro

15 Las nanopartículas del ejemplo 8 se precipitan en 500 ml de acetona. Luego, la acetona se retira y las partículas se vuelven a dispersar en 20 ml de agua. Luego se purifican por filtración tangencial. Las impurezas de gran tamaño se retiran por filtración con una jeringa, a través de una membrana de 0,2 µm. Se obtienen partículas que tienen un tamaño de aproximadamente 6,5 nm. La figura 19 adjunta muestra la distribución de tamaño de los núcleos recubiertos con polisiloxano, funcionalizados con DOTA anhidro, medida en agua por PCS; promedio: 6,3 nm.

20 La figura 1 adjunta muestra la imagen en TEM de los núcleos recubiertos con polisiloxano, funcionalizados con DOTAGA anhidro; los tamaños observados están comprendidos entre 3 y 5 nm. Las moléculas de DOTA no son visibles en TEM, solo se aprecian núcleos recubiertos.

25 La figura 20 adjunta muestra el seguimiento de la síntesis en granulometría: en una línea continua gruesa (-) la distribución de tamaño de los núcleos solo; en línea continua fina (□) la distribución de tamaño de los núcleos recubiertos con polisiloxano; en la línea discontinua (----) la distribución de tamaño de los núcleos recubiertos con polisiloxano y funcionalizados con DOTAGA anhidro.

30 El análisis químico realizado por EDX da una relación atómica de gadolinio/silicio de 57,2 %.

La solución de nanopartículas se puede almacenar durante varios meses en el refrigerador después de la liofilización.

Ejemplo 10. Disolución del núcleo de partículas de óxido de gadolinio funcionalizadas con DOTAGA anhidro utilizando DTPA libre

35 Se prepara una solución de DTPA en agua, luego el pH de la solución se reduce a 6. A las partículas del ejemplo 8, dispersadas en la mezcla de disolventes DEG y DMSO, se añadió una solución de DTPA con gran exceso. Se deja agitar una noche.

40 La solución se purifica por filtración tangencial para eliminar los iones Gd³⁺ que se han disuelto del núcleo de las partículas. Al mismo tiempo, las partículas se pasan a agua. Se obtienen partículas que tienen un tamaño de aproximadamente 3,5 nm. La figura 21 adjunta muestra la distribución de tamaño de las partículas disminuidas con la adición de DTPA, medida en agua por PCS; promedio: 3,6 nm.

45 La figura 2 adjunta muestra la imagen en TEM de las partículas cuyo tamaño ha disminuido. La imagen fue tomada en las mismas condiciones que las anteriores. Además, el análisis químico local indica la presencia de gadolinio en una cantidad significativa en la ubicación observada, pero no hay partículas visibles. Por lo tanto, las partículas ya no tienen un núcleo cristalizado en este estadio.

50 La figura 22 adjunta muestra el experimento de reducción de tamaños: en una línea continua gruesa (-) la distribución de tamaño de las partículas iniciales; en una línea continua fina (□) la distribución del tamaño de partícula disminuidas con DTPA libre.

55 Además, la señal de las partículas en relajometría r1 disminuyó en un 71 %. Esto refleja una fuerte disminución en la cantidad de gadolinio presente en las partículas.

60 Por otra parte, el análisis químico realizado por EDX da una relación atómica de gadolinio/silicio de 24,1 %. Con respecto a las partículas del ejemplo 9, se observa que un 58 % del gadolinio se disolvió así por la complejación de DTPA.

Ejemplo 11. Síntesis directa de nanopartículas funcionalizadas con DOTAGA anhidro, sin núcleo

65 Las nanopartículas se sintetizan de acuerdo con el protocolo descrito en el ejemplo 8, pero la funcionalización de la superficie se realiza con un gran exceso de **DOTAGA anhidro** (2 DOTA/Gd). De este modo, todos los átomos de Gd

están directamente complejados por moléculas de DOTA, y queda una parte significativa de DOTA sin complejar.

La solución se coloca en una membrana de diálisis de 4-6 kDa y se purifica por diálisis en un volumen de agua permutada diez veces más grande. El baño de diálisis se renueva dos veces, después de 24 h y 48 h. La diálisis se detiene después de 72 h.

Se recupera el contenido de las membranas de diálisis. La solución aparece ligeramente turbia, se filtra a través de un filtro de 0,2 μm para eliminar las impurezas y las partículas de gran tamaño. El tamaño final de las nanopartículas es de aproximadamente 3 nm. La figura 24 adjunta muestra la distribución de tamaño de las partículas funcionalizadas con DOTA anhidro, medida en agua por PCS; promedio: 2,7 nm.

Por otra parte, cuando las partículas se centrifugan en tubos de Vivaspín, se observa que no son retenidas por una membrana de 10 kDa. En cambio, son retenidas por una membrana de 5 kDa.

El análisis químico realizado por EDX da una relación atómica de gadolinio/silicio de 29,3 %.

Finalmente, las imágenes de TEM muestran que no hay núcleo visible alguno en estas partículas, mientras que el análisis químico local demuestra la presencia de gadolinio en estas zonas.

La solución de nanopartículas se puede almacenar durante varios meses en el refrigerador después de la liofilización.

Ejemplo 12. Dopaje de la señal magnética de las partículas funcionalizadas con DOTAGA anhidro, sin núcleo

El cloruro de gadolinio se disuelve en agua y el pH de la solución se reduce a 6. Los iones Gd^{3+} así obtenidos se añaden a las partículas del ejemplo 11, en exceso. La solución se deja agitar durante 24 horas. La solución se purifica por filtración tangencial para eliminar los iones Gd^{3+} que no se habrían unido a las moléculas de DOTA.

Después del tratamiento con iones Gd^{3+} , la señal de relajometría r_1 de las partículas aumentó en un 66 %. Por otra parte, el análisis químico realizado por EDX en estas partículas da una relación atómica de gadolinio/silicio de 47,5 %, un aumento del 62 % con respecto a las partículas del ejemplo 11. Estas dos mediciones concordantes muestran que había muchas moléculas de DOTA libres en la superficie de las partículas, y que estos DOTA podrían servir para la complejación de iones Gd^{3+} libres.

Ejemplo 13. Angiografía

Se redispersó un lote liofilizado de nanopartículas del ejemplo 12, que contenía 7 μl de gadolinio, en 90 μl de agua. Una rata Fisher se anestesió con isoflurano® (anestésico gaseoso) y la solución de nanopartículas se inyectó en la vena caudal. La rata fue entonces sometida a un examen por IRM (secuencia t_1) para un estudio angiográfico. Se observó un aumento significativo de la señal a nivel de la arteria cerebral media en este animal en comparación con los animales de control.

Ejemplo 14. Dopaje con europio de las partículas funcionalizadas con DOTAGA anhidro, sin núcleo

El cloruro de europio se disuelve en agua y el pH de la solución se reduce a 6. Los iones Eu^{3+} así obtenidos se añaden a las partículas del ejemplo 11, en exceso. La solución se deja agitar durante 24 horas. La solución se purifica por filtración tangencial para eliminar los iones Eu^{3+} que no estarían unidos a las moléculas de DOTA.

Después del tratamiento con iones Eu^{3+} , el análisis químico realizado por EDX en estas partículas da una relación atómica de gadolinio/silicio de 20,1 % y una relación de europio/silicio de 28,8 %. Esta medida muestra que había moléculas de DOTA libres en la superficie de las partículas, y que podrían ser queladas por adición de iones Eu^{3+} libres. Por otra parte, la relación total de tierras raras/silicio obtenida es de 48,9 %, que es consistente con la relación de tierras raras/silicio de las partículas del ejemplo 12, que es de 47,5 %. Esto da una estimación del número total de DOTA en la superficie de las partículas.

Una medición de fluorescencia en tiempo resuelto muestra que los iones Eu^{3+} se encuentran principalmente en el estado complejado de la solución. La figura 25 adjunta muestra este espectro de fluorescencia. El aparato utilizado para la fluorescencia en tiempo resuelto es un aparato fabricado por AXINT, para las necesidades específicas del laboratorio.

Se llevaron a cabo experimentos de dopaje similares con iones de cobre y galio, y se demostró que era posible complejar estos iones también en DOTA libres.

Ejemplo 15. Síntesis directa de nanopartículas funcionalizadas con DOTA anhidro, sin núcleo, con saturación de DOTA de superficie en gadolinio

Las nanopartículas se sintetizan de acuerdo con el protocolo descrito en el ejemplo 8, pero la funcionalización de la superficie se realiza con un gran exceso de DOTAGA anhidro (2 DOTAGA/Gd). Así, todos los átomos de Gd son consumidos directamente por los complejos de DOTA.

- 5 Las nanopartículas se precipitan en bidones de 500 ml de acetona. Luego se retira la acetona y se redispersan las partículas en agua. Luego se purifican por filtración tangencial. Las impurezas de gran tamaño se retiran por filtración con una jeringa, a través de una membrana de 0,2 μm . La figura 31 adjunta muestra la distribución de tamaño de las partículas funcionalizadas con DOTAGA anhidro, medida en agua por PCS; promedio: 2,8 nm.
- 10 La solución de nanopartículas se puede almacenar durante varios meses en el refrigerador después de la liofilización.

Ejemplo 16. Marcaje celular

- 15 Los linfocitos humanos T2 (ATCC n.º CRL-1992™) se incubaron en HBSS (solución salina equilibrada de Hank) durante 1 h con las nanopartículas del ejemplo 15 (NP15), con concentraciones de gadolinio de 0,2; 0,5 y 1 mM. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces en HBSS.

20 La viabilidad se evaluó mediante el recuento en rejillas de Malassez después de la adición de azul tripán (dilución 1/20). Para las tres concentraciones de gadolinio presentes en el medio de incubación, la viabilidad celular fue buena puesto que superior a 90 %. En este intervalo de concentración, las nanopartículas del ejemplo 15 no eran tóxicas.

25 La figura 29 adjunta muestra la tasa de viabilidad de los linfocitos T2 para cada condición de incubación.

Después de evaluar la viabilidad, las células se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4 % y luego se evaluó la eficacia del marcaje midiendo el tiempo de relajación longitudinal T_1 . Cuanto más elevada fuese $r_1 = 1/T_1$, mejor era el marcaje. El marcaje con las nanopartículas del ejemplo 15 fue, por lo tanto, mejor que con los complejos Gd-DOTA. En la concentración de 1 mM, el aumento de la señal fue del 15 % con 50.000 células/mm³. La figura 30 adjunta muestra la eficacia de marcaje de las partículas del ejemplo 15 en comparación con los complejos Gd-DOTA, y en función de la concentración de gadolinio.

35 Por otra parte, la relaxividad de las partículas del ejemplo 15 se midió en relajometría, midiéndose las cantidades reales de gadolinio por ICP, en un aparato Varian 710-ES. Se obtiene una relaxividad r_1 (de la especie de gadolinio) = 11,4 s⁻¹mM⁻¹ (gadolinio)⁻¹.s⁻¹ a 50MHz, es decir, aproximadamente tres veces más elevada que la del complejo Gd-DOTA solo (reducida a la especie de gadolinio), que es de 3,8 s⁻¹mM⁻¹ (gadolinio)⁻¹.s⁻¹ a 50 MHz.

Ejemplo 17. Síntesis de las nanopartículas funcionalizadas con DOTAGA anhidro, sin núcleo, en dos etapas sucesivas

40 Las nanopartículas se sintetizan de acuerdo con el protocolo descrito en el ejemplo 8, pero la funcionalización de la superficie se realiza con una cantidad de DOTA igual a 0,6 DOTAGA/Gd.

45 Se preparó una solución de 240 ml de agua que contenía DTPA en un exceso muy grande. El pH de la solución se ajustó a 6,5. Esta solución se añadió a 160 ml de la solución de nanopartículas. La mezcla se agitó durante 48 h. De este modo, el DTPA libre en un exceso muy grande permitió disolver el núcleo de las partículas por complejación forzada.

50 La solución se purificó luego por filtración tangencial. Las impurezas de gran tamaño se retiraron por filtración con una jeringa, a través de una membrana de 0,2 μm . La figura 32 adjunta muestra la distribución de tamaño de las partículas funcionalizadas con DOTA anhidro, medida en agua por PCS; promedio: 3,5 nm.

55 La solución de nanopartículas se puede almacenar durante varios meses en el refrigerador después de la liofilización.

Por otra parte, la relaxividad de las partículas se midió en relajometría, midiéndose las cantidades reales de gadolinio por ICP. Se obtiene una relaxividad r_1 (de la especie de gadolinio) = 11,8 s⁻¹mM⁻¹ (gadolinio)⁻¹.s⁻¹ a 50MHz, es decir, aproximadamente tres veces más elevada que la del complejo Gd-DOTA solo (reducida a la especie de gadolinio), que es de 3,8 s⁻¹mM⁻¹ (gadolinio)⁻¹.s⁻¹ a 50 MHz.

Ejemplo 18. Síntesis del núcleo de óxido de lutecio

60 Se prepara una solución disolviendo una cantidad de 2,25 g de sal de cloruro de lutecio (LuCl₃, 6H₂O) en un volumen de 245 ml de DEG. En la solución obtenida, se lleva a cabo una adición de 245 ml de una solución de sosa a 0,08 mol/l en DEG a temperatura ambiente durante 10 h.

El tamaño final de las nanopartículas es de aproximadamente 5 nm. La figura 26 adjunta muestra la distribución de tamaños de los núcleos de óxido de lutecio, medida en DEG por PCS; promedio: 5,0 nm.

Ejemplo 19. Funcionalización de los núcleos de óxido de lutecio con DTPABA

5 Los 490 ml de solución de núcleo de lutecio del ejemplo 18 se diluyen en dos con 490 ml de DEG. Alrededor de estos núcleos, se sintetiza una capa de polisiloxano funcionalizado por vía sol-gel. Para hacer esto, la solución de los núcleos se calienta a 40 °C en un baño de aceite, con agitación. 811 µl de APTES, 516 µl de TEOS y 1965 µl de una solución acuosa de trietilamina a 0,1 mol/l se añaden a la solución de núcleos. La solución se deja luego durante
10 48 horas a 40 °C con agitación.

Se obtienen partículas de núcleo-coraza que tienen un tamaño de aproximadamente 8 nm con funciones amina en superficie. La figura 27 adjunta muestra la distribución de tamaños de los núcleos de óxido de lutecio recubiertos con polisiloxano; promedio: 8,3 nm.

15 Acto seguido se dispersan 0,1 g de DTPABA en 2 ml de DMSO. Luego se añaden 12 ml de la solución de núcleos a la solución de DTPABA. La mezcla se agita durante 24 horas.

20 Las nanopartículas se precipitan luego en 100 ml de acetona. Luego, la acetona se retira y las partículas se vuelven a dispersar en 20 ml de agua. Luego se purifican por filtración tangencial. Se obtienen partículas que tienen un tamaño de aproximadamente 2,5 nm. El DTPABA, en gran exceso en comparación con el lutecio (4 DTPABA/Lu), disolvió el núcleo de las partículas en parte, de ahí su pequeño tamaño. La figura 28 adjunta muestra la distribución de tamaños de las partículas funcionalizadas con DTPA; promedio: 2,4 nm.

25 La solución de nanopartículas se puede almacenar durante varios meses en el refrigerador después de la liofilización.

Ejemplo 20. Complejación de partículas de óxido de lutecio con iones Gd³⁺

30 El cloruro de gadolinio se disuelve en agua y el pH de la solución se reduce a 6. Los iones Gd³⁺ así obtenidos se añaden a las partículas de lutecio del ejemplo 19, en exceso. La solución se deja agitar 24 h. La solución se purificó por filtración tangencial para eliminar los iones Gd³⁺ que no se habrían unido a las moléculas de DTPABA.

35 Las partículas iniciales de lutecio no mostraron ninguna señal en relajometría. En cambio, después del tratamiento con iones Gd³⁺, aparece una señal de T₁ = 130 ms en relajometría, después de una dilución de la solución por 10. Esta observación confirma la presencia de moléculas de DTPABA injertadas en las partículas, que forman complejos con los iones Gd³⁺ añadidos a la solución.

REIVINDICACIONES

1. Nanopartículas
que comprende cada una

- 5
- una matriz de poliorganosiloxano (POS) que incluye cationes M^{n+} ($n = 2$ a 6), preferentemente de tierras raras, opcionalmente asociado con cationes dopantes D^{m+} ($m = 2$ a 6), preferentemente una tierra rara distinta de M , un actínido y/o un elemento de transición;
 - un injerto de funcionalización C^1 quelante que es:
 - * derivado de un agente quelante $C1$,
 - * vinculado a la matriz POS por un enlace covalente $-Si-C-$,
 - * y en cantidad suficiente para poder complejar todos los cationes M^{n+} y D^{m+} ;
- 10

15 y **caracterizadas por que** no comprenden un núcleo cristalizado, y **por que** su diámetro d_1 está comprendido entre 1 y 10 nm.

2. Nanopartículas de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizadas por que** la matriz POS de cada nanopartícula se obtiene a partir de una nanopartícula precursora de diámetro d_0 que comprende:

- 20
- un núcleo a base de óxido y/u oxohidróxido metálico, al menos en parte en forma catiónica M^{n+} ($n = 2$ a 6), opcionalmente dopado con un dopante (D),
 - al menos una capa de recubrimiento a base de POS;

25 estando dicha nanopartícula sometida a una disolución de su núcleo a base de óxido y/u oxohidróxido metálico, preferentemente mediante un agente modificador del pH y/o un agente quelante $C2$, idéntico o diferente a $C1$, apto para complejar la totalidad o parte de los cationes M^{n+} y D^{m+} , de modo que el diámetro de la nanopartícula se reduce a un valor d_1 comprendido entre 1 y 10 nm.

30 3. Nanopartículas de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizadas porque** su masa molar (en kDa) es superior o igual a 2 kDa e inferior o igual a 20 kDa.

4. Nanopartículas de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizadas por que** su diámetro d_1 está comprendido entre 1 y 5 nm.

35 5. Nanopartículas de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizadas por que** los cationes metálicos M^{n+} y/o los cationes dopantes D^{m+} se seleccionan entre los siguientes grupos de elementos:

- 40 los lantánidos Gd, Dy, Eu, Nd, Yb, Er, Ho, Lu;
Cu, Ag, Au;
Ca, Mg;
Ga, In;
Y;
Bi;
45 Cr, Mo;
Mn, Tc; y,
Fe, Ru, Pt, Rh, Ir.

50 6. Nanopartículas de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizadas por** una relación de % atómico $[(M/Si) \times 100]$ comprendida entre 10 y 40.

7. Nanopartículas de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizadas por que** la relaxividad r_1 por el ion M^{n+} es superior a $5 \text{ mM}^{-1} (\text{del ion } M^{n+}) \cdot \text{s}^{-1}$ preferentemente $10 \text{ mM}^{-1} (\text{del ion } M^{n+}) \cdot \text{s}^{-1}$ para una frecuencia de 20 MHz.

55 8. Nanopartículas de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizadas por que** la relaxividad r_1 por el ion M^{n+} a 60 MHz es superior a la relaxividad r_1 por el ion M^{n+} a 20 MHz.

60 9. Nanopartículas de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizadas por que** M es un elemento de gadolinio Gd y el agente quelante $C1$ se selecciona entre los agentes quelantes del grupo de los ácidos policarboxílicos poliaminados.

10. Procedimiento de obtención de las nanopartículas de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** comprende las siguientes etapas:

- 65 a Síntesis de núcleos a base de óxido y/u oxohidróxido metálico, al menos en parte en forma catiónica M^{n+} ($n = 2$

- a 6), opcionalmente dopado con un dopante (D);
 esta síntesis consiste esencialmente en mezclar una base con una sal de M disuelta en un disolvente preferentemente seleccionado entre el grupo que comprende alcoholes;
- 5 b Recubrimiento de los núcleos de la etapa (a) con poliorganosiloxano (POS) que consiste esencialmente en emplear una técnica de sol/gel de hidrólisis-condensación de especies silícicas y alcoxisilanos, en presencia de una base o de un ácido;
- c Recubrimiento de la funcionalización de los núcleos recubiertos de la etapa (b) que consiste esencialmente en poner estos núcleos recubiertos de la etapa (b) en contacto con un precursor de injertos de funcionalización C¹;
- 10 d Purificación de las nanopartículas recubiertas en exceso/funcionalizadas de diámetro d₀, preferentemente por filtración tangencial, diálisis y/o por precipitación/lavado;
- e Disolución de los núcleos a base de óxido y/u oxohidróxido metálico de nanopartículas recubiertas en exceso/funcionalizadas en la etapa (c) que consiste esencialmente en ponerlos en contacto con un agente modificador del pH y/o un agente quelante C² apto para complejar la totalidad o parte de los cationes Mⁿ⁺ y D^{m+}, de modo que el diámetro d₀ de las nanopartículas se reduce a un valor d₁ comprendido entre 1 y 10 nm;
- 15 Opcionalmente, la adición de una sal catiónica destinada a ser al menos en parte complejada por el agente quelante C¹.
- 20 11. Suspensión de nanopartículas de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 9 y/u obtenidas por el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10.
12. Material sólido obtenido por eliminación del líquido, preferentemente por liofilización de la suspensión de acuerdo con la reivindicación 11.
- 25 13. Líquido inyectable que comprende nanopartículas de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 9 y/u obtenidas por el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10 y/o de la suspensión de acuerdo con la reivindicación 11 y/o preparado a partir del material sólido de acuerdo con la reivindicación 12.

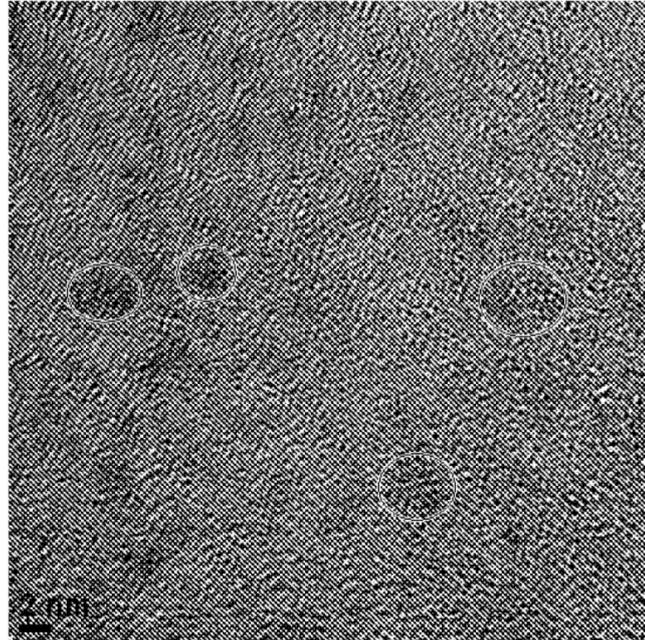


FIG.1

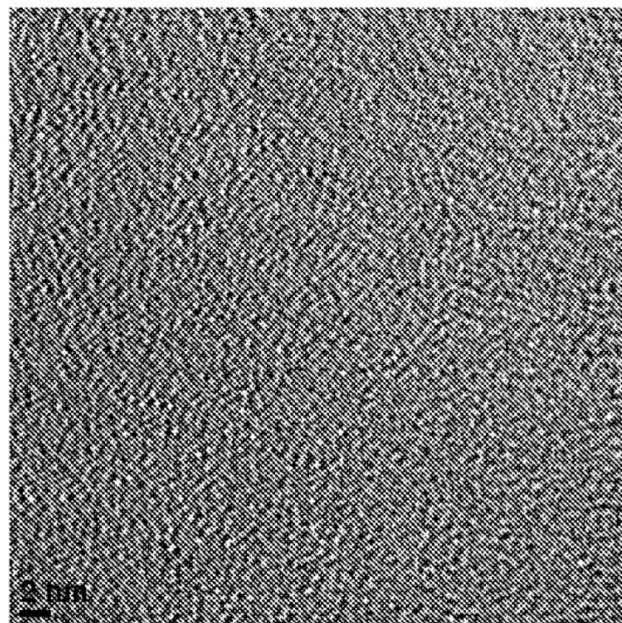


FIG.2

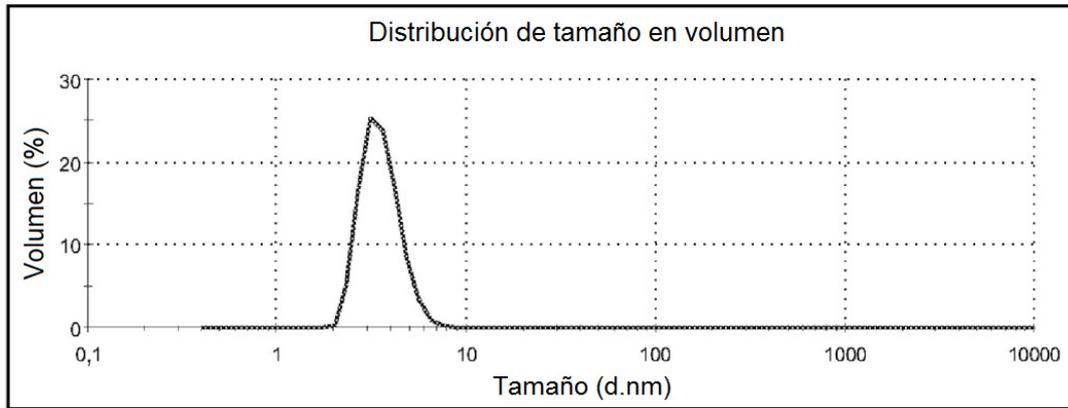


FIG.3

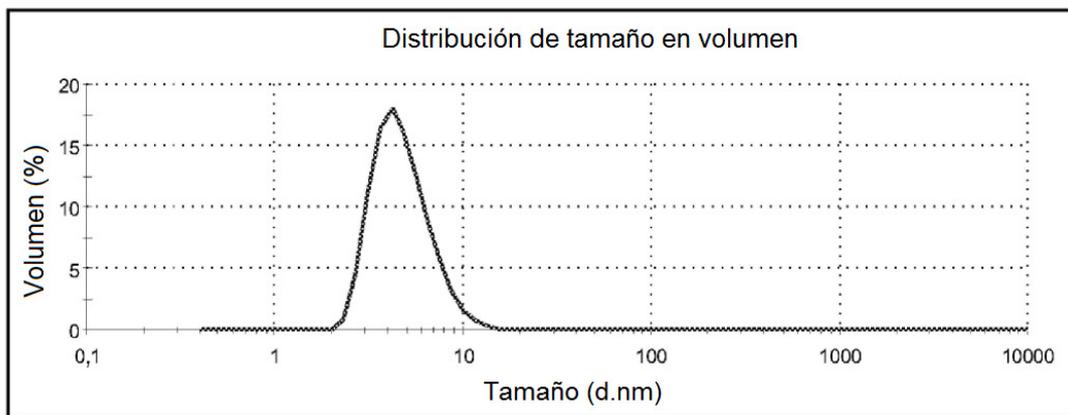


FIG.4

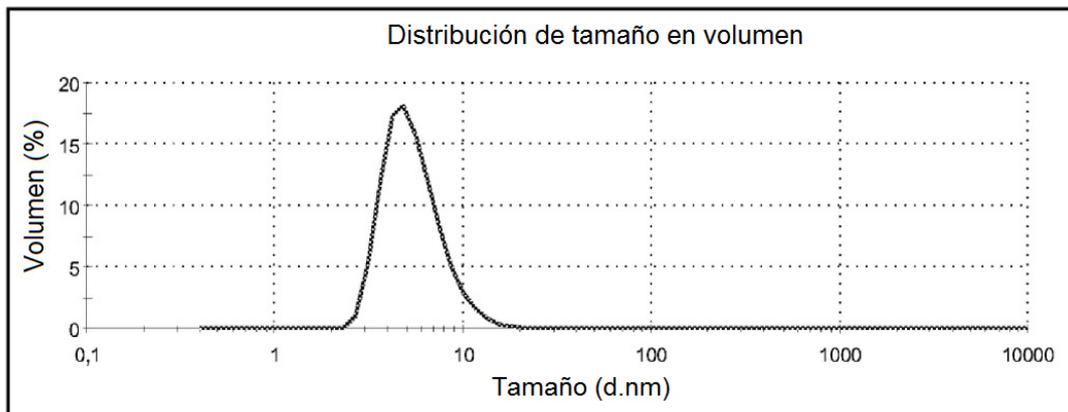


FIG.5

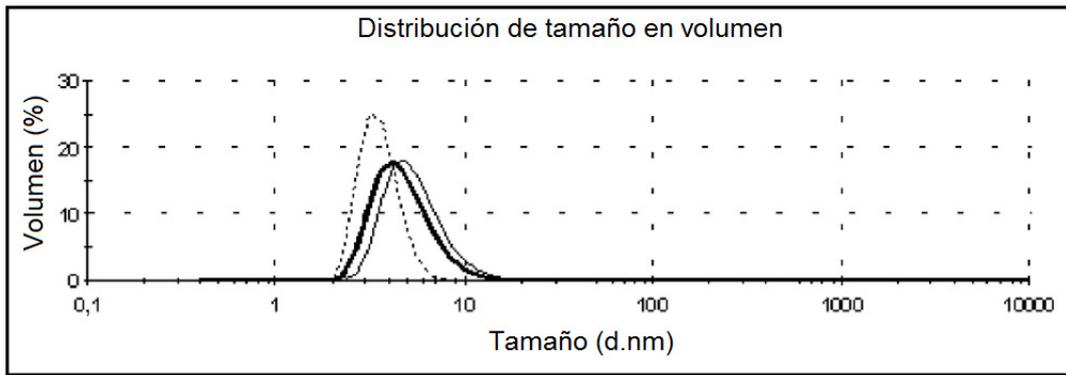


FIG.6

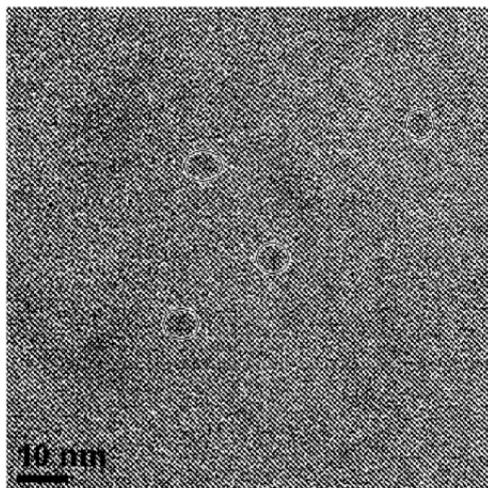


FIG.7

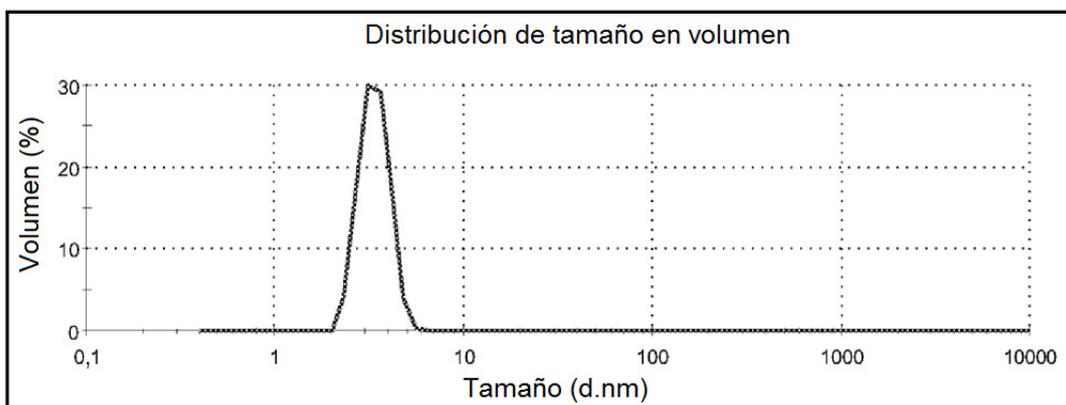
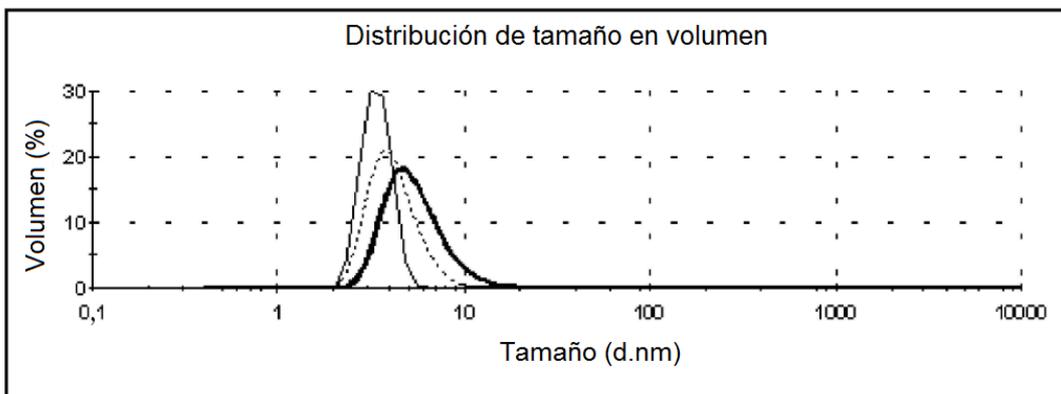
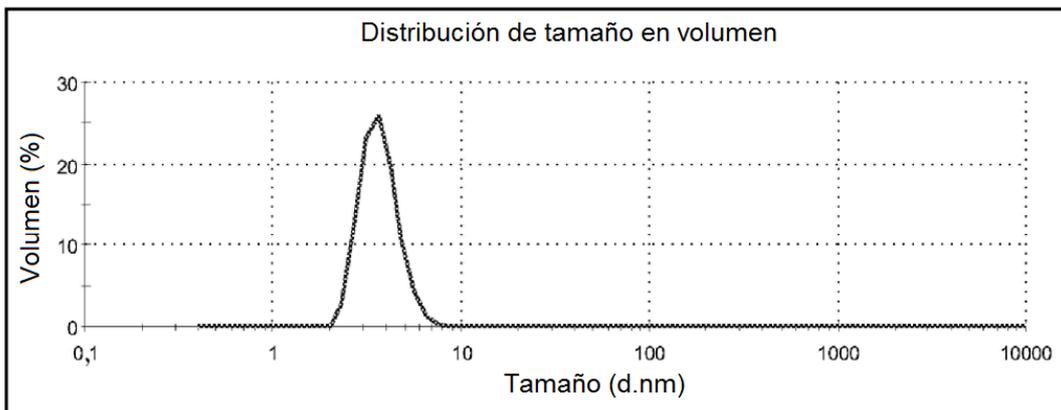
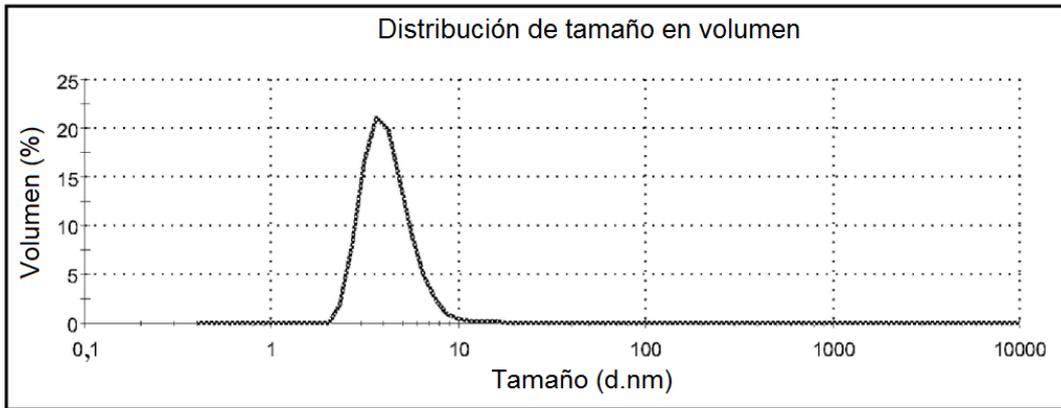


FIG.8



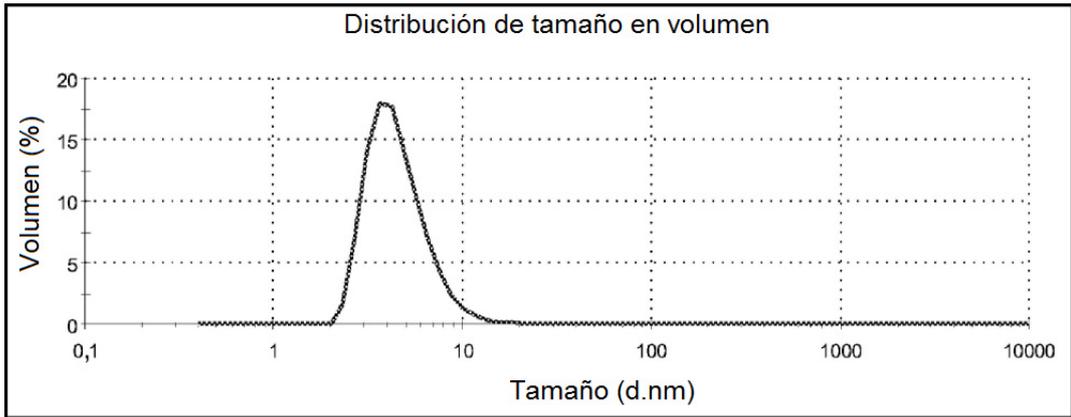


FIG.12

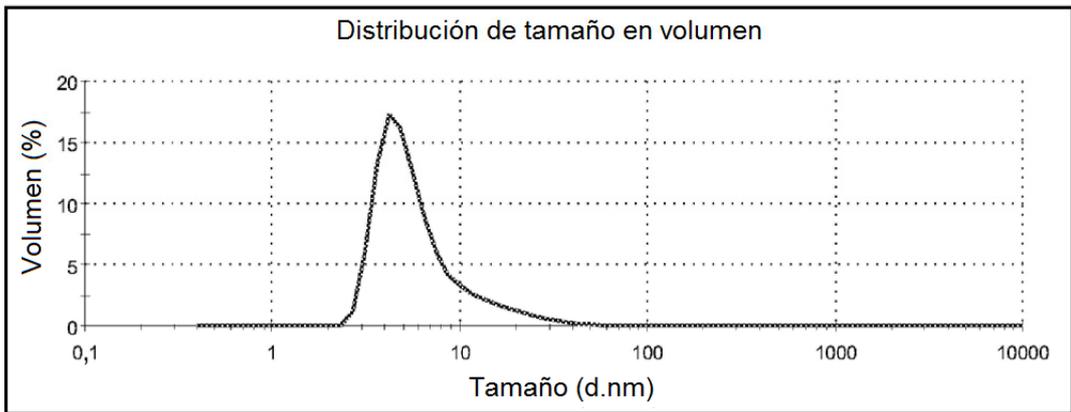


FIG.13

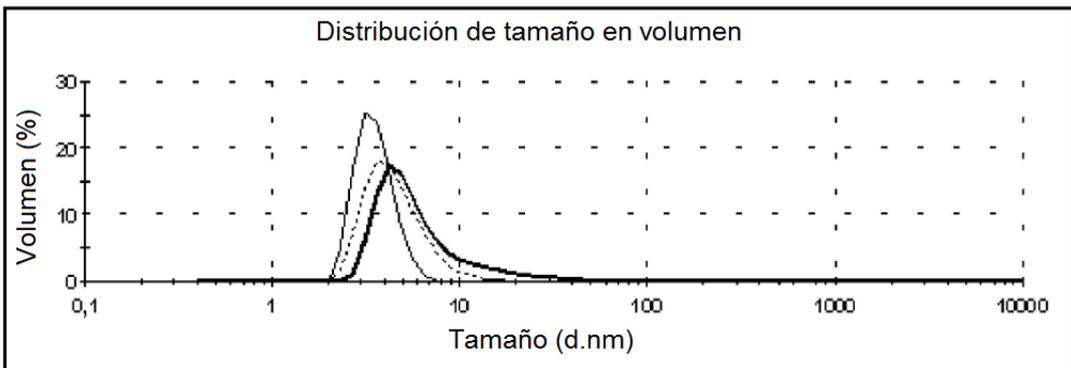


FIG.14

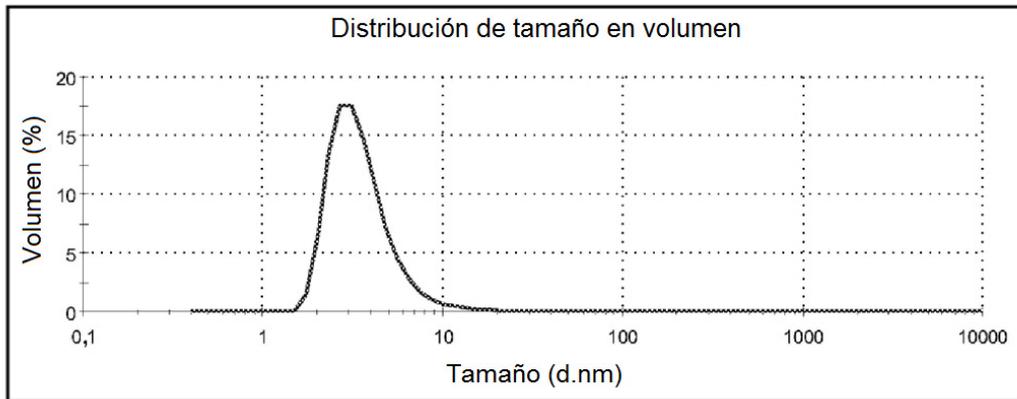


FIG. 15

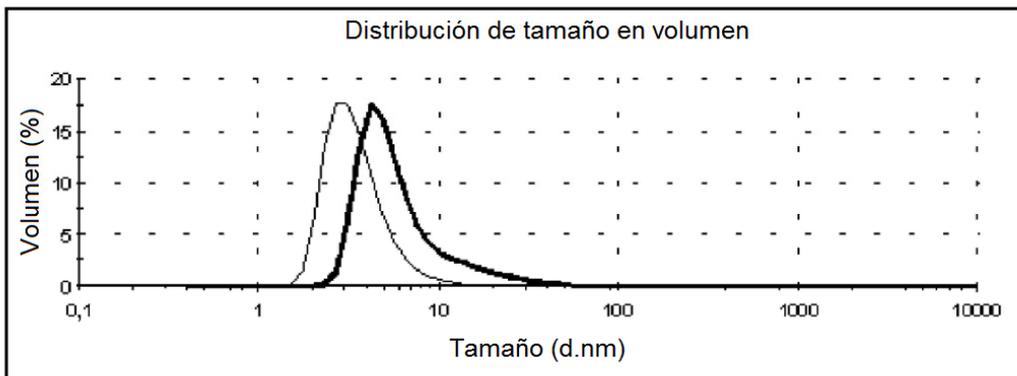


FIG. 16

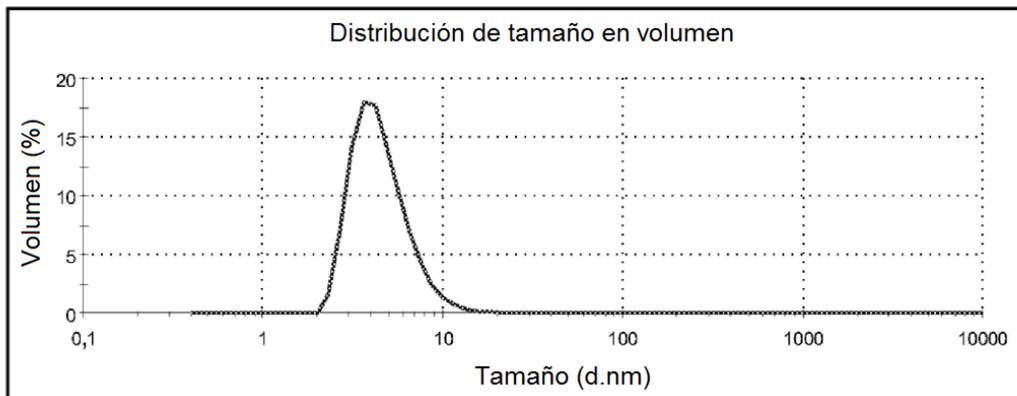


FIG. 17

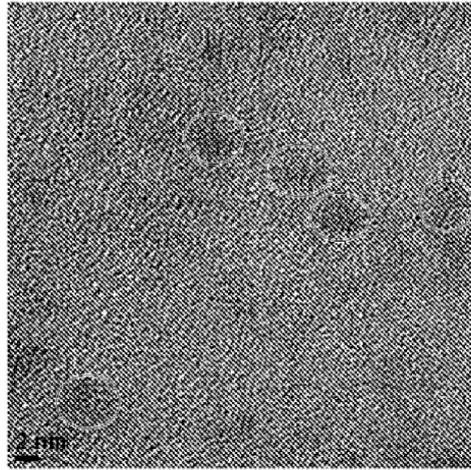


FIG.18

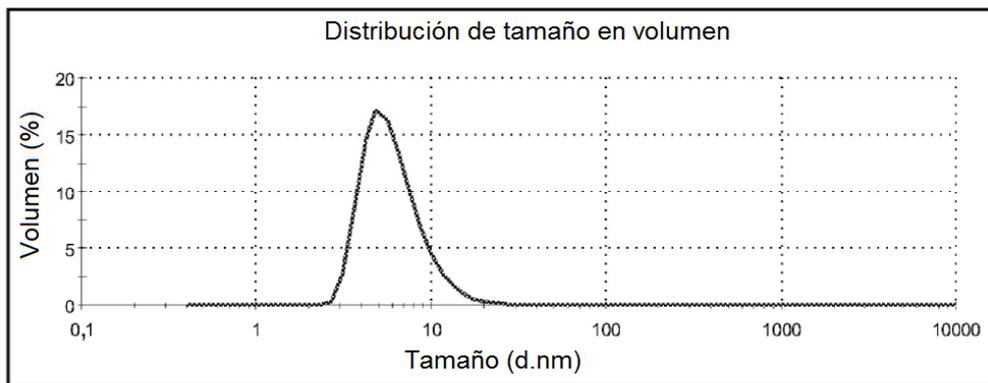


FIG.19

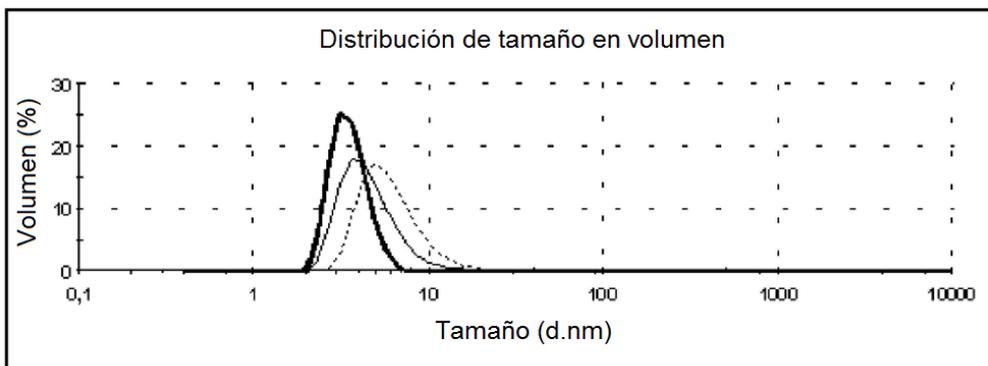
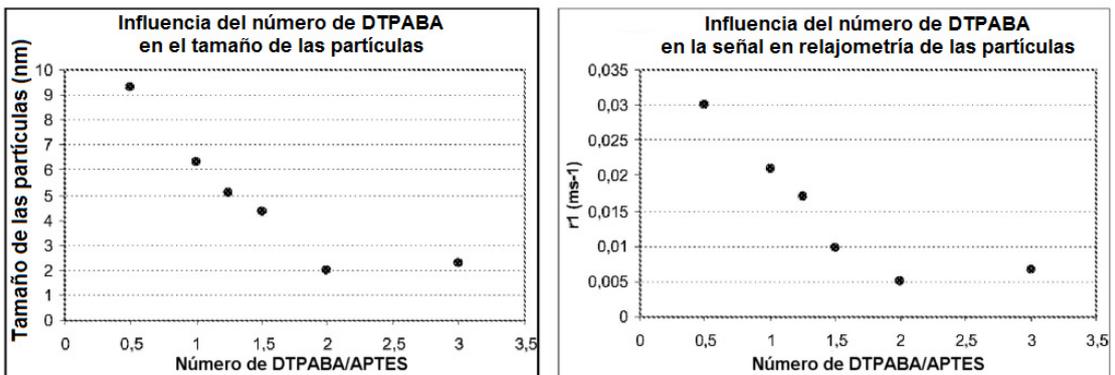
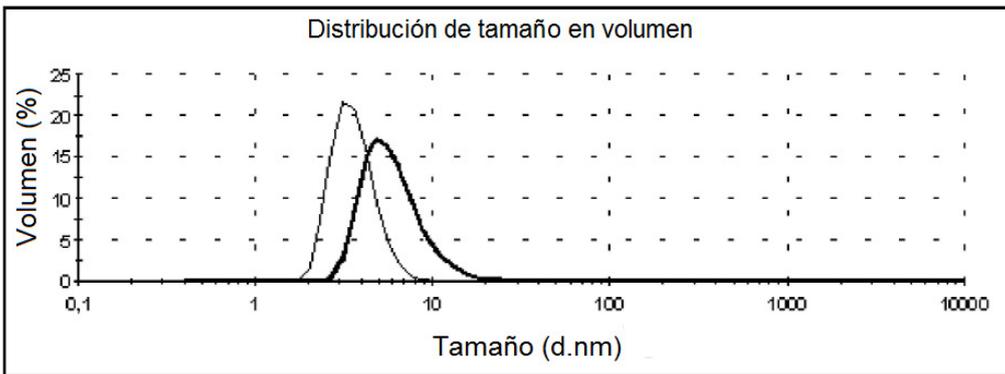
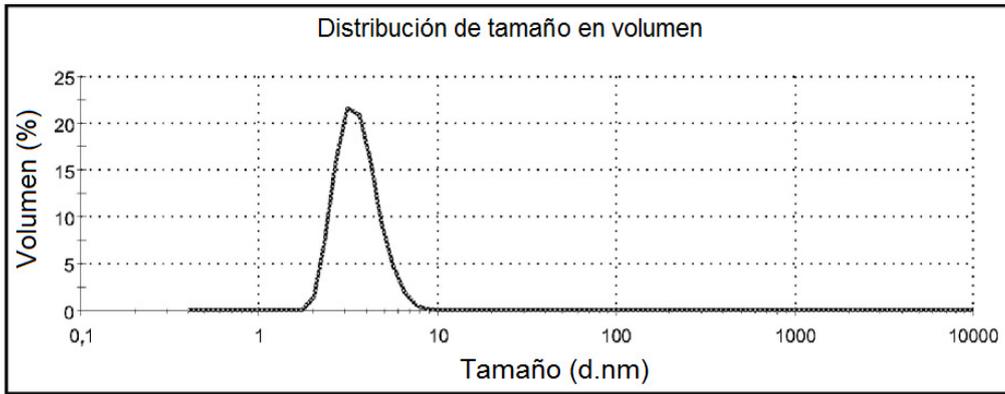


FIG.20



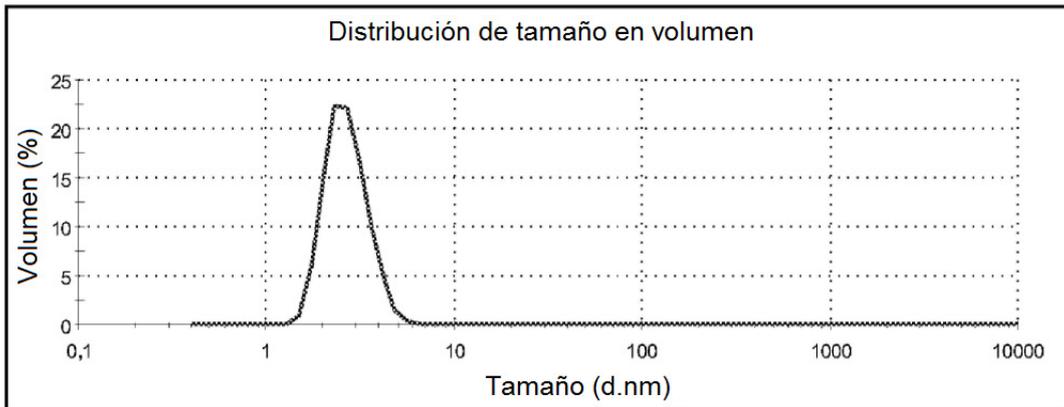


FIG.24

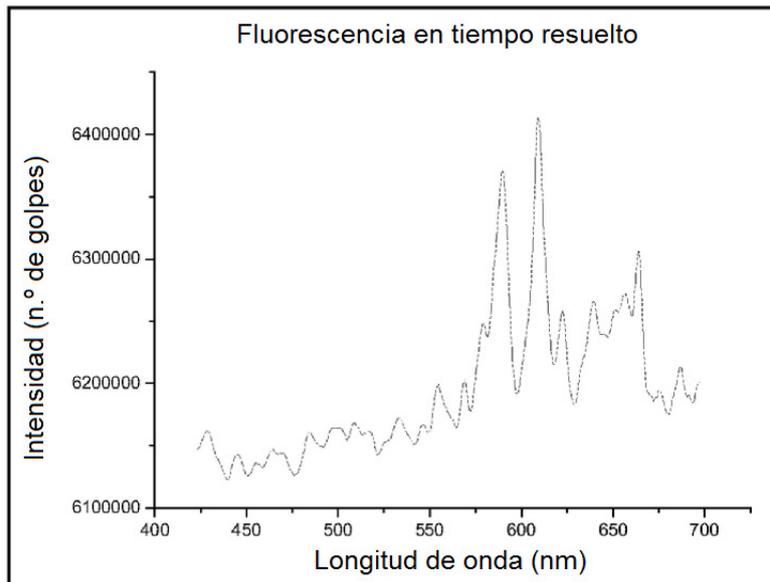


FIG.25

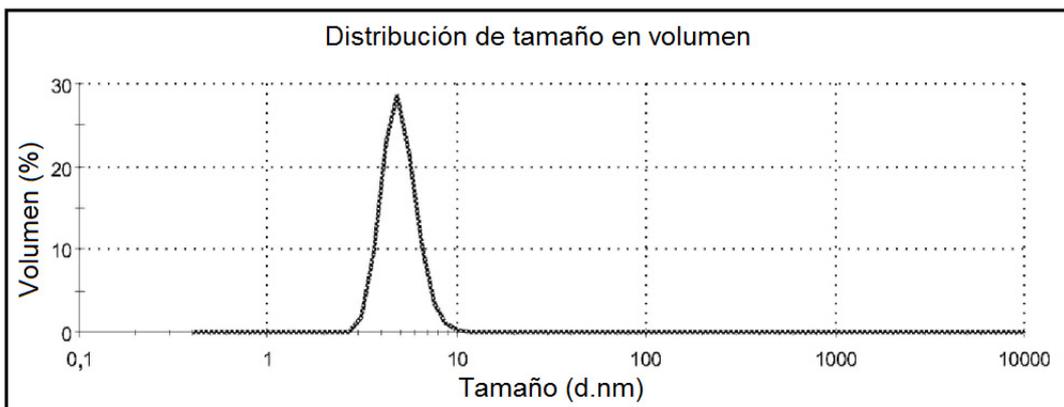


FIG.26

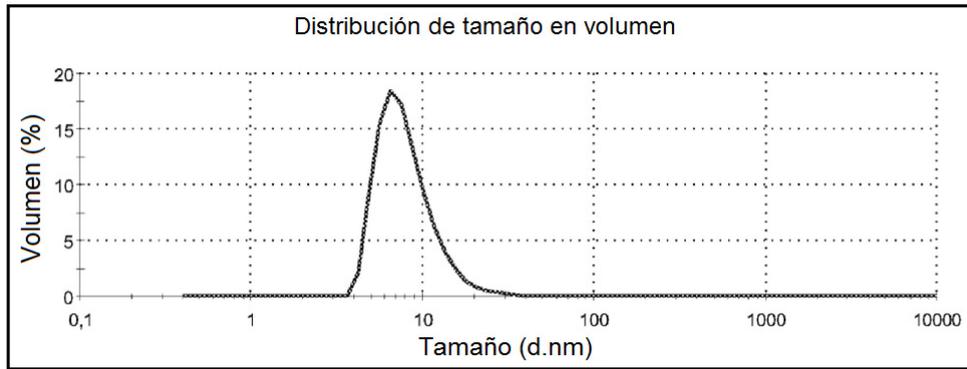


FIG.27

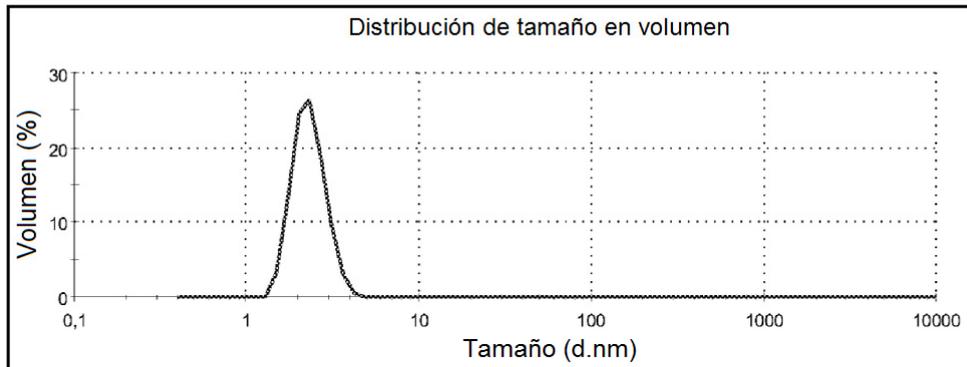


FIG.28

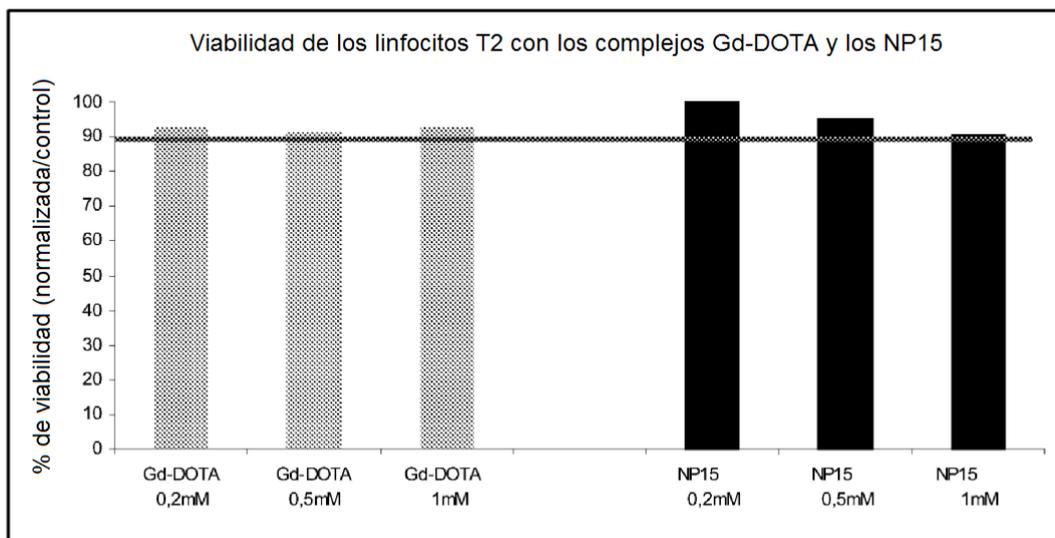


FIG.29

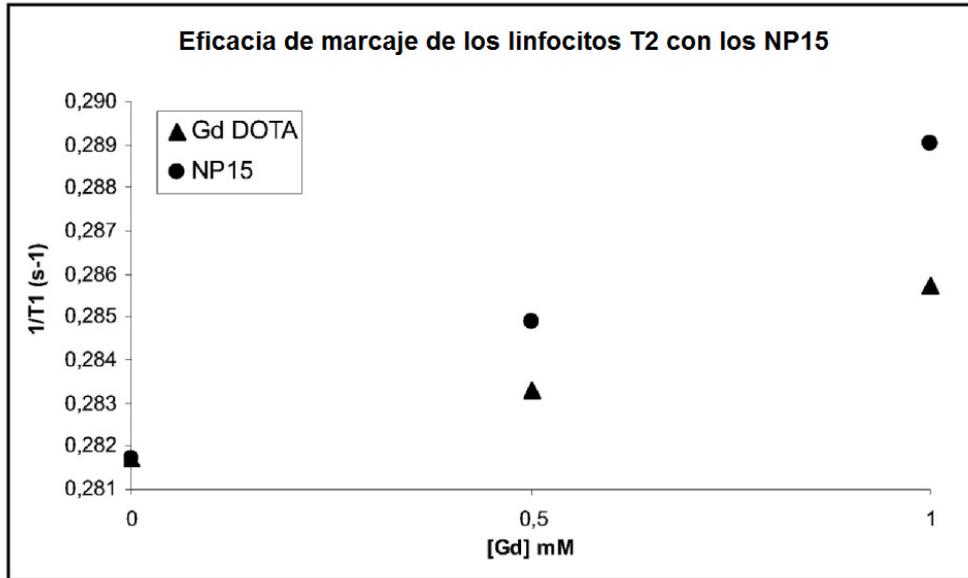


FIG.30

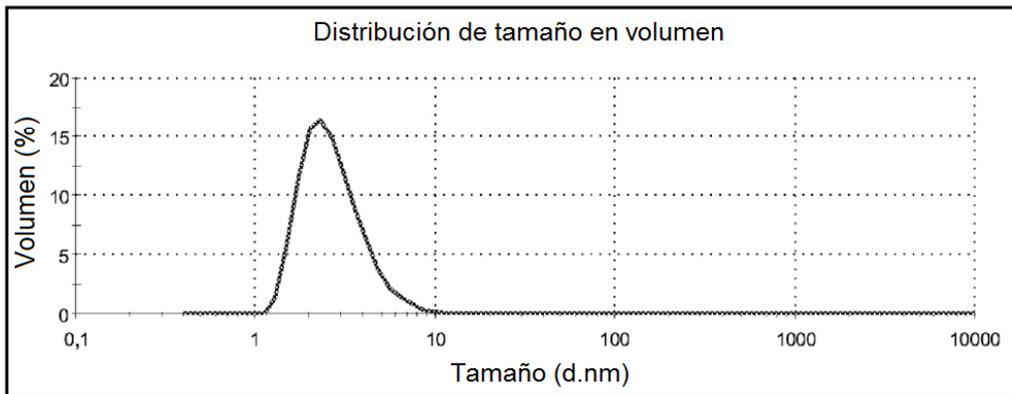


FIG.31

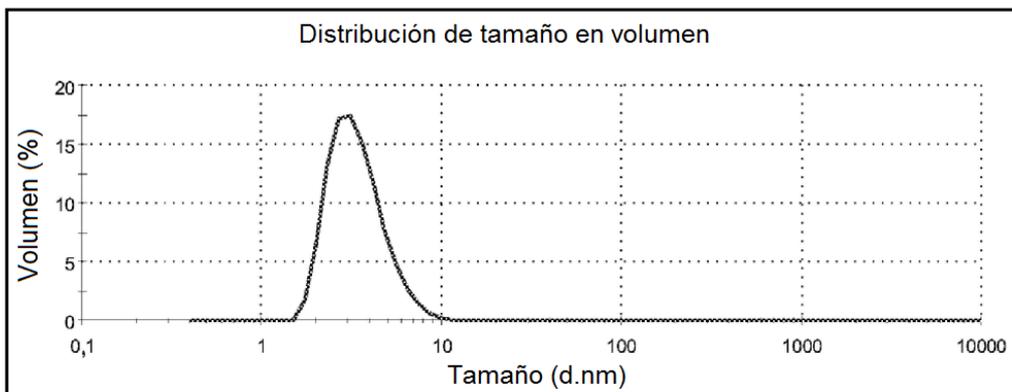


FIG.32