

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 144**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/543** (2006.01)  
**G01N 33/50** (2006.01)  
**G01N 33/58** (2006.01)  
**C07K 16/00** (2006.01)  
**C01B 33/18** (2006.01)  
**B82Y 30/00** (2011.01)  
**C09K 11/02** (2006.01)  
**C09K 11/06** (2006.01)  
**C01B 33/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2003** **E 11156074 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019** **EP 2369342**

54 Título: **Nanopartículas fluorescentes a base de sílice**

30 Prioridad:

**26.11.2002 US 306614**

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

**07.04.2020**

73 Titular/es:

**CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC.**  
**(100.0%)**  
**395 Pine Tree Road, Suite 310**  
**Ithaca, NY 14850, US**

72 Inventor/es:

**WIESNER, ULRICH B. y**  
**OW, HOOISWENG**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 753 144 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Nanopartículas fluorescentes a base de sílice

**Campo de la invención**

5 La invención en general se refiere a nanopartículas, y más específicamente a nanopartículas fluorescentes ligadas, a procedimientos de fabricación de nanopartículas fluorescentes ligadas, y a procedimientos de uso de las nanopartículas fluorescentes ligadas como biomarcadores para, por ejemplo, controlar el desplazamiento o movimiento de componentes celulares en o dentro de sistemas celulares, y para la detección, diagnóstico o tratamiento de enfermedades o afecciones, por ejemplo, en células intactas o vivas.

**Antecedentes de la invención**

10 Las partículas poliméricas fluorescentes y magnéticas tienen utilidad conocida como marcadores e indicadores en diversos ensayos biomédicos. Entre los marcadores más utilizados para clasificar células se encuentran los inmunoconjugados o marcadores inmunológicos que incluyen, por ejemplo, marcadores inmunofluorescentes e inmunomagnéticos, los marcadores inmunofluorescentes incluyen típicamente, por ejemplo, una molécula fluorescente unida a un anticuerpo. Los marcadores inmunomagnéticos típicamente incluyen, por ejemplo, una  
15 partícula superparamagnética unida a un anticuerpo primario o secundario. El marcado celular puede realizarse, por ejemplo, uniendo el anticuerpo a un marcador de interés (por ejemplo, el sitio del receptor) en la superficie de la célula, es decir, un marcador de superficie celular. Sin embargo, la estructura química y física del marcador de la superficie celular y la densidad de los marcadores inmunológicos unidos a la superficie celular en general han sido difíciles de determinar con precisión.

20 Se han preparado marcadores fluorescentes, por ejemplo, incrustando o acoplando covalentemente un colorante fluorescente sobre una partícula polimérica. Las micropartículas fluorescentes resultantes pueden analizarse manualmente o por otros procedimientos conocidos en la técnica, pero preferiblemente usando una técnica automatizada, por ejemplo, citometría de flujo, tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 4,665,024, de Mansour, et al. La versatilidad de las partículas fluorescentes se puede mejorar aún más mediante la  
25 incorporación de múltiples materiales fluorescentes en una sola partícula. Sin embargo, si bien la absorción simple de un solo colorante en una partícula puede ser adecuada para la mayoría de los propósitos, pueden surgir problemas cuando se absorbe más de un colorante en una partícula, incluyendo: emisiones inconsistentes atribuibles, por ejemplo, a la transferencia de energía fluorescente intermolecular; relaciones diferenciales de absorción de fluoróforo atribuibles a diferentes solubilidades de colorante dentro de la matriz polimérica; y cambios inducidos por el sustrato en uno, o ambos espectros, de absorción y emisión del fluoróforo intercalado.

30 Las partículas magnéticas, como los materiales activos magnéticamente conocidos, se pueden enlazar o unir a, por ejemplo, anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales que son específicos de un tipo de célula, antígeno u otras dianas en particular. Los anticuerpos magnéticos resultantes se pueden mezclar con una gran población de muchos tipos de células diferentes, por ejemplo, muestras de tejido en bruto, células cultivadas en un reactor y similares. Por lo tanto, los anticuerpos magnéticos se unen solo a su tipo de célula diana preseleccionado, formando un conjugado anticuerpo magnético-célula. El conjugado se puede separar del resto de la población celular mediante un campo magnético. Una deficiencia de las partículas magnéticas es la falta de especificidad en el marcado magnético en el sentido de que una célula u otro analito biológico diana puede volverse paramagnético por varias  
35 rutas diferentes que pueden confundir el análisis y la información de diagnóstico que ofrece el procedimiento, por ejemplo, mediante la unión de un compuesto paramagnético específico a un hapteno específico en una célula o por unión específica o no específica de un metal paramagnético o complejo metálico directamente a una célula, tal como un microorganismo de unión a metal o por fagocitosis. Otros problemas encontrados con las partículas magnéticas utilizadas en la detección y el diagnóstico incluyen, por ejemplo, la dificultad para obtener una cuantificación altamente precisa de la susceptibilidad magnética de una población celular. Además de sus propiedades magnéticas  
40 (es decir, magnéticas, paramagnéticas y superparamagnéticas), los anticuerpos magnéticos se pueden clasificar, por ejemplo, en tres amplias categorías en función de su tamaño de partícula descendente relativo: marcadores de partículas magnéticas, marcadores magnéticos coloidales y marcadores magnéticos moleculares, véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 6,412,359.

45 Las nanopartículas de látex que tienen un núcleo polimérico y una superficie decorada con, por ejemplo, una molécula de ligando capaz de unirse específicamente con una superficie celular y opcionalmente decorada con material genético, tal como un gen mutante, son conocidas y pueden tener utilidad en, por ejemplo, administración de genes a una célula y expresión en la misma, para alterar tumores, y en aplicaciones de tratamiento relacionadas, véase, por ejemplo, Science, 296, 2404 (2002).

50 Las nanopartículas ópticamente activas, tales como las nanopartículas fluorescentes, que tienen una cubierta eléctricamente conductora y un núcleo de sílice, son conocidas y tienen utilidad, por ejemplo, en la administración modulada de un producto químico y aplicaciones en tratamientos, véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,344,272, y 6,428,811.

Ruxiong et al., Bulletin of the Chemical Society of Japan, 564, no. 4, 1991, páginas 1268-1273 describe el uso de

TiO<sub>2</sub> de nanopartículas para fotomatar células malignas. Srivastava Mamta et. al., Biophysical Journal, 82, no.1, 2002, página 498A describe el uso de nanopartículas a base de sílice altamente fluorescentes con dimensiones de hasta 50 nM o menos que tienen funcionalización de superficie que permite la adsorción directa o la conjugación covalente de proteínas. Estas nanopartículas son adecuadas para medir la dinámica de las moléculas de la superficie celular. Se conocen otras nanopartículas de Rovelyn et. al., Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2, No. 3-4, 2002, páginas 405-49; Verhaegh et. al., Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids, American Chemical Society, Washington, DC, Estados Unidos, 10, No. 5, 1994, páginas 1427-1438; Lal et. Alabama. Materials Chemistry, 12, No. 9, 2000, páginas 2632-2639.

Una desventaja de las nanopartículas de sonda fluorescente existentes es su brillo limitado y su detectabilidad atenuada como sondas fluorescentes en sistemas dispersos, particularmente con nanopartículas fluorescentes individuales.

En la actualidad, existe la necesidad de mejorar las nanopartículas fluorescentes y los procedimientos para la detección y el análisis con las mismas, incluido su uso como marcadores fluorescentes o sondas en medios biológicos dispersos.

### 15 **Sumario de la invención**

La invención proporciona una nanopartícula fluorescente que comprende: un núcleo que comprende un compuesto de silano fluorescente; y una cubierta de sílice en el núcleo. La invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas.

La invención también proporciona una nanopartícula fluorescente que comprende:

20 un núcleo que comprende un compuesto de silano fluorescente; y una cubierta de sílice porosa en el núcleo.

La invención también proporciona una nanopartícula fluorescente que puede incluir además un ligando, tal como un anticuerpo, conjugado o dispuesto como recubrimiento en la superficie de la nanopartícula fluorescente para formar una nanopartícula ligada-fluorescente. Las nanopartículas fluorescentes ligadas o que llevan ligando de la presente invención se pueden usar, por ejemplo, como agentes de diagnóstico de diana altamente específicos y agentes de control de movimiento cuando se combinan con células o componentes celulares.

Un vehículo farmacéutico o vehículo de administración de fármacos puede comprender las nanopartículas fluorescentes o las nanopartículas fluorescentes ligadas de la presente invención.

Un agente de formación de imágenes fluorescentes puede comprender las nanopartículas fluorescentes ligadas de la presente invención.

30 Las nanopartículas fluorescentes ligadas pueden usarse como partículas transportadoras farmacéuticas. Por lo tanto, las nanopartículas fluorescentes ligadas pueden incluir además un agente terapéutico, agente terapéutico que está en la superficie o está conjugado con la superficie de la nanopartícula fluorescente para formar una composición farmacéutica.

35 La invención también proporciona un procedimiento de fabricación de una nanopartícula fluorescente que comprende:

mezclar un compuesto fluorescente, tal como un colorante fluorescente reactivo, y un compuesto de organosilano, tal como un compuesto de organosilano correactivo, para formar un núcleo fluorescente; y

mezclar el núcleo resultante con un compuesto formador de sílice, como un tetraalcoxisilano, para formar una cubierta de sílice en el núcleo.

40 La invención también proporciona un procedimiento para controlar el movimiento de un componente celular de una célula que comprende:

poner en contacto la célula con una nanopartícula fluorescente ligada para formar una célula decorada selectivamente con la nanopartícula fluorescente ligada; y

registrar el movimiento de un lugar fluorescente durante un tiempo.

45 Un procedimiento para tratar la enfermedad puede comprender: administrar a un paciente que necesita tratamiento una cantidad eficaz de una nanopartícula fluorescente ligada, que incluye opcionalmente un agente terapéutico, estando adaptada la nanopartícula para asociarse selectivamente con un componente productor de enfermedad de la célula, para formar una célula decorada selectivamente con la nanopartícula fluorescente ligada; e

iluminar la célula decorada.

50 Un procedimiento de tratamiento puede comprender:

poner en contacto una célula con una nanopartícula fluorescente ligada, nanopartícula que incluye opcionalmente un agente terapéutico, para formar una célula decorada selectivamente con la nanopartícula fluorescente ligada; e

irradiar la célula decorada resultante durante un tiempo.

- 5 La invención también proporciona un kit para usar en la detección de un analito, comprendiendo el kit una nanopartícula fluorescente ligada, como se ilustra en el presente documento.

La invención también proporciona un kit para detectar y controlar un componente de la superficie celular que comprende una nanopartícula fluorescente ligada para detectar el componente de la superficie celular, y opcionalmente un registrador para monitorizar el componente de la superficie celular.

- 10 La invención también proporciona un procedimiento de ensayo para detectar movimiento o un cambio en la ubicación de un componente celular en, o sobre la superficie de una célula cuando la célula se trata con un agente terapéutico que comprende:

poner en contacto una célula con una nanopartícula fluorescente ligada, en donde la nanopartícula incluye un agente terapéutico, para unir la nanopartícula fluorescente ligada a un componente celular; y

- 15 registrar la señal fluorescente.

#### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra que las nanopartículas fluorescentes de la presente invención cubren todo el espectro de absorción UV-Vis.

La Figura 2 ilustra el radio hidrodinámico y el brillo de cada especie determinados por las mediciones de FCS.

- 20 La Figura 3A-C ilustra la accesibilidad del solvente de las nanopartículas fluorescentes.

La Figura 4A-D ilustra el potencial de estas nanopartículas de sílice como marcadores para imágenes biológicas marcando el receptor FcεRI de los mastocitos de leucemia basófila de rata (RBL).

La Figura 5 compara el brillo del colorante libre, las nanopartículas de sílice y los puntos cuánticos con un pico de fluorescencia a 577 nm.

- 25 La Figura 6 ilustra un ejemplo del brillo fluorescente de las nanopartículas fluorescentes de la presente invención en comparación con las partículas de látex.

La Figura 7A ilustra un ejemplo de especificidad de unión de biomolécula de las nanopartículas fluorescentes de la presente invención.

La Figura 7B ilustra un ejemplo de especificidad de unión a biomolécula de partículas de látex comparativas.

- 30 Las figuras 8A-C ilustran la inmovilización de los agentes terapéuticos dentro de las partículas mesoporosas.

#### Descripción detallada de la invención

- Los solicitantes han descubierto nanopartículas fluorescentes y nanopartículas fluorescentes unidas o ligadas de la invención que son útiles para el marcado, detección, identificación, monitorización de movimiento y aplicaciones similares, de diversos analitos biológicos y no biológicos. Las nanopartículas fluorescentes ligadas o unidas de la invención también pueden ser útiles en el tratamiento terapéutico, cuando se usan como vehículos farmacéuticos, por ejemplo, en combinación con un agente terapéutico adecuado.

- La presente invención proporciona nanopartículas que pueden tener arquitecturas multifuncionales útiles, por ejemplo, un núcleo fluorescente de tamaño nanométrico que puede contener opcionalmente otra funcionalidad tal como un componente magnético, una cubierta de sílice que puede tener un rango de espesores útiles y propiedades de superficie, tales como una superficie lisa monolítica o una superficie altamente porosa, y cuya superficie de sílice puede modificarse física o químicamente con, por ejemplo, un ligando o un agente terapéutico.

- La presente invención proporciona la preparación y caracterización de nanopartículas fluorescentes en diversos tamaños adecuados para aplicaciones de seguimiento de partículas individuales (SPT). Se pueden preparar nanopartículas de diversos diámetros con distribuciones de tamaño estrechas. La versatilidad de la ruta preparativa permite la incorporación de diferentes materiales fluorescentes, tales como colorantes, dependiendo de la aplicación de nanopartículas prevista. También se proporcionan procedimientos para la funcionalización de la superficie que permiten la conjugación de ligandos específicos, tales como anticuerpos o proteínas, en las nanopartículas fluorescentes para formar sondas útiles para experimentos específicos de SPT. El procedimiento preparatorio de nanopartículas permite la preparación, por crecimiento de tamaño de nanopartículas sistemático in situ, de nanopartículas fluorescentes en el rango de, por ejemplo, de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 nm, y de

aproximadamente 25 a aproximadamente 100 nm, y rangos más estrechos en el mismo como ilustrado aquí.

Las nanopartículas fluorescentes se pueden conjugar con una molécula o entidad, como un ligando o conector de anticuerpos, para proporcionar una nanopartícula fluorescente unida o ligada que se puede usar para identificar, detectar, identificar (es decir, identificar o especificar con un alto nivel de certeza), controlar o modificar un estado o condición de enfermedad, como la presencia o ausencia de receptores particulares, niveles metabólicos de receptores particulares y componentes similares. La nanopartícula fluorescente unida o ligada se puede conjugar aún más o asociarse con, por ejemplo, un agente terapéutico y se puede usar, por ejemplo, para tratar un estado o afección de enfermedad, tal como mediante la administración del agente terapéutico a un sitio enfermo de una manera altamente específica o localizada y en una concentración relativamente alta con la liberación del agente terapéutico de una manera relativamente controlada. Las nanopartículas fluorescentes ligadas se pueden usar para la administración dirigida de un agente terapéutico a una ubicación deseada en una variedad de sistemas, como dentro o dentro de una célula o componente celular, o dentro del cuerpo de un organismo, como un ser humano, por ejemplo, a través de la barrera hematoencefálica.

En las realizaciones, el agente terapéutico puede absorberse o ambos, tal como los intersticios o poros de la cubierta de sílice, o recubrirse sobre la cubierta de sílice de la nanopartícula fluorescente. En otras realizaciones donde la cubierta de sílice está incompleta, el agente terapéutico puede asociarse con el núcleo fluorescente, tal como por absorción física o por interacción de unión. El agente terapéutico también puede asociarse con el ligando de una nanopartícula fluorescente ligada, si se desea.

Las nanopartículas fluorescentes ligadas de la presente invención se pueden usar en una variedad de aplicaciones de diagnóstico y tratamiento, por ejemplo, como un vehículo farmacéutico para agentes terapéuticos, y como un marcador fluorescente en, por ejemplo, experimentos de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), como cuando una muestra de ADN se tiñe con un marcador fluorescente y la actividad del gen se puede detectar como un brillo coloreado del marcador cuando se ilumina con un láser.

Las nanopartículas de la invención, solas o en combinación con un ligando, pueden usarse para el acoplamiento pasivo o covalente de material biológico, es decir, un analito, como haptenos, antígenos, anticuerpos, enzimas o ácidos nucleicos, y usarse para diversos tipos de análisis de analitos, como inmunoensayos, análisis de ácido nucleico (ADN o ARN), purificación por afinidad, separación celular y otras aplicaciones médicas, de diagnóstico, ambientales e industriales. Las nanopartículas incorporan materiales fluorescentes conocidos que responden, tales como colorantes, pigmentos o combinaciones de los mismos. Se conoce una amplia variedad de colorantes fluorescentes químicamente reactivos adecuados, véase, por ejemplo

MOLECULAR PROBES HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS, 6ª ed., R. P. Haugland, ed. (1996). Un fluoróforo típico es, por ejemplo, un compuesto aromático o heteroaromático fluorescente tal como un pireno, un antraceno, un naftaleno, una acridina, un estilbena, un indol o benzindol, un oxazol o benzoxazol, un tiazol o benzotiazol, un 4-amino-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (NBD), una cianina, una carbocianina, un carboestirilo, una porfirina, un salicilato, un antranilato, un azuleno, un perileno, una piridina, una quinolina, un cumarina (incluidas hidroxicumarinas y aminocumarinas y derivados fluorados de las mismas), y compuestos similares, véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Nos. 5,830,912; 4,774,339; 5,187,288; 5,248,782; 5,274,113; 5,433,896; 4,810,636; y 4,812,409.

El organosilano correactivo usado para formar el núcleo fluorescente tiene la fórmula general  $R_{(4-n)}SiX_n$ , donde X puede ser un grupo hidrolizable tal como etoxi, metoxi o 2-metoxi-etoxi; R puede ser un radical orgánico monovalente de 1 a 12 átomos de carbono que contiene un grupo orgánico funcional mercapto y n es un número entero de 0 a 3. El organosilano correactivo utilizado para formar el núcleo fluorescente tiene preferiblemente n igual a 3. También se conoce el uso de mono-, bis- y trisiloxisilanos funcionales para el acoplamiento y la modificación de grupos funcionales correactivos o superficies hidroxifuncionales, incluidas las superficies de vidrio, véase Kirk-Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology, vol. 20, 3ª ed., J. Wiley, N.Y. Aunque no se desea limitarse por la teoría, el acoplamiento surge como resultado de la hidrólisis de los grupos alcoxisilano a grupos silanol y como resultado de la condensación con grupos hidroxilo de la superficie, véase E Pluedemann, Silane Coupling Agents, Plenum Press, N.Y., 1982. Por lo tanto, los compuestos de organosilano mencionados anteriormente y agentes de acoplamiento similares pueden usarse: para hacer el núcleo; para hacer la cubierta de sílice, para modificar la superficie de las nanopartículas de núcleo fluorescente recubiertas con cubierta de sílice resultante; para unir o acoplar un ligando a las nanopartículas fluorescentes; o para modificar las propiedades del ligando antes o después de la unión a nanopartículas fluorescentes. El organosilano puede causar geles, por lo que puede ser deseable emplear un alcohol u otros estabilizadores conocidos. Cuando el organosilano se copolimeriza con otro monómero, como un compuesto fluorescente reactivo, se puede seleccionar un estabilizador que no interfiera con la polimerización. Un alcohol, como el metanol, es especialmente útil y puede emplearse en cantidades, por ejemplo, de aproximadamente dos veces a aproximadamente diez veces la cantidad de organosilano.

Las nanopartículas pueden incorporar opcionalmente materiales magnéticos conocidos o magnéticamente sensibles, tales como óxido metálico superparamagnético, paramagnético, ferromagnético y combinaciones de los mismos.

Las nanopartículas fluorescentes de la presente invención comprenden un núcleo que comprende un compuesto de silano fluorescente; y una cubierta de sílice en el núcleo. El núcleo de la nanopartícula puede comprender, por

ejemplo, el producto de reacción de un compuesto fluorescente reactivo y un compuesto de organosilano correactivo, y la cubierta puede comprender, por ejemplo, el producto de reacción de un compuesto formador de sílice. El compuesto formador de sílice puede producir, por ejemplo, una o más capas de sílice, como de 1 a aproximadamente 20 capas, y dependiendo de las características deseadas de la cubierta, como el grosor de la capa de cubierta, la relación del grosor de la cubierta al grosor del núcleo o diámetro, cobertura superficial de la cubierta de sílice del núcleo, porosidad y capacidad de carga de la cubierta de sílice, y consideraciones similares.

El revestimiento de cubierta de sílice en el núcleo puede cubrir, por ejemplo, de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 por ciento del área superficial del núcleo. El ligando cuando se liga sobre la superficie de la nanopartícula fluorescente puede cubrir, por ejemplo, de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 100 por ciento del área de la superficie del núcleo. El grosor o diámetro del núcleo al grosor de la cubierta de sílice puede estar en una relación de, por ejemplo, de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:100. El diámetro de la nanopartícula fluorescente puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 1.000 nanómetros. El diámetro de una nanopartícula fluorescente ligada puede ser comparable o mayor que el diámetro de la nanopartícula fluorescente dependiendo, por ejemplo, del tamaño y la cantidad del ligando seleccionado. En realizaciones, el diámetro del núcleo puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 10 a aproximadamente 300 nanómetros, y preferiblemente de aproximadamente 25 a aproximadamente 200 nanómetros, y el grosor de la cubierta de sílice puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 25 a aproximadamente 800 nanómetros, y preferiblemente de aproximadamente 25 a aproximadamente 500 nanómetros. En realizaciones preferentes, como cuando las nanopartículas se seleccionan como portadores, la cubierta de sílice se hace porosa para acomodar, por ejemplo, un agente terapéutico, y como se ilustra en el presente documento.

Los procedimientos de preparación para las nanopartículas fluorescentes de la presente invención pueden producir nanopartículas, por ejemplo, de aproximadamente un orden de magnitud más pequeño que los informados por van Blaaderen and Vri, Langmuir, 8, 2921-2925 (1992) (partículas monodispersas de núcleo de esfera de sílice recubiertas con colorantes y además encapsuladas con sílice). La cubierta de sílice puede ser sólida, que es relativamente no porosa, o mesoporosa, como semiporosa. La cubierta de sílice de las nanopartículas fluorescentes es preferiblemente dieléctrica. La cubierta de sílice de las nanopartículas fluorescentes se puede adaptar para funcionar como una nanopartícula portadora farmacéutica, que está hecha para contener, por ejemplo, agentes terapéuticos, tales como fármacos o proteínas para el transporte y suministro in vivo o in vitro. Por lo tanto, las nanopartículas fluorescentes de la presente invención pueden proporcionar un sistema de soporte farmacéutico que puede adaptarse para la administración o liberación controlada de agentes terapéuticos.

En las realizaciones, un ligando colocado en la superficie de la nanopartícula fluorescente forma una nanopartícula fluorescente ligada. La colocación del ligando se puede lograr, por ejemplo, mediante unión con un enlace covalente o mediante absorción física. El ligando en la superficie de la nanopartícula fluorescente puede ser, por ejemplo, un biopolímero, un polímero sintético, un antígeno, un anticuerpo, un virus o componente viral, un receptor, un hapteno, una enzima, una hormona, un compuesto químico, un patógeno, un microorganismo o un componente del mismo, una toxina, un modificador de superficie, como un tensioactivo para alterar las propiedades de la superficie o la histocompatibilidad de la nanopartícula o de un analito cuando una nanopartícula se asocia con ella, y sus combinaciones. Los ligandos preferidos son, por ejemplo, anticuerpos, tales como monoclonales o policlonales.

La presente invención también proporciona un procedimiento para preparar analitos que se marcan selectivamente con nanopartículas fluorescentes ligadas mediante, por ejemplo, acoplamiento (por ejemplo, covalentemente) o cualquier otro procedimiento(s) conocido(s) para asociar las nanopartículas fluorescentes ligadas directamente a las analito (por ejemplo, a través de enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno, por adsorción simple). Los analitos marcados selectivamente resultantes que tienen una nanopartícula ligada-fluorescente ligada acoplada o asociada (es decir, complejo de nanopartícula fluorescente ligada-analito) pueden ser útiles como una muestra auténtica o de referencia, por ejemplo, en un procedimiento de tratamiento o kit de diagnóstico.

Un "analito" de la presente invención es el objeto o la diana de la nanopartícula fluorescente ligada para su unión o asociación con la misma. El analito puede ser, por ejemplo, un microorganismo o un componente del mismo, un virus o componente viral, una célula o un componente de la misma, un biopolímero, un polímero sintético, un material sintético, como un nanotubo de carbono, un antígeno, un anticuerpo, un receptor, un hapteno, una enzima, una hormona, un compuesto químico, un patógeno, una toxina, combinaciones de los mismos y sustancias similares. Los analitos de particular interés son microorganismos y células, incluidos virus, células procariotas y eucariotas, organismos unicelulares y multicelulares, por ejemplo, hongos, bacterias, mamíferos, etc., y fragmentos o componentes de los mismos. Otros analitos de particular interés son los patógenos. Los anticuerpos monoclonales o policlonales u otros ligandos selectivos que forman parte de la nanopartícula fluorescente ligada pueden unirse a la superficie de, por ejemplo, un patógeno.

En las realizaciones de la presente invención, se proporcionan procedimientos para hacer una nanopartícula fluorescente, por ejemplo, que comprende:

mezclar un compuesto fluorescente, tal como un colorante fluorescente reactivo, y un compuesto de organosilano, tal como un compuesto de organosilano correactivo, para formar un núcleo fluorescente; y

mezclar el núcleo resultante con un compuesto formador de sílice, como un tetraalcoxilano, para formar una

cubierta de sílice en el núcleo, para proporcionar la nanopartícula fluorescente.

Los procedimientos de fabricación de las nanopartículas de la presente invención pueden comprender además combinar la nanopartícula fluorescente resultante con un ligando tal como un biopolímero, un polímero sintético, un antígeno, un anticuerpo, un microorganismo, un virus, un receptor, un hapteno, una enzima, una hormona, un compuesto químico, un patógeno, una toxina, un modificador de superficie, por ejemplo, para alterar la superficie o las propiedades de compatibilidad de la nanopartícula, combinaciones de las mismas y materiales similares. La combinación resultante de la nanopartícula fluorescente y un ligando proporciona una nanopartícula fluorescente ligada. Los procedimientos de fabricación de las nanopartículas también pueden comprender combinar la nanopartícula resultante con un agente terapéutico, con o sin un ligando unido a la nanopartícula. La combinación de las nanopartículas con un ligando o un agente terapéutico se puede lograr, por ejemplo, recubriendo el ligando o agente terapéutico sobre la superficie de la nanopartícula. Alternativa o adicionalmente, la combinación de una nanopartícula con un ligando o un agente terapéutico se puede lograr, por ejemplo, embebiendo el ligando o agente terapéutico en la superficie de la nanopartícula. Embeber significa asimilar o absorber o subir, por ejemplo, donde una superficie porosa de nanopartículas está embebida con un ligando, un agente terapéutico o ambos. Alternativa o adicionalmente, la combinación de una nanopartícula con un ligando o un agente terapéutico se puede lograr, por ejemplo, uniendo el ligando o agente terapéutico a la superficie de la nanopartícula resultante. La unión incluye, por ejemplo, procedimientos covalentes conocidos, iónicos, de hidrógeno, hidrófobos, de coordinación, adhesivos, combinaciones de los mismos y procedimientos asociativos de unión similares.

Debido al pequeño tamaño y la uniformidad de las nanopartículas de la presente invención y su aparente solubilidad o propiedades de alta dispersabilidad, las nanopartículas pueden proporcionar "marcadores moleculares" que pueden asociarse fácilmente con otra entidad, como un ligando o un agente terapéutico, y posteriormente ser transportado fácilmente y unido selectivamente a un analito diana. El accesorio selectivo permite la detección analítica útil, diagnósticos o esquemas de diferenciación. El tamaño de las nanopartículas fluorescentes ligadas para su uso en las realizaciones de la presente invención se puede seleccionar en función del número de nanopartículas por unir al analito y la sensibilidad de los esquemas ópticos o espectroscópicos seleccionados.

En las realizaciones, la presente invención proporciona un procedimiento para controlar el movimiento de un componente celular de una célula que comprende:

poner en contacto la célula con una nanopartícula fluorescente ligada para formar una célula decorada selectivamente con la nanopartícula fluorescente ligada; y

grabar el movimiento de los *loci* fluorescentes durante un tiempo.

Los *loci* fluorescentes pueden corresponder a una única nanopartícula fluorescente ligada unida a un componente de la célula. Los *loci* fluorescentes pueden corresponder a dos o más nanopartículas fluorescentes ligadas unidas a un componente de la célula. El procedimiento de monitorización permite a un operador, por ejemplo, rastrear la difusión de uno o más *loci* fluorescentes, como un receptor al que se une una sola nanopartícula fluorescente ligada, como, en tiempo real o con técnicas de lapso de tiempo. La nanopartícula fluorescente ligada está adaptada preferiblemente para asociarse selectivamente con un componente celular dirigido de la célula, por ejemplo, mediante la selección apropiada del ligando.

El componente celular puede ser, por ejemplo, un receptor, un anticuerpo, un hapteno, una enzima, una hormona, un biopolímero, un antígeno, un microorganismo, un virus, un patógeno, una toxina, combinaciones de los mismos y componentes similares. En realizaciones, la nanopartícula fluorescente ligada puede ser una nanopartícula fluorescente conjugada con un anticuerpo. En realizaciones, el anticuerpo conjugado puede ser una inmunoglobina, tal como IgE.

Los medios adecuados para detectar, registrar, medir o formar imágenes en realizaciones de la presente invención son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, un citómetro de flujo, un citómetro de escaneo láser, un lector de microplacas de fluorescencia, un microscopio de fluorescencia, un microscopio confocal, un microscopio de campo claro, un sistema de escaneo de alto contenido y dispositivos similares.

La grabación puede realizarse, por ejemplo, con una cámara adaptada microscópicamente, como una cámara de videomicroscopía, una cámara digital, una cámara de exposición única de haluro de plata y dispositivos similares. El tiempo de grabación puede ser cualquier período de tiempo conveniente y útil para observar eventos o fenómenos notables, por ejemplo, intervalos de aproximadamente 1 microsegundo a aproximadamente 30 días. En los eventos típicos extracelulares, celulares de superficie o intracelulares, el registro durante un período de tiempo puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 60 minutos, más preferiblemente de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 40 minutos, y aún más preferiblemente, de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 30 minutos. El período de tiempo de grabación a menudo se puede acortar o alargar convenientemente según se desee cambiando la temperatura ambiente de la muestra o sistema. El contacto y la grabación pueden realizarse in vitro utilizando técnicas convencionales de fotografía microscópica. El contacto y la grabación también se pueden realizar in vivo utilizando, por ejemplo, un catéter adaptado con una cámara microscópica o una cámara de fibra óptica. Será evidente para un experto en la técnica en las realizaciones de la presente invención que "grabación" puede ser sinónimo de "detección", ya que, por ejemplo, hacer una grabación

fotográfica de una muestra iluminada también puede permitir simultáneamente la detección de *loci* fluorescentes, como una célula o componente celular decorada selectivamente con una nanopartícula fluorescente ligada.

Un vehículo farmacéutico puede comprender la nanopartícula fluorescente de la presente invención, y opcionalmente un ligando asociado con la nanopartícula fluorescente.

- 5 Una composición farmacéutica puede comprender una nanopartícula fluorescente ligada y un agente terapéutico asociado con la nanopartícula fluorescente.

En las realizaciones, se proporciona un agente de formación de imágenes que comprende la nanopartícula fluorescente ligada, por ejemplo, donde el ligando de la nanopartícula fluorescente ligada está en la superficie de la nanopartícula. El agente de formación de imágenes se puede usar en procesos de formación de imágenes convencionales, y preferiblemente donde, por ejemplo, se desea un alto rendimiento fluorescente o brillo fluorescente. En realizaciones, las nanopartículas fluorescentes ligadas de la presente invención pueden proporcionar un brillo fluorescente mejorado que es, por ejemplo, de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 veces mayor en comparación con partículas fluorescentes decoradas en la superficie convencionales, tales como partículas de látex fluorescentes.

- 15 Un procedimiento para tratar una enfermedad o trastorno puede comprender:

administrar a un paciente que necesita tratamiento una cantidad efectiva de una nanopartícula fluorescente ligada, la cual incluye opcionalmente un agente terapéutico, en el que la nanopartícula está adaptada para asociarse selectivamente con un componente de la célula que produce la enfermedad, para formar una célula decorada selectivamente con el nanopartículas fluorescentes ligadas; e

- 20 iluminar la célula decorada.

La nanopartícula fluorescente ligada, por sí misma o como parte de una célula decorada, cuando se ilumina puede fluorescer, calentarse o ambas. Por lo tanto, la selección del compuesto fluorescente reactivo en la preparación de la nanopartícula fluorescente, y la selección del ligando, pueden realizarse empíricamente dependiendo del equilibrio de las propiedades fluorescentes y no fluorescentes (disipación de calor) deseadas. Se pueden desear propiedades fluorescentes más altas cuando la detección es primordial o difícil, por ejemplo, en sistemas diluidos. Se pueden desear mayores propiedades no fluorescentes cuando se necesita un alto calentamiento para, por ejemplo, promover la liberación de un agente terapéutico o para lograr una cauterización microscópica selectiva o una terapia de calor microscópico. En realizaciones, puede ser deseable usar una mezcla de dos o más nanopartículas fluorescentes ligadas que tienen diferentes propiedades fluorescentes y no fluorescentes para explotar los beneficios de las diferentes propiedades, por ejemplo, simultánea o secuencialmente, como en la detección y tratamiento de un tumor canceroso.

Por lo tanto, las nanopartículas fluorescentes ligadas de la presente invención pueden usarse para tratar enfermedades o trastornos sensibles a la luz o al calor. La terapia de luz es conocida por la activación de medicamentos en uno o más sitios de tratamiento dentro de un cuerpo vivo. Una realización particular de la terapia de luz, por ejemplo, es la terapia fotodinámica (PDT), que es un proceso de tratamiento de dos pasos que se ha encontrado efectivo para destruir una amplia variedad de cánceres. La PDT se realiza administrando primero de manera sistémica o tópica un compuesto fotosensibilizador o compuestos similares, y posteriormente iluminando un sitio de tratamiento con luz en una banda de onda, que corresponde a una banda de onda de absorción del fotosensibilizador. La energía de la luz activa el compuesto fotosensibilizador, causando que destruya el tejido enfermo, véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 6,454,789. Es evidente para un experto en la materia que un material fluorescente, tal como las nanopartículas fluorescentes ligadas de la presente invención, se puede usar en lugar de un compuesto fotosensibilizador.

Los procedimientos de terapia con calor también son conocidos, por ejemplo, para encoger los tejidos deseados, véase la Patente de los Estados Unidos No. 6,480,746, y para el tratamiento localizado de las verrugas cutáneas, véase Arch. Dermatol, (julio de 1992), vol. 128, p. 945-948, y para inducir apoptosis de macrófagos, véase la Patente de los Estados Unidos No. 6,451,044. En estas y otras aplicaciones relacionadas, la terapia de calor se puede lograr dentro de un cuerpo o a través de la piel por medio de, por ejemplo, irradiación o iluminación, como radiación ultravioleta, radiación infrarroja, radiación con microondas, etc. Una persona de experiencia normal en la técnica, en posesión de la presente invención, reconocería fácilmente cómo adaptar sus materiales y procedimientos para lograr la terapia de luz o terapia de calor.

Un procedimiento de tratamiento puede comprender: poner en contacto una célula con una nanopartícula fluorescente ligada, que opcionalmente tiene un agente terapéutico asociado con la nanopartícula, para formar una célula decorada selectivamente con la nanopartícula fluorescente ligada; e irradiar la célula decorada resultante durante un tiempo.

- 55 La cantidad y la duración del contacto, así como la cantidad y la duración de la irradiación pueden depender, por ejemplo, de los objetivos diagnósticos o terapéuticos del procedimiento de tratamiento, tales como la detección fluorescente de un estado o afección enfermo, la administración de un agente terapéutico de efecto, o ambos. La

cantidad y la duración del contacto y la irradiación también pueden depender, por ejemplo, de la concentración relativa de nanopartículas fluorescentes ligadas al analito diana, y el estado de la célula para el tratamiento, como células enteras, células permeabilizadas, células homogeneizadas, células sensibilizadas y preparaciones celulares similares in vivo o in vitro.

5 Las nanopartículas fluorescentes ligadas de la presente invención también tienen aplicación en kits de diagnóstico o ensayos, tales como inmunoensayos, en agentes de generación de imágenes mejorados, en procesos de purificación, en fármacos, por ejemplo, regímenes de tratamiento y terapias, tales como la administración de fármacos para específicamente atacar y reducir tumores o para identificar y separar agentes infecciosos y aplicaciones similares.

10 La invención proporciona un kit para usar en la detección de un analito, comprendiendo el kit una nanopartícula fluorescente ligada, como se ilustra en el presente documento.

La invención también proporciona un kit para detectar y monitorizar un componente de la superficie celular que comprende una nanopartícula fluorescente ligada para detectar el componente de la superficie celular, y opcionalmente un registrador para monitorizar el componente de la superficie celular.

15 Los kits mencionados anteriormente incluyen el empaquetado de los componentes del kit y las instrucciones para el uso del kit.

La invención también proporciona un procedimiento de ensayo para detectar movimiento o un cambio en la ubicación de un componente celular en, o sobre la superficie de una célula cuando la célula se trata con un agente terapéutico que comprende:

20 poner en contacto una célula con una nanopartícula fluorescente ligada, en donde la nanopartícula incluye un agente terapéutico, para unir la nanopartícula fluorescente ligada a un componente celular; y

registrar la señal fluorescente, como la de uno o más *loci* fluorescentes, y determinar el movimiento relativo o un cambio en la ubicación de un componente celular diana.

25 El procedimiento de ensayo para detectar movimiento o un cambio en la ubicación de un componente celular puede incluir, por ejemplo, opcionalmente mapear o trazar las posiciones registradas de nanopartículas fluorescentes ligadas. El procedimiento de ensayo puede comprender además determinar la diferencia entre el movimiento o el movimiento de la nanopartícula fluorescente ligada unida al analito en presencia y ausencia del agente terapéutico, por ejemplo, en un diseño experimental en tándem o control.

30 Los materiales de nanopartículas, tales como las nanopartículas fluorescentes ligadas, y los procedimientos de uso de la presente invención pueden usarse como, por ejemplo, reactivos de ensayo marcados o productos reactivos elaborados a partir de los mismos, para analizar la presencia de un componente celular, para ejemplo, una enzima, un receptor y componentes celulares similares. La ubicación del componente celular puede detectarse y determinarse, por ejemplo, dentro de una célula completa metabólicamente activa, en un lisado celular completo, en una célula permeabilizada, en una célula fija o con un componente celular parcialmente purificado en una célula libre ambiente. La nanopartícula fluorescente ligada contiene un ligando o ligador asociado, como un anticuerpo, que la nanopartícula se dirige o asocia con un componente celular específico de interés. La nanopartícula fluorescente ligada también contiene una etiqueta fluorescente o un componente fluorescente en el núcleo de la nanopartícula, que marca o informa sobre la presencia del componente de la célula diana cuando la nanopartícula y el componente de la célula diana están asociados e iluminados o irradiados adecuadamente.

40 Los procedimientos para tratar una enfermedad pueden comprender la administración de una cantidad efectiva de nanopartículas fluorescentes unidas. Los procedimientos pueden implicar la administración de nanopartículas fluorescentes unidas como se describe aquí, solo, en una composición farmacéutica, o en combinación con otros agentes terapéuticos o composiciones farmacéuticas.

45 La invención también proporciona procedimientos para aumentar la efectividad de un agente terapéutico uniendo el agente terapéutico a una nanopartícula fluorescente. Las nanopartículas fluorescentes y sus composiciones farmacéuticas también pueden usarse para asociar agentes terapéuticos para aumentar la eficacia terapéutica del agente terapéutico. La conjugación de una nanopartícula fluorescente con un ligando para formar una nanopartícula fluorescente unida o ligada se realiza preferiblemente in vitro donde, por ejemplo, las cantidades y condiciones de ligando se pueden controlar cuidadosamente para producir un producto de alta pureza y alta calidad. De manera similar, la modificación de la nanopartícula fluorescente unida con un agente terapéutico se realiza preferiblemente in vitro.

55 La presente invención proporciona nanopartículas fluorescentes y nanopartículas fluorescentes ligadas de las mismas, y procedimientos para su uso en, por ejemplo, inmunomarcación, procedimientos de reconocimiento subcelular, diagnóstico o clasificación celular. Los procedimientos de la presente invención proporcionan ventajas que superan las deficiencias de las metodologías conocidas y como se ilustra en este documento.

La presente invención proporciona nanopartículas fluorescentes ligadas que son altamente dispersables y son útiles,

por ejemplo, en procedimientos mejorados para el análisis químico y bioquímico, tales como la detección de analitos biológicos que incluyen microorganismos o componentes subcelulares. La nanopartícula fluorescente ligada puede proporcionar altas concentraciones locales de material fluorescente debido a su alta afinidad o selectividad de diana, y debido a su brillo mejorado en comparación con las partículas fluorescentes conocidas. El material fluorescente está presente en todo el núcleo de nanopartículas y no simplemente como un material de recubrimiento superficial como en muchos materiales convencionales.

Un "agente terapéutico" es una sustancia que puede usarse en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de enfermedades en un humano u otro animal. Tales agentes terapéuticos incluyen sustancias reconocidas en la official United States Pharmacopeia, official Homeopathic Pharmacopeia de los Estados Unidos, official National Formulary, cualquier suplemento de los mismos..

Los agentes terapéuticos que se pueden incorporar con las nanopartículas fluorescentes o las nanopartículas fluorescentes ligadas de la invención incluyen nucleósidos, análogos de nucleósidos, oligopéptidos, polipéptidos, inhibidores de COX-2, promotores de apoptosis, agentes para el tracto urinario, agentes vaginales, agentes neurodegenerativos vasodilatadores (por ejemplo, enfermedad de Parkinson), agentes para la obesidad, agentes oftálmicos, agentes para la osteoporosis, parasimpaticolíticos, parasimpaticométicos, antianestésicos, prostaglandinas, agentes psicoterapéuticos, agentes respiratorios, sedantes, hipnóticos, agentes para la piel y las membranas mucosas, antibacterianos, antifúngicos, antineoplásicos, agentes cardioprotectores, agentes cardiovasculares, antitrombóticos, estimulantes del sistema nervioso central, inhibidores de la colinesterasa, anticonceptivos, agonistas del receptor de dopamina, agentes para la disfunción eréctil, agentes de fertilidad, agentes gastrointestinales, agentes para la gota, hormonas, inmunomoduladores, analgésicos adecuadamente funcionalizados o anestésicos generales o locales, anticonvulsivos, agentes antidiabéticos, antifibróticos, antiinfecciosos, mareos, relajantes musculares, inmunosupresores, agentes para la migraña, antiinflamatorios no esteroideos (AINE), agentes para dejar de fumar o simpaticolíticos (véase Physicians' Desk Reference, 55th ed., 2001, Medical Economics Company, Inc., Montvale, Nueva Jersey, páginas 201-202).

Ejemplos de agentes terapéuticos específicos que pueden unirse, ligarse o asociarse con las nanopartículas fluorescentes de la invención son flomoxef; fortimicina(s); gentamicina(s); glucosulfona solasulfona; gramicidina S; gramicidina(s); grepafloxacina; guameciclina; hetacilina; isepamicina; josamicina; kanamicina(s); flomoxef; fortimicina(s); gentamicina(s); glucosulfona solasulfona; gramicidina S; gramicidina(s); grepafloxacina; guameciclina; hetacilina; isepamicina; josamicina; kanamicina(s); bacitracina; bambermicina(s); biapenem; brodimoprim; butirosina; capreomicina; carbenicilina; carbomicina; carumonam; cefadroxilo; cefamandol cefatrizina; cefbuperazona; cefclidina; cefdinir; cefditoren; cefepima; cefetamet; cefixima; cefinenoxima; cefminox; cladribina; apalcilina; apiciclina apramicina; arbekacina; aspoxicilina; azidamfenicol; aztreonam; cefodizima; cefonicid; cefoperazona; ceforanida; cefotaxima; cefotetan; cefotiam; cefozopran; cefpimizol; cefpiramida; cefpirome; cefprozil; cefroxadina; ceferam; ceftibuten; cefuzonam; cefalexina; cefaloglicina; cefalosporina C; cefradina; cloranfenicol; clortetraciclina; clinafloxacina; clindamicina; clomociclina; colistina ciclacilina; dapsona demeclociclina; diatimosulfona; dibekacina; dihidroestreptomina; 6-mercaptopurina; tioguanina; capecitabina; docetaxel; etopósido; gemcitabina; topotecan; vinorelbina; vincristina; vinblastina; tenipósido; melfalan; metotrexato; 2-p-sulfanililinoetanol; 4,4'-sulfnilidianilina; ácido 4-sulfanilamidosalicílico; butorfanol; nalbufina estreptozocina; doxorubicina; daunorrubicina; plicamicina; idarrubicina; mitomicina C; pentostatina; mitoxantrona; citarabina; fosfato de fludarabina; butorfanol; nalbufina estreptozocina; doxorubicina; daunorrubicina; plicamicina; idarrubicina; mitomicina C; pentostatina; mitoxantrona; citarabina; fosfato de fludarabina; acediasulfona; acetosulfona; amikacina; anfotericina B; ampicilina; atorvastatina; enalapril; ranitidina; ciprofloxacina; pravastatina; claritromicina; ciclosporina; famotidina; leuprolida; aciclovir; paclitaxel; azitromicina; lamivudina; budesonida; albuterol; indinavir; metformina; alendronato; nizatidina; zidovudina; carboplatino; metoprolol; amoxicilina; diclofenaco; lisinopril; ceftriaxona; captopril; salmeterol; xinafoato; imipenem cilastatina; benazepril; cefaclor; ceftazidima; morfina; dopamina bialamicol; fluvastatina; fenamidina; ácido podofilínico 2-etilhidrazina; acriflavina; cloroazodina; arsfenammina; amicarbilida; aminoquinurida; quinapril; oximorfona buprenorfina; floxuridina; diritromicina; doxiciclina; enoxacina; enviomicina; epicilina; eritromicina; leucomicina(s); lincomicina; lomefloxacina; lucensomicina; limeciclina; meclociclina; meropenem; metaciclina; micronomicina; midecamicina(s); minociclina; moxalactama; mupirocina; nadifloxacina; natamicina; neomicina; netilmicina; norfloxacina; oleandomicina; oxitetraciclina; p-sulfanililbencilamina; panipenem; paromomicina; pazufloxacina; penicilina N; pipaciclina; ácido pipemidico; polimixina; primicina; quinacilina; ribostamicina; rifamida; rifampin; rifamicina SV; rifapentina; rifaximina; ristocetina; ritipenem; rokitamicina; rolitetraciclina; rosaramicina; roxitromicina; salazosulfadimidina; sanciclina sisomicina; esparfloxacina; espectinomicina; espiramicina; estreptomina; succisulfona; sulfacrisoidina; ácido sulfalóxico; sulfamidocrisoidina; ácido sulfanílico; sulfoxona; teicoplanina; temafloxacina; temociclina; tetroxoprim; tiamfenicol; tiazolsulfona; tiostrepton; ticarcilina; tigemonam; tobramicina; tosufloxacina; trimetoprima; trospectomicina; trovafloxacina; tuberactinomicina; vancomicina; azaserina; candidicina(s); clorfenesina; dermostatina(s); filipina; fungicromina; mepartricina; nistatina; oligomicina(s); perimicina A; tubercidina, 6-azauridina; 6-diazo-5-oxo-L-norleucina; aclacinomicina(s); ancitabina; antramicina; azacitadina; azaserina; bleomicina(s); biscumacetato de etilo; etilideno dicoumarol; iloprost; lamifiban; taprostenol; tiocloमारol; tirofiban; amiprilosa; bucilamina; guserimus; ácido gentísico; glucametacina; salicilato de glicol; ácido meclofenámico; ácido mefenámico; mesalamina; ácido niflumico; olsalazina; oxaceprol; S-enosilmetionina; ácido salicílico; salsalato; sulfasalazina; ácido tolfenámico; carrubicina; carzinoflina A; clorozotocina; cromomicina(s); denopterina; doxilfluridina; edatrexato; eflornitina; elliptinium; enocitabina; epirubicina; mannomustina; menogaril; mitobronitol; mitolactol; mopidamol; ácido micofenólico; nogalamicina; olivomicina(s); peplomicina; pirarrubicina;

piritrexim; prednimustina; procarbazona; pteropterina; puromicina; ranimustina; estreptonigrina; tiamiprina; ácido micofenólico; procodazol; romurtida; sirolimus (rapamicina); tacrolimus; butetamina; fenalcomina; hidroxitetraacina; naepaina; ortocaína; piridocaína; alcohol salicílico; ácido 3-amino-4-hidroxi-butírico; aceclofenaco; alminoprofeno; amfenaco; bromfenaco; bromosaligenina; bumadizon; carprofeno diclofenaco; diflunisal; ditazol; ácido enfenámico; etodolaco; etofenamato; fendosal; fepradinol; ácido flufenámico; Tomudex® (ácido N-[[[5-[[[1,4-dihidro-2-metil-4-oxo-6-quinazolinil]metil]metilamino]-2-tienil]carbonil]-L-glutámico), trimetrexato, tubercidina, ubenimex, vindesina, zorrubicina; argatroban; cumetarol o dicumarol.

Se pueden encontrar listas de agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, en: Physicians' Desk Reference, 55th ed., 2001, Medical Economics Company, Inc., Montvale, Nueva Jersey; USPN Dictionary of USAN and International Drug Names, 2000, The United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Maryland; y The Merck Index, 12th ed., 1996, Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, Nueva Jersey. Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente cómo determinar, por ejemplo, la actividad terapéutica utilizando pruebas estándar u otras pruebas similares que se conocen en la técnica.

Una "composición farmacéutica" incluye un agente terapéutico como se ejemplifica aquí en combinación con una nanopartícula fluorescente de la invención, por ejemplo, donde la nanopartícula fluorescente puede actuar como el vehículo farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica de la presente invención, además de una combinación de agente terapéutico con una nanopartícula fluorescente, puede formularse en o con otros vehículos o formas de dosificación aceptables, tales como un diluyente sólido, gelificado o líquido o una cápsula ingerible. Las composiciones farmacéuticas de la invención, sus sales, o una mezcla de las mismas, pueden administrarse por vía oral en forma de una forma farmacéutica unitaria adecuada. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden prepararse en muchas formas que incluyen tabletas, cápsulas de gelatina dura o blanda, soluciones acuosas, suspensiones y liposomas y otras formulaciones de liberación lenta, tales como geles poliméricos conformados.

Las composiciones farmacéuticas líquidas orales pueden estar en forma de, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires, o pueden presentarse como un producto seco para constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas composiciones farmacéuticas líquidas pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles) o conservantes.

Las composiciones farmacéuticas de nanopartículas de la invención también pueden formularse para administración parenteral (por ejemplo, mediante inyección, por ejemplo, inyección en bolo o infusión continua) y pueden presentarse en forma de dosificación unitaria en ampollas, jeringas precargadas, recipientes de infusión pequeño volumen o recipientes multidosis con un conservante agregado. Las composiciones farmacéuticas pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden estar en forma de polvo, obtenidas por aislamiento aséptico de sólido estéril o por liofilización a partir de solución, para constituir con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril, libre de pirógenos, antes de su uso.

Para la administración tópica a la epidermis, las composiciones farmacéuticas pueden formularse como ungüentos, cremas o lociones, o como el ingrediente activo de un parche transdérmico. Los sistemas de administración transdérmica adecuados se describen, por ejemplo, en A. Fisher et al. (Patente de los Estados Unidos No. 4,788,603), o R. Bawa et al. (Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,931,279; 4,668,506 y 4,713,224). Los ungüentos y cremas pueden, por ejemplo, formularse con una base acuosa u oleosa con la adición de agentes espesantes y/o gelificantes adecuados. Las lociones pueden formularse con una base acuosa u oleosa y, en general, también contendrán uno o más agentes emulsionantes, agentes estabilizantes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes o agentes colorantes. Las composiciones farmacéuticas también pueden administrarse mediante ionoforesis, por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos Nos. 4,140,122; 4,383,529; o 4,051,842. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración tópica bucal incluyen formas de dosificación unitarias tales como pastillas que comprenden una composición farmacéutica de la invención en una base aromatizada, generalmente sacarosa y acacia o tragacanto; pastillas que comprenden la composición farmacéutica en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia; geles mucoadherentes y enjuagues bucales que comprenden la composición farmacéutica en un vehículo líquido adecuado.

Para la administración tópica en el ojo, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en forma de gotas, geles (S. Chrai et al., Patente de los Estados Unidos No. 4,255,415), gomas (S.L. Lin et al., Patente de los Estados Unidos No. 4,136,177) o mediante un inserto ocular de liberación prolongada (A.S. Michaels, Patente de los Estados Unidos No 3,867,519 y H.M. Haddad et al., Patente de los Estados Unidos No 3,870,791).

Cuando se desee, las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente se pueden adaptar para proporcionar una liberación sostenida de un compuesto terapéutico empleado, por ejemplo, mediante combinación con ciertas matrices de polímeros hidrófilos, por ejemplo, que comprenden geles naturales, geles de polímeros sintéticos o mezclas de los mismos.

- Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración rectal en las que el vehículo es un sólido se presentan más preferiblemente como supositorios de dosis unitarias. Los vehículos adecuados incluyen manteca de cacao y otros materiales comúnmente usados en la técnica, y los supositorios pueden formarse convenientemente mediante la mezcla de la composición farmacéutica con el (los) vehículo(s) ablandado(s) o fundido(s) seguido de enfriamiento y conformación en moldes.
- Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o aerosoles que contienen, además de las nanopartículas y el agente terapéutico, tales portadores son bien conocidos en la técnica.
- Para la administración por inhalación, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se administran convenientemente desde un insuflador, nebulizador o un paquete presurizado u otros medios convenientes para administrar un aerosol. Los paquetes presurizados pueden comprender un propulsor adecuado tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida.
- Como alternativa, para la administración por inhalación o insuflación, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden tomar la forma de una composición en polvo seco, por ejemplo, una mezcla en polvo de la composición farmacéutica y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón. La composición en polvo puede presentarse en forma de dosificación unitaria en, por ejemplo, cápsulas o cartuchos o, por ejemplo, paquetes de gelatina o blíster a partir de los cuales el polvo puede administrarse con la ayuda de un inhalador o insuflador.
- Para la administración intranasal, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse a través de un aerosol líquido, tal como a través de un atomizador de botella de plástico. Típicos de estos son el Mistometer® (inhalador de isoproterenol - Wintrop) y el Medihaler® (inhalador de isoproterenol - Riker).
- Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden contener otros adyuvantes tales como aromatizantes, colorantes, agentes antimicrobianos o conservantes.
- Se apreciará además que la cantidad de composiciones farmacéuticas requeridas para usar en el tratamiento variará no solo con la sal particular seleccionada sino también con la ruta de administración, la naturaleza de la afección que se está tratando y la edad y afección del paciente y quedará en última instancia a discreción del médico o clínico asistente.
- La cantidad de un agente terapéutico en combinación con las nanopartículas fluorescentes ligadas de la invención que puede administrarse y la frecuencia de administración a un paciente humano determinado dependerá de una variedad de variables relacionadas con el perfil psicológico y la condición física del paciente. Para evaluaciones de estos factores, véase J. F. Brien et al., *Europ. J. Clin. Pharmacol.*, 14, 133 (1978); y *Physicians' Desk Reference*, Charles E. Baker, Jr., Pub., Medical Economics Co., Oradell, N.J. (41st ed., 1987). Generalmente, las dosis del agente terapéutico cuando se usa en combinación con las nanopartículas fluorescentes ligadas de la presente pueden ser menores que cuando el agente terapéutico se administra solo o en formas farmacéuticas convencionales. La alta especificidad de la nanopartícula fluorescente ligada para un sitio diana, como un receptor situado en la superficie de una célula, puede proporcionar concentraciones localizadas relativamente altas de un agente terapéutico, o alternativamente, una liberación sostenida de un agente terapéutico durante un período de tiempo prolongado.
- Las "sales farmacéuticamente aceptables" de las nanopartículas fluorescentes ligadas y los agentes terapéuticos de la invención pueden incluir, pero no se limitan a, las sales de adición no tóxicas con ácidos orgánicos e inorgánicos, tales como los citratos, bicarbonatos, malonatos, tartratos, gluconatos, hidroclozuros, sulfatos, fosfatos y sales similares. Además, en los casos en que las nanopartículas son suficientemente básicas o ácidas para formar sales de ácido o base estables, la preparación de las nanopartículas como sales puede ser apropiada. Ejemplos de sales aceptables son las sales de adición de ácidos orgánicos formadas con ácidos que forman un anión aceptable, por ejemplo, tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartrato, succinato, benzoato, ascorbato,  $\alpha$ -cetoglutarato y  $\alpha$ -glicerofosfato. También se pueden formar sales inorgánicas adecuadas, que incluyen sales de hidroclozuro, sulfato, nitrato, bicarbonato y carbonato. Las sales aceptables pueden obtenerse usando procedimientos estándar conocidos en la técnica, por ejemplo, haciendo reaccionar un compuesto suficientemente básico tal como una amina con un ácido adecuado que proporciona un anión aceptable en términos de diagnóstico. También se pueden preparar sales de metales alcalinos (por ejemplo, sodio, potasio o litio) o metales alcalinotérreos (por ejemplo, calcio) de ácidos carboxílicos.
- "Receptor" es cualquier compuesto o composición macromolecular capaz de reconocer (por ejemplo, que tiene una afinidad de unión mejorada a) una organización espacial y polar particular de una molécula, es decir, un sitio epitópico o determinante. Receptores ilustrativos incluyen receptores naturales, por ejemplo, globulina de unión a tiroxina, anticuerpos, enzimas, fragmentos de inmunoglobulina (Fab), lectinas, diversas proteínas que se encuentran en la superficie de las células (grupo de diferenciación o moléculas de CD) y similares. Las moléculas de CD denotan proteínas conocidas y desconocidas en la superficie de las células eucariotas, por ejemplo, CD4 es la molécula que define principalmente los linfocitos T auxiliares.

"Haptenos" puede incluir hormonas naturales, fármacos naturales, fármacos sintéticos, contaminantes, alérgenos, moléculas afectoras, factores de crecimiento, quimioquinas, citoquinas, linfoquinas, aminoácidos, oligopéptidos, intermedios químicos, nucleótidos, oligonucleótidos y similares. El uso de tales compuestos puede ser en la detección de drogas de abuso, monitorización de dosis terapéuticas, estado de salud, compatibilidad de donantes para fines de trasplante, embarazo (por ejemplo, hCG o alfa-fetoproteína), detección de enfermedades, por ejemplo, endotoxinas, antígenos cancerosos, patógenos y similares.

"Inmunconjugado" es una molécula formada por la unión de dos moléculas o entidades diferentes, como un anticuerpo ligado a una nanopartícula fluorescente, y una segunda entidad molecular (analito) biológicamente activa, como una molécula de fármaco orgánico, un radionúclido, una enzima, una toxina, una proteína y materiales similares que pueden conjugarse con el anticuerpo para formar el conjugado. La porción de anticuerpo dirige o guía la nanopartícula fluorescente adjunta al analito diana permitiendo que la nanopartícula fluorescente produzca eficientemente un efecto biológico o de marcado. Los patógenos de interés pueden ser, por ejemplo, virus tales como *Herpesvirus*, *Poxvirus*, *Togavirus*, *Ortomixovirus*, *Paramixovirus*, *Rabdovirus*, *Coronavirus*, *Arenavirus* y *Retrovirus*. Los patógenos también incluyen priones y bacterias, que incluyen, entre otros, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus epidermidis*, *Serratia marcescens*, *Mycobacterium bovis*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y *Proteus vulgaris*. Se puede encontrar una lista no exhaustiva de estos organismos y enfermedades asociadas, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 5,795,158.

Los ensayos que usan nanopartículas de la invención pueden llevarse a cabo en un fluido biológico, que incluye fluidos biológicos separados o sin filtrar tales como orina, fluido cefalorraquídeo, fluido pleural, fluido sinovial, fluido peritoneal, líquido amniótico, líquido gástrico, sangre, suero, plasma, líquido linfático, líquido intersticial, homogeneizado de tejidos, extractos celulares, saliva, esputo, heces, secreciones fisiológicas, lágrimas, moco, sudor, leche, semen, secreciones vaginales, líquido de úlceras y otras erupciones superficiales, ampollas, abscesos y extractos de tejidos incluyendo biopsias de tejidos normales, malignos y sospechosos o cualquier otro componente del cuerpo que pueda contener el analito de interés. Otros especímenes similares, como el cultivo de células o tejidos o el caldo de cultivo también son de interés. Alternativamente, la muestra se puede obtener de una fuente ambiental, como suelo, agua o aire; o de una fuente industrial tal como tomada de un flujo de residuos, una fuente de agua, una línea de suministro o un lote de producción. Las fuentes industriales también incluyen medios de fermentación, como los de un reactor biológico o el proceso de fermentación de alimentos, como la elaboración de la cerveza; o alimentos, como carne, caza, productos o productos lácteos. La muestra de prueba puede tratarse previamente antes de su uso, tal como preparar plasma a partir de sangre, diluir fluidos viscosos y similares; los procedimientos de pretratamiento pueden implicar filtración, fraccionamiento, destilación, concentración, inactivación de compuestos interferentes y adición de reactivos, y pasos similares, o combinaciones de los mismos.

Se conocen procedimientos para detectar múltiples subpoblaciones de analitos, véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5,567,627, de Lehnen, y se puede adaptar a la presente invención. Los procedimientos para detectar un ácido nucleico con una o más nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos al mismo, incluido un ensayo electroquímico con un oligonucleótido sonda que ha unido una molécula activa rédox, por ejemplo, como en la Patente de los Estados Unidos No. 6,417,340, de Mirkin, et al., pueden ser adaptados a la presente invención. Los procedimientos para la detección electroquímica y la localización de mutaciones puntuales genéticas y otras perturbaciones de apilamiento de bases dentro de los dúplex de oligonucleótidos adsorbidos en electrodos, como la Patente de los Estados Unidos No. 6,221,586, de Barton, et al., pueden adaptarse a la presente invención. Los procedimientos para el análisis fluorescente multiplexado de una pluralidad de analitos en una muestra, como la Patente de los Estados Unidos No. 6,268,222, de Chandler, et al., pueden adaptarse a la presente invención. Otros procedimientos de detección incluyen el uso de espectroscopía ultravioleta y visible, véase por ejemplo X. Gong and E. S. Yeung, *Anal. Chem.*, 71, 4989 (1999), "An Absorption Detection Approach for Multiplexed Capillary Electrophoresis Using a Linear Photodiode Array". Los procedimientos para separar células usando un flujo a través del proceso de clasificación fraccional de células basado en la aplicación de una fuerza magnética a las células que tienen un rango de densidades de marcado magnético, como la Patente de los Estados Unidos No. 5,968,820, a Zborowski, et al., se pueden adaptar al presente invención. Los procedimientos para separar partículas unidas entre sí mediante unión no covalente y aglomeración, tales como la Patente de los Estados Unidos No. 4,279,617, de Masson et al., pueden adaptarse a la presente invención.

Para los fines de la presente invención, el componente fluorescente de la nanopartícula debería proporcionar una señal relacionada con la presencia de analito en la muestra. De manera similar, cuando se selecciona un ligando, que incluye una nanopartícula fluorescente, debe proporcionar una señal fluorescente relacionada con la presencia de analito en la muestra y qué señal puede detectarse como radiación electromagnética, particularmente como radiación en el rango ultravioleta, visible o infrarrojo.

"Opcional" u "opcionalmente" significa que el evento o condición descrito posteriormente puede, pero no necesariamente, ocurrir, y que la descripción incluye casos en los que ocurre el evento o condición y casos en los que no ocurre. Por ejemplo, "incluir opcionalmente" significa que el componente nombrado puede estar presente pero no necesariamente, y la descripción incluye situaciones en las que el componente nombrado está incluido y situaciones en las que el componente nombrado no está incluido.

Los términos "incluyen", "por ejemplo", "tal como" y similares se usan de manera ilustrativa y no pretenden limitar la presente invención.

Los artículos indefinidos "un" y "una" significan "al menos uno" o "uno o más" cuando se usan en esta solicitud, incluidas las reivindicaciones, a menos que se indique específicamente lo contrario.

- 5 Los siguientes procedimientos generales se emplearon en la preparación y evaluación de nanopartículas, y conjugados o aductos, de la presente invención.

Preparación de nanopartículas fluorescentes

10 Los procesos e intermedios para preparar nanopartículas fluorescentes de la invención se proporcionan como realizaciones adicionales de la invención y se ilustran mediante los siguientes procedimientos en los que los significados de los radicales genéricos son como se dan a menos que se especifique lo contrario.

15 En las realizaciones, se puede preparar una nanopartícula fluorescente de la invención, por ejemplo, mezclando un compuesto fluorescente reactivo, tal como un material fluorescente reactivo, tal como un colorante (D) y un compuesto de organosilano correactivo tal como, un compuesto de silano organofuncional (OS) conocido para formar una partícula de núcleo fluorescente (D-OS); y mezclar la partícula central resultante (D-OS) con un compuesto formador de sílice, como un (Si(OR)<sub>4</sub>), para formar una cubierta de sílice en el núcleo cuyo producto es una nanopartícula fluorescente (D-OS)(SiO<sub>2</sub>).

20 La relación equivalente molar del material fluorescente reactivo (D) y el compuesto organosilano (OS) correactivo puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:100. La relación equivalente molar de la partícula de núcleo fluorescente (D-OS) al compuesto formador de sílice (Si(OR)<sub>4</sub>) puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:100.

25 Las nanopartículas de la presente invención se pueden unir selectivamente a uno o ambos ligandos y analitos mediante, por ejemplo, cualquier reacción de acoplamiento químico conocida tal como el acoplamiento con carbodiimida. Otros procedimientos de acoplamiento incluyen el uso de carboxilatos, ésteres, alcoholes, carbamidas, aldehídos, aminas, óxidos de azufre, óxidos de nitrógeno o haluros, y se pueden usar otros procedimientos conocidos en la técnica.

El acoplamiento de una nanopartícula fluorescente a un ligando, o una nanopartícula fluorescente ligada a un analito, y combinaciones similares, generalmente se puede lograr mediante la aplicación de los procedimientos y principios descritos en la Patente de los Estados Unidos No. 6,268,222, u otros procedimientos conocidos en la técnica tal como se aplica a la presente invención.

30 En realizaciones, la nanopartícula fluorescente unida, tal como una nanopartícula fluorescente de superficie modificada de la invención, se puede preparar, por ejemplo, a partir de una nanopartícula fluorescente de nanopartícula fluorescente preformada (D-OS)(SiO<sub>2</sub>) y un ligando, tal como un compuesto biológicamente activo (de fórmula X<sub>1</sub>-R<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>), y opcionalmente un precursor conector (de fórmula Z<sub>1</sub>-L-Z<sub>2</sub>), en el que X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, Z<sub>1</sub> y Z<sub>2</sub> pueden seleccionarse de los valores de la tabla a continuación. En ausencia de un precursor enlazador opcional, los grupos silanol (Si-OH) de la superficie de la cubierta de sílice se pueden usar para unir o asociar con el ligando. El ligando y el precursor del enlazador se pueden hacer reaccionar o polimerizar usando técnicas sintéticas bien conocidas (por ejemplo, por condensación) para proporcionar una nanopartícula fluorescente ligada o un producto unido de la invención. Dependiendo del grupo funcional reactivo (X<sub>1</sub> o X<sub>2</sub>) del ligando, se puede seleccionar un grupo funcional correspondiente (Z<sub>1</sub> o Z<sub>2</sub>) de la siguiente tabla, para proporcionar un enlace éster, enlace tioéster o enlace amida en la nanopartícula fluorescente ligada o producto vinculado.

Grupo funcional sobre ligando (X <sub>1</sub> o X <sub>2</sub> )	Grupo funcional sobre el precursor del enlazador (Z <sub>1</sub> o Z <sub>2</sub> )	Enlace resultante en la nanopartícula fluorescente ligada
-COOH	-OH	Éster
-COOH	-NHR	Amida
-COOH	-SH	Tioéster
-OH	-COOH	Éster
-SH	-COOH	Tioéster
-NHR	-COOH	Amida

(continuación)

Grupo funcional sobre ligando (X <sub>1</sub> o X <sub>2</sub> )	Grupo funcional sobre el precursor del enlazador (Z <sub>1</sub> o Z <sub>2</sub> )	Enlace resultante en la nanopartícula fluorescente ligada
-SO <sub>3</sub> H	-OH	Éster sulfato
-OH	-SO <sub>3</sub> H	Éster sulfato

Como quedará claro para un experto en la técnica, se pueden usar grupos protectores adecuados durante la reacción de ligación. Por ejemplo, otros grupos funcionales presentes en el compuesto biológicamente activo, en la superficie de las nanopartículas, o el precursor del conector pueden protegerse parcial o completamente durante la ligación, y los grupos protectores pueden eliminarse posteriormente para proporcionar las nanopartículas fluorescentes ligadas de la invención. Los grupos protectores adecuados y los procedimientos para su incorporación y eliminación son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Greene, T.W.; Wutz, P.G.M. "Protecting Groups In Organic Synthesis" segunda edición, 1991, Nueva York, John Wiley & sons, Inc.).

Además, cuando se hace reaccionar un ácido carboxílico con un grupo hidroxilo, un grupo mercapto o un grupo amina para proporcionar un enlace éster, enlace tioéster o un enlace amida, el ácido carboxílico puede activarse antes de la reacción, para ejemplo, por formación del cloruro de ácido correspondiente. En la técnica se conocen numerosos procedimientos para activar los ácidos carboxílicos y para preparar enlaces éster, enlaces tioéster y enlaces amida (véase, por ejemplo, Advanced Organic Chemistry: Reaction Mechanisms and Structure, 4th ed., Jerry March, John Wiley & Sons, páginas 419-437 y 1281).

La superficie de la cubierta de sílice de las nanopartículas puede modificarse adicionalmente si se desea, por ejemplo, mediante reacciones de funcionalización de la superficie usando agentes de reticulación conocidos para proporcionar grupos funcionales de superficie y como se ilustra en el presente documento. Los agentes de reticulación son, por ejemplo, divinilbenceno, dimetacrilato de etilenglicol, trimetacrilato de trimetilpropano, N,N'-metileno-bis-acrilamida, alquil éteres, azúcares, péptidos, fragmentos de ADN u otros agentes equivalentes funcionalmente conocidos. Es evidente para un experto en la técnica que muchos agentes de reticulación pueden usarse en combinación con, o adecuados para usar como ligando en la formación de nanopartículas fluorescentes ligadas de la presente invención. Es fácilmente evidente para un experto en la materia en posesión de la presente invención que los agentes de reticulación pueden usarse en reacciones de modificación de superficie para modificar las propiedades de superficie de nanopartículas fluorescentes, o nanopartículas fluorescentes ligadas, y como se ilustra en este documento.

#### Materiales y procedimientos

Todos los reactivos se usaron tal como se recibieron sin purificación ni destilación adicionales. La molaridad de amoníaco se determinó mediante valoración con indicador de azul de metilo antes de cada síntesis. La vidriería se limpió por los procedimientos descritos en la literatura y se secó con una pistola de calor antes del procedimiento sintético. El volumen después de la mezcla se ignoró en los cálculos de molaridad. La cantidad de 3-aminopropiltrióxido de silano (APTS) en la síntesis del núcleo fluorescente no se tuvo en cuenta en los cálculos de la molaridad del monómero en la Tabla I.

#### Materiales de síntesis de nanopartículas

Etanol absoluto (Aldrich), tetrahidrofurano (Aldrich), hidróxido de amonio (Fluka, 28%), tetraetoxisilano (Aldrich, 98%), 3-Aminopropiltrióxido de silano (Aldrich, 99%), 3-Mercaptopropiltrióxido de silano (Gelest, 99%), Tetrametilrodamina-5-(y -6-)- isotiocianato \*isómeros mixtos\* (TRITC) (sondas moleculares, 88%), Alexa Fluor® 488 C<sub>5</sub> maleimida (sondas moleculares, 97%), ácido carboxílico Alexa Fluor® 488, y succinimidil éster (sondas moleculares, ≥50%).

#### Preparación de nanopartículas de núcleo (semilla fluorescente) en general

Se midieron cantidades de agua, amoníaco y disolvente en cilindros graduados. La síntesis de partículas de semillas fluorescentes se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 1 L y se agitó con barras de agitación magnéticas revestidas con TEFLON® a aproximadamente 600 rpm, se añadieron agua desionizada y solución de amoníaco a etanol y se agitó. Se añadieron al recipiente de reacción aproximadamente 2 ml del precursor de colorante reactivo en etanol o THF que contiene aproximadamente 425 APTS micromolares. La mezcla resultante se agitó durante aproximadamente 1 a aproximadamente 3 horas a temperatura ambiente con el recipiente de reacción cubierto con papel de aluminio para minimizar la exposición a la luz para proporcionar una mezcla de partículas de semillas fluorescentes. El tetrahidrofurano (THF) y el etanol absoluto (EtOH) se destilaron bajo nitrógeno. Los colorantes orgánicos se llevaron a temperatura ambiente desde temperaturas de almacenamiento de aproximadamente -20°C, luego se colocaron en cabina con guantes.

#### Preparación de la cubierta de sílice en las partículas del núcleo (semilla fluorescente) en general

El revestimiento de la cubierta de sílice y la etapa de crecimiento se realizaron en la mezcla de reacción de

partículas de semilla fluorescente mencionada anteriormente con adición regular de disolvente, tal como etanol, metanol o isopropanol, para evitar cambios drásticos en la fuerza iónica de la solución a la vez que se agregaba la sílice que forma el monómero tetraetoxisilano. (TEOS). Esto evita la agregación de partículas durante la síntesis, lo que puede ampliar la distribución del tamaño de partículas.

##### 5 Caracterización de nanopartículas de fluorescencia

El tamaño de partícula y la distribución del tamaño de partícula de las nanopartículas fluorescentes resultantes se caracterizaron por microscopía electrónica (SEM) y espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS).

La figura 1 ilustra que las nanopartículas fluorescentes de la presente invención cubren todo el espectro de absorción UV-Vis.

10 La Figura 2A-B presenta un ejemplo de radio hidrodinámico y brillo de cada unidad estructural, colorante TRITC único, núcleo rico en colorante y una estructura núcleo/cubierta. La Figura 2 A ilustra que la curva FCS de cada unidad estructural se ajustó a un único coeficiente de difusión, lo que indica que las muestras son monodispersas dentro de la precisión de la medición. TRITC tiene un coeficiente de difusión de  $0,21 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ , de acuerdo con otros informes, correspondiente a un radio hidrodinámico de Stokes-Einstein de aproximadamente 1,0 nm (Figura 2A, círculos rojos). El núcleo es solo marginalmente más grande que el colorante libre y tiene un radio de 2,2 nm (Figura 2A, círculos verdes). Después de la adición de la cubierta de sílice, el radio de la partícula aumenta a 15 nm. Debido a la degradación de la radiación del haz de electrones durante el análisis TEM, las nanopartículas de sílice seca pueden parecer más pequeñas que el radio hidrodinámico.

20 Las Figuras 2B ilustran el brillo de las tres etapas de síntesis a la misma potencia de excitación. La amplitud de la autocorrelación proporciona el número de especies que se difunden, y la tasa de conteo promedio es una medida de los fotones recolectados del volumen focal ópticamente definido. Por lo tanto, se puede obtener la tasa de conteo por molécula para cada especie de difusión, que es una medida directa del brillo de una sonda. La fluorescencia del núcleo es en realidad menor que la del TRITC libre, lo que sugiere que el núcleo rico en colorantes densos se apaga fuertemente en comparación con el colorante libre. Sin embargo, al agregar una cubierta externa de sílice sin colorantes al núcleo, la fluorescencia aumenta en un factor de 30.

25 La figura 3A-D ilustra la accesibilidad al disolvente y el comportamiento de blanqueo de los intermedios de síntesis de nanopartículas fluorescentes. La accesibilidad al disolvente de las partículas del núcleo/cubierta se muestra en la Figura 3 A-C como un desplazamiento en el espectro de excitación y emisión tras el intercambio de disolvente. Los espectros de excitación y emisión de colorante libre y núcleo exhiben un desplazamiento al rojo después del intercambio de etanol a agua (Figura 3A, B). Sin embargo, los espectros de nanopartículas de sílice muestran poco o ningún desplazamiento espectral (Figura 3C), lo que sugiere que la capa de nanopartículas es en gran medida impermeable al solvente.

30 La figura 3D muestra el comportamiento de fotoblanqueo del colorante, núcleo, núcleo/cubierta y fluoresceína. Tanto el núcleo como el núcleo-cubierta blanquean menos que el TRITC libre, y el núcleo/cubierta muestra una reducción de fotoblanqueo en comparación con el núcleo. Es interesante observar que TRITC es un fluoróforo bastante fotoestable, por lo tanto, la diferencia en la fotoestabilidad entre los colorantes libres y las nanopartículas de sílice es pequeña. Sin embargo, en comparación con el isotiocianato de fluoresceína, un fluoróforo de blanqueo rápido, es obvio que las nanopartículas son mucho más fotoestables. En conjunto con los resultados del intercambio de solventes, estas mediciones indican que el colorante en los puntos CU es relativamente inaccesible para el solvente, y que esta protección permite una mayor fotoestabilidad.

35 La Figura 4 A-D ilustra el potencial de estas nanopartículas de sílice como marcadores para imágenes biológicas marcando el receptor FcεRI de los mastocitos de leucemia basófila de rata (RBL). Se sabe que los anticuerpos inmunoglobulina E (IgE) y su receptor de superficie celular, FcεRI, forman un complejo reversible pero estrecho. La IgE se adsorbió sobre la superficie de los puntos CU en la proporción óptima de 1:1, establecida mediante iteraciones de ensayos de unión. La Figura 4A, B muestra el marcado típico de las células RBL con nanopartículas de sílice adsorbidas en anticuerpos. En las secciones ecuatoriales de las células, solo se marcó la periferia de la célula, como se esperaba para el receptor de FcεRI transmembrana. Como control negativo, los mastocitos RBL se pre-sensibilizaron durante la noche con IgE antes de la incubación con nanopartículas de sílice desnudas.

40 Las Figuras 4 C, D ilustran que se observó muy poca tinción periférica, lo que indica una interacción mínima no específica entre las nanopartículas de sílice y la superficie celular.

La Figura 5 compara el brillo del colorante libre, las nanopartículas de sílice y los puntos cuánticos con un pico de fluorescencia a 577 nm (recuentos/partículas para nanopartículas de sílice y puntos cuánticos y recuentos/molécula para TRITC). Tanto los puntos cuánticos como los puntos CU son un orden de magnitud más brillante que el TRITC libre.

55 La Figura 6 presenta un ejemplo de propiedades de brillo fluorescente de las nanopartículas (10) fluorescentes de la presente invención en comparación con las perlas (20) de látex de poliestireno. Se usó espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS) para obtener las tasas de recuento para las nanopartículas y perlas de la

siguiente manera: las nanopartículas fluorescentes de 100 o 300 nanómetros tenían 299,1 kHz por partícula; y las cuentas de látex de poliestireno de 300 nanómetros tenían 69,84 kHz por cuenta. Las tasas de recuento de fluorescencia indicaron que las nanopartículas (10) fluorescentes eran aproximadamente cuatro veces más brillantes que las perlas de látex de poliestireno.

- 5 Se realizaron caracterizaciones fotofísicas para determinar: contenido de colorante por contenido de partículas, vidas de fluorescencia y secciones transversales de acción. La métrica de la sección transversal de la acción es esencialmente el producto del rendimiento cuántico y el perfil de absorbancia. Las mediciones de fluorescencia resueltas en el tiempo de fluorescencia versus tiempo en nanosegundos (ns) mostraron que un colorante incorporado en una nanopartícula exhibía una vida útil más corta que los colorantes libres en solución. La vida útil de fluorescencia para las nanopartículas se midió a 1,9 ns, mientras que la vida útil para TRITC se midió en 2,1 (ns). Solo a partir de estos datos de vida útil, se podría concluir que el colorante se apaga dentro de la partícula compacta de núcleo-cubierta, pero las mediciones de estado estacionario sugieren lo contrario. La combinación de la vida útil de la fluorescencia y la eficiencia cuántica permiten una determinación única de las constantes de velocidad radiante y no radiante. La mejora de la velocidad radiante es 2,2 veces mayor que el TRITC libre, lo que lleva al aumento general observado en la fluorescencia de un orden de magnitud.

15 A partir de mediciones de absorbancia en el intervalo de 250 a 650 nanómetros, se estableció que hay, por ejemplo, aproximadamente 20 moléculas de colorante por nanopartícula. Por ejemplo, la muestra R30 tenía aproximadamente 23 moléculas de colorante TRITC por nanopartícula; y la muestra R29 tenía aproximadamente 21 moléculas de colorante TRITC por nanopartícula. Sin embargo, las medidas de sección transversal de acción,  $\sigma_{2p}$  (GM) en el rango de 700 a aproximadamente 1.000 nm para dos preparaciones separadas de partículas de 25 nm (muestras R29 y R30) demostraron que R30 era casi dos veces más brillante que R29 en el rango y particularmente a absorbancia máxima a aproximadamente 700 y aproximadamente 840 nanómetros, a pesar de que el contenido de colorante es casi idéntico. Esta observación sugirió una gran complejidad asociada con los efectos de interacción entre el núcleo y la cubierta y pueden ser responsables de la eficiencia cuántica mejorada observada. Por lo tanto, es posible optimizar aún más las propiedades de fluorescencia de las nanopartículas de la presente invención, por ejemplo, para su uso como biomarcadores, mediante procedimientos directos, tales como cambiar el grosor del núcleo o cubierta como se describe en este documento.

La invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos no limitantes:

### Ejemplo 1

- 30 **Preparación de nanopartículas de núcleo rojo.** Se disolvieron 10 mg de tetrametilrodamina-5- (y -6)-isotiocianato (TRITC) en etanol. La relación molar de 3-aminopropiltriétoxissilano (APTS) a TRITC fue de 50 a 1, con 2 ml de etanol, por mg de APTS. Después de la disolución completa de TRITC en etanol, se añadió APTS al recipiente de reacción. La reacción se agitó en la oscuridad en la cabina con guantes durante aproximadamente 12 horas a temperatura ambiente.

### Ejemplo 2

#### Preparación de nanopartículas de núcleo verde.

- 40 Se disolvieron 5 mg de Alexa Fluor® 488 C<sub>5</sub> Maleimida en etanol. La relación molar de 3-mercaptopropiltriétoxissilano (MPTS) fue de 100 a 1, con 2 ml de etanol por mg de MPTS. Después de la disolución completa de TRITC en etanol, se añadió MPTS al recipiente de reacción y se agitó durante aproximadamente 12 horas en la oscuridad a temperatura ambiente.

- 45 Se disolvieron 5 mg de succinimidil éster de ácido carboxílico Alexa Fluor® 488, en THF. La relación molar de 3-aminopropiltriétoxissilano (APTS) a Alexa Fluor® 488 succinimidil éster de ácido carboxílico fue de 100 a 1, con 2 ml de THF por mg de APTS. Después de la disolución completa del succinimidil éster de ácido carboxílico Alexa Fluor® 488 en THF, se añadió APTS al recipiente de reacción y se agitó durante 12 horas en la oscuridad a temperatura ambiente. Debido a las pequeñas cantidades, los aductos fluorescentes de núcleo de colorante no se aislaron del medio de reacción antes de que se depositara la cubierta de sílice.

### Ejemplo 3

- 50 **Preparación de nanopartículas fluorescentes recubiertas con sílice dimensionadas.** La preparación de nanopartículas fluorescentes recubiertas con sílice de diferentes tamaños se realizó usando diferentes cantidades molares relativas de reactivos como se describe anteriormente. Las cantidades molares de reactivos para la síntesis de partículas de 20 nm a 200 nm se tabulan en la Tabla I. Todo el recubrimiento de sílice de los procedimientos de nanopartículas fluorescentes se realizó en condiciones ambientales, es decir, a temperatura ambiente con etanol como disolvente. Sigue un procedimiento representativo.

- 55 El núcleo de sílice rico en colorante se sintetiza añadiendo 170  $\mu$ M del precursor sintetizado según el Ejemplo 2 y el Ejemplo 3 en cantidades apropiadas de catalizador, agua y disolvente como se tabula en la Tabla I. Después de la adición, la mezcla se dejó reaccionar durante la noche. A esta mezcla que contenía partículas nucleares

5 fluorescentes se añadieron continuamente 2 ml de TEOS en 100 ml de disolvente adicional, gota a gota, tal como durante aproximadamente 20 minutos. La cantidad mayor restante de TEOS se añadió a una velocidad más rápida, tal como durante un periodo de aproximadamente 45 minutos con la adición simultánea de 400 ml de disolvente adicional. Opcionalmente, se añadió agua en esta etapa para hacer crecer partículas mayores de aproximadamente 100 nm y para mantener la relación molar de agua a TEOS como se tabula en la Tabla I. La suspensión resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente en la oscuridad.

**Tabla I. Reactivos (en molaridad) para la preparación y el resultado**

Tamaño nominal de partícula	[NH <sub>3</sub> ]	[H <sub>2</sub> O]	[TEOS]	Solvente	Tamaño por FCS	Tamaño por SEM
500 nm	6,127 M	16,83 M	0,1923M	i-PrOH	-	500 nm
300 nm	6,127 M	16,83 M	0,1923M	EtOH	-	300 nm
200 nm	3,892 M	10,80 M	0,2443M	EtOH	-	200 nm
100 nm	3,892 M	10,80 M	0,2443M	i-PrOH:MeOH (v:v=3:1)	-	125 nm
70 nm	0,0085 M	17,60 M	0,2003M	EtOH	-	75 nm
50 nm	0,0096 M	26,68 M	0,1518M	MeOH	48,6 nm	-
40 nm	0,318 M	1,153 M	0,155M	EtOH	37,6 nm	-
30 nm	0,150 M	1,710 M	0,155M	EtOH	28,8 nm	30 nm
25 nm	0,200 M	1,494 M	0,155M	EtOH	24,4 nm	-

**Tamaño de partícula de nanopartículas fluorescentes recubiertas con cubierta de sílice**  
i-PrOH = isopropanol; MeOH = metanol; EtOH = etanol  
La fuente de amoniaco de 25 nm a 40 nm y de 100 nm a 500 nm era hidróxido de amonio al 28%; La fuente de amoniaco para los tamaños nominales de nanopartículas de muestra de 50 nm y 70 nm fue amoniaco 2,0 M en metanol

10 Alternativamente, para producir nanopartículas que tienen un rango de tamaño de partícula estrecho por debajo de aproximadamente 70 nm, se añadió TEOS en pequeñas alícuotas intermitentemente, a una mezcla que contiene el núcleo fluorescente rico en colorante, tal como 300 microlitros en intervalos de aproximadamente 10 a 15 minutos, y se agitó durante la noche a temperatura ambiente en la oscuridad. La relación molar de agua desionizada a monómero se mantuvo aproximadamente al menos 6 veces, pero no más. Para controlar mejor el contenido de agua en la mezcla de reacción, se usó amoniaco 2,0 M como fuente de catalizador, disuelto en etanol, metanol o isopropanol, dependiendo del disolvente primario de la síntesis, tal como amoniaco 2,0 M en etanol. Después de que se preparó la partícula de núcleo/semilla rica en colorante, se añadió monómero de tetraetilortosilicato intermitentemente, tal como 300 microlitros cada 10 minutos para hacer crecer la cubierta silícea. En contraste con el procedimiento de partículas más grandes en el que se añadió monómero continuamente a través de un embudo de goteo, el procedimiento de tamaño de partícula más pequeño (para partículas por debajo de aproximadamente 70 nm) se añadió el monómero TEOS de forma intermitente. El procedimiento alternativo para preparar nanopartículas fluorescentes recubiertas con cubierta de sílice se diseñó porque la distribución del tamaño de las nanopartículas de sílice preparadas por el procedimiento Stöber conocido (J. Colloid e Interface Sci., 26 62-69 (1968)) tiene una característica de autoafilado como partícula el tamaño aumenta más allá de 70 nm a medida que se agrega más monómero a la mezcla de reacción. Por lo tanto, las nanopartículas de sílice menores de 70 nm generalmente tienen una distribución de tamaño mucho más amplia. Por lo tanto, el primer procedimiento mencionado del Ejemplo 3 se modificó como se describe a continuación para obtener nanopartículas con una distribución de tamaño más estrecha que la que podría esperarse para tamaños de partícula en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 70 nm.

#### Ejemplo 4

30 **Ligación de nanopartículas (acoplamiento) con IgE por adsorción.** Las nanopartículas fluorescentes recubiertas con sílice del Ejemplo 3 se diluyeron (1:10-1:20) con solución salina tamponada con fosfato (PBS) o tampón Tyrodes a pH 7. Inmunoglobulina E (IgE) (0,85 mg/ml de concentración de reserva) se adsorbió en las nanopartículas fluorescentes incubando con IgE durante aproximadamente 3 horas a temperatura ambiente para proporcionar, por ejemplo, relaciones de nanopartículas-IgE de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:4. Para nanopartículas mayores de aproximadamente 50 nm, la IgE no unida se eliminó por centrifugación. Para nanopartículas de tamaño de 50 nm o menos, la IgE no unida se eliminó agregando 100 microlitros (en un volumen total de 500 microlitros de nanopartículas-IgE) de 0,25% en peso de partículas de látex de tamaño 1:2 micras. La IgE no unida se adhirió a las

partículas de látex grandes que luego se separaron de la suspensión si no se las perturbaba en varias horas, por ejemplo, con incubación durante la noche a 4°C. Se confirmó que la masa residual del sedimento era principalmente partículas de látex unidas con IgE y desechadas. El sobrenadante resultante que contiene la nanopartícula acoplada a IgE (nanopartícula fluorescente ligada a IgE) se separó cuidadosamente y se colocó en un vial. Las muestras de nanopartículas acopladas a IgE resultantes (es decir, IgE adsorbida en nanopartículas) se almacenaron a 4°C para experimentos de unión celular. Las nanopartículas acopladas a IgE se diluyeron en Tyrodes-BSA antes de la unión celular. La dilución fue de acuerdo con la densidad de número de nanopartículas acopladas a IgE deseada por célula.

### Ejemplo 5

10 **Funcionalización de la superficie de las nanopartículas.** La superficie de las nanopartículas se puede modificar químicamente para mejorar la versatilidad y estabilidad de las nanopartículas, por ejemplo, introduciendo grupos de ácido carboxílico o grupos químicos funcionales similares. La introducción de grupos funcionales, como los grupos de ácido carboxílico, en la superficie de las nanopartículas recubiertas con sílice puede proporcionar puntos de unión para permitir la unión covalente de biomoléculas, por ejemplo, proteínas y anticuerpos, a la superficie de las nanopartículas. Los grupos funcionales de superficie, especialmente los grupos ionizables, proporcionan otras propiedades deseables a las nanopartículas, como la estabilización de carga en medios tamponados. Los grupos de superficie carboxilato cargados pueden mantener las nanopartículas como dispersiones coloidales de partículas individuales que evitan o minimizan la aglomeración de nanopartículas. Los procedimientos de funcionalización de la superficie de nanopartículas son conocidos e incluyen, por ejemplo, modificación de carbodiimida y como se ilustra en este documento.

#### Materiales

3-aminopropildimetiletoxosilano (APDMES) (Gelest Inc.); Reactivo de entrecruzamiento bifuncional (Pierce Endogen Inc.); adipato de metil N-succinimidilo (MSA).

25 La funcionalización de la superficie de nanopartículas se realizó como sigue. Se usó una suspensión de 20 ml de nanopartículas con un diámetro de 25 nm, como se describe en la Tabla I. La concentración de nanopartículas fue de 4,33 mg/ml según lo determinado por espectroscopía de correlación de fluorescencia, y por secado y pesaje de volúmenes conocidos de la suspensión. Otros tamaños y concentraciones de nanopartículas pueden modificarse en la superficie de acuerdo con este procedimiento cuando se adaptan adecuadamente en vista de las diferencias en el tamaño de las partículas, el área superficial, la concentración y consideraciones similares.

30 Las nanopartículas fluorescentes que tienen una cubierta de sílice se limpiaron mediante diálisis después de su preparación inicial descrita anteriormente. La concentración de la suspensión de nanopartículas con cubierta de sílice se determinó secando alícuotas de la suspensión de nanopartículas en un horno de vacío y pesando, o mediante espectroscopía de correlación de fluorescencia. Suponiendo una densidad de 2 g/ml y conociendo el tamaño de las nanopartículas, se calculó que el número de partículas por ml de suspensión era de aproximadamente  $1,78 \cdot 10^{16}$ . El área de superficie total de nanopartículas, suponiendo partículas sólidas, fue, por ejemplo, de aproximadamente  $3,35 \cdot 10^{19}$  nm<sup>2</sup>. La densidad de los grupos de silanol se puede estimar en aproximadamente 1,4 grupos de OH por nanómetro cuadrado de acuerdo con los valores de la literatura (por ejemplo, R. Iler, The Chemistry of Silica), y por lo tanto hay aproximadamente  $7,78 \cdot 10^5$  mol de grupos de -OH disponibles para reacción con APDMES para una cobertura de amina del 100%. Se añadió APDMES en un exceso molar de 2 con aproximadamente 5 mg de fluoruro de amonio como catalizador, y se dejó reaccionar durante aproximadamente 12 horas a temperatura ambiente y se protegió de la luz ambiental. El exceso de APDMES sin reaccionar se dializó en tampón fosfato a pH 7 durante 12 horas. Las nanopartículas aminadas resultantes suspendidas en tampón fosfato pH 7 se hicieron reaccionar luego con un exceso 2 molar de MSA disuelto en dimetil sulfóxido a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 a 6 horas. El exceso de MSA sin reaccionar se dializó en tampón fosfato a pH 9,5 durante aproximadamente 6 a 12 horas, lo que también hidroliza el grupo éster en el MSA, para proporcionar grupos de ácido carboxílico unidos covalentemente a la superficie de la nanopartícula.

#### Caracterización de nanopartículas por FTIR

50 Los productos de nanopartículas en cada etapa de funcionalización descrita anteriormente se caracterizaron por espectroscopía de infrarrojos con transformadas de Fourier (FTIR). Las bandas de vibración de los grupos amida monosustituidos a  $1500-1600$  cm<sup>-1</sup> indicaron el enlace entre los grupos amina del compuesto silano APDMES y los grupos succinimidil éster del compuesto MSA, así como la señal característica de ácido carboxílico a  $1700$  cm<sup>-1</sup>. Los cambios espectroscópicos observados en comparación con las nanopartículas iniciales indicaron reacciones exitosas de funcionalización de la superficie.

### Ejemplo 6

55 **Ligación de nanopartículas (acoplamiento) por conjugación covalente** Otros ejemplos de funcionalización de la superficie se pueden lograr por conjugación covalente de nanopartículas fluorescentes con diversas biomoléculas como se describe anteriormente.

**Ejemplo 7**

Unión de células con nanopartículas fluorescentes acopladas a IgE. Los experimentos de unión de especificidad usando un sistema modelo de mastocitos de leucemia basófila de rata (RBL) demostraron características de unión específicas de las nanopartículas fluorescentes basadas en sílice. Las células (por ejemplo, los mastocitos de leucemia basófila de rata (RBL)) se recogieron usando Trypsin-EDTA. Luego se contaron las células para determinar la concentración celular (número de células por ml). El número apropiado de células se incubó con nanopartículas acopladas a IgE, por ejemplo, alrededor de  $2 \times 10^5$  nanopartículas acopladas a IgE por célula, durante aproximadamente 1 hora en hielo para evitar cualquier internalización. Las células unidas a nanopartículas-IgE resultantes, es decir, nanopartículas acopladas a IgE unidas a células, se lavaron con Tyrodes-BSA, y las células se examinaron bajo un microscopio confocal para evaluar la unión específica.

Las imágenes de microscopio confocal mostraron, por ejemplo, la superficie superior de las células decoradas con las nanopartículas rojas, y el anticuerpo IgE se marca con un fluoróforo verde para mostrar la ubicación conjunta del anticuerpo con las nanopartículas. Otro conjunto de imágenes, tomadas de la vista territorial de las células, mostró una vista confocal alternativa donde los movimientos difusivos de los receptores de anticuerpos marcados por las nanopartículas fluorescentes se pueden monitorizar a través de SPT. Se realizaron controles apropiados para verificar la unión no específica de la siguiente manera. Las células de control se sensibilizaron previamente durante la noche usando IgE, de modo que se bloquearon todos los sitios receptores. Estas células bloqueadas se cosecharon de la misma manera que anteriormente usando Trypsin-EDTA, marcado con las mismas nanopartículas acopladas a IgE por concentración celular. Estas células se observaron luego bajo el microscopio confocal para detectar cualquier unión (o adherencia) inespecífica.

Con referencia a las Figuras 7A y 7B, se ilustra un ejemplo de alta especificidad de unión biomolecular de, por ejemplo, nanopartículas fluorescentes de 100 o 300 nanómetros de diámetro de la presente invención (Figura 7A) en comparación con perlas de látex de poliestireno (Figura 7B) medidas por estadísticas de recuento celular. El resultado indica que las interacciones específicas (representadas por el lado izquierdo de los pares de barras) de los mastocitos de leucemia basófila de rata (RBL) junto con nanopartículas acopladas con IgE y células acopladas con perlas de látex de poliestireno son comparables, mientras que las interacciones no específicas menos deseables o no deseadas (representadas por el lado derecho de los pares de barras), como las interacciones "adherentes", fueron mayores para las perlas de látex de poliestireno y células en comparación con las nanopartículas y células acopladas a IgE. Se espera un resultado comparable para las nanopartículas fluorescentes de la presente invención con diámetros entre 25 y 100 nanómetros.

En las Figuras 7A y 7B, las leyendas:

"IgE<sub>M</sub>" se refiere a IgE de ratón que se unirá específicamente a los receptores de IgE de los mastocitos de leucemia basófila de rata (RBL);

"control: IgE<sub>H</sub>" se refiere a IgE humana que no se unirá a los receptores de IgE de las células de rata mencionadas anteriormente; y

"control: partículas solas" se refiere a la unión respectiva de nanopartículas fluorescentes acopladas a IgE con células, y la unión de perlas de látex de poliestireno con células.

**Ejemplo 8**

**Seguimiento de partículas individuales (SPT).** Se realizaron experimentos de seguimiento de nanopartículas fluorescentes individuales siguiendo confocalmente el movimiento de un punto fluorescente brillante único seleccionado (correspondiente a una partícula unida a un receptor único) durante aproximadamente 20-30 minutos para seguir la difusión del receptor al que se unió la partícula individual. Alternativamente, podría rastrearse una pluralidad de puntos fluorescentes brillantes individuales seleccionados.

El seguimiento de partículas individuales evalúa la difusión lateral de componentes individuales en las superficies celulares. Este procedimiento se basa en la observación directa de sondas fluorescentes brillantes que se conjugan específicamente con macromoléculas de interés. El seguimiento de componentes individuales revela una variedad de comportamientos interesantes y útiles que incluyen el confinamiento a una pequeña región o movimiento a lo largo de un trayecto. Esta información permite comprender cómo interactúan los componentes dentro de las células, en las membranas celulares y en estructuras o componentes similares. Sin embargo, el procedimiento depende en gran medida de la calidad de las sondas. Una deficiencia significativa del procedimiento ha sido la unión no específica de las partículas a las células. Las nanopartículas fluorescentes y las nanopartículas fluorescentes ligadas de la presente invención proporcionan brillo mejorado y alta especificidad de conjugación a un componente de interés. Se demostró que las nanopartículas fluorescentes ligadas son biocompatibles y minimizan las interacciones de unión no específicas.

**Ejemplo 9**

**Nanopartículas de sílice mesoporosa para administración dirigida y liberación controlada de un agente**

**terapéutico.** Se prepararon nanopartículas de núcleo fluorescente de acuerdo con, por ejemplo, los ejemplos 1 y 2, y de acuerdo con el procedimiento general de preparación del núcleo anterior.

#### Cubierta mesoporosa

5 Se disolvió un agente sustantivo de superficie, bromuro de N-hexadeciltrimetilamonio (2,4 g, 6,6 mmol, HDTB), en la mezcla de reacción que contenía nanopartículas de núcleo de semilla fluorescente. La mezcla se agitó (450 rpm) hasta que el HDTB se disolvió completamente y luego se añadieron 3,4 g de TEOS (16 mmol) de una vez. El HDTB sirve como agente de plantilla alrededor del cual se ordena y perturba la formación de la cubierta de sílice para permitir la formación de poros mediante la posterior eliminación del HDTB asociado con la superficie. La posterior limpieza o eliminación de la HDTB de la nanopartícula proporciona nanopartículas fluorescentes que tienen una  
10 cubierta de sílice mesoporosa.

#### Procedimiento de limpieza

Después de aproximadamente 5 horas de reacción con TEOS, se recuperó un sólido a partir de tres lavados por centrifugación a 6.000 rpm. En cada etapa de centrifugación, el sobrenadante se renovó con etanol absoluto. Dos lavados por filtración en agua desionizada siguieron el procedimiento de centrifugación. Los pasos de centrifugación y filtración eliminaron aproximadamente el 90% del tensioactivo HDTB. Las nanopartículas recuperadas que  
15 contenían sólidos finalmente se suspendieron en etanol absoluto. La suspensión se homogeneizó por agitación ultrasónica.

Se realizó una destilación al vacío para intercambiar el disolvente de etanol con dimetilsulfóxido (DMSO). Las concentraciones finales se determinaron secando una alícuota de la suspensión y pesando la masa sólida. Las  
20 nanopartículas mesoporosas resultantes en DMSO fueron adecuadas para cargar agente terapéutico como se ilustra a continuación.

#### Carga de nanopartículas mesoporosas con un agente terapéutico

Las nanopartículas mesoporosas anteriores suspendidas en DMSO se agitaron y transfirieron a un tubo Falcon de 50 ml. La solución se centrifugó a 3.000 rpm durante aproximadamente 5 minutos y el volumen de DMSO se redujo  
25 a 4 ml vertiendo 6 ml del líquido sobrenadante. Se añadió a la solución una muestra de 16 mg de un agente terapéutico, camptotecina (CPT). Después de 5 horas, la solución se centrifugó y se realizaron dos lavados con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Para cada lavado, se añadieron 20 ml de PBS, y las partículas se sometieron a sonicación y centrifugaron. La sonicación se realizó a una potencia del 15% con una frecuencia de pulso de 1,0 segundo encendido y 1,0 segundo apagado durante 30 segundos de pulso o hasta que la solución parecía homogénea. La centrifugación se realizó a 25°C a 3.000 rpm durante 5 minutos. Las partículas cargadas de  
30 agente terapéutico se almacenaron a temperatura ambiente.

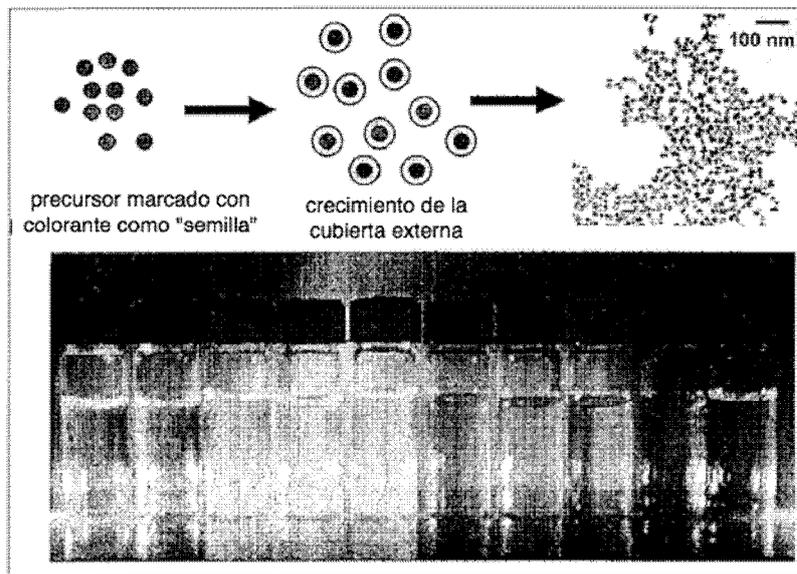
La Figura 8A ilustra que tanto el núcleo rojo como el colorante verde están inmovilizados dentro de los poros de las nanopartículas a 488 nm. La Figura 8A ilustra además una partícula mesoporosa con un núcleo rojo atrapado con algo de colorante verde dentro de la porosidad, produce dos señales fluorescentes de las partículas. Cuando una  
35 partícula se excita a 488 nm, que es el máximo de absorción para el colorante verde, la señal para el colorante verde se mejora mucho más que la del núcleo rojo, porque el colorante rojo solo se absorbe mínimamente. Cuando la misma suspensión de partículas se excita a 585 nm, en la cual el núcleo rojo absorbe al máximo, la señal roja se potencia, lo que confirma aún más el hecho de que tenemos un núcleo rojo dentro de las partículas mesoporosas. En la absorbancia máxima del núcleo rojo, excitación a 585 nm, el núcleo rojo todavía está inmovilizado dentro de  
40 las nanopartículas.

La Figura 8B ilustra la síntesis de MCM 48 que implica el uso de una molécula de tensioactivo bromuro de N-hexadeciltrimetilamonio. Allí también se describe el protocolo para inmovilizar un colorante verde o un agente  
quimioterapéutico.

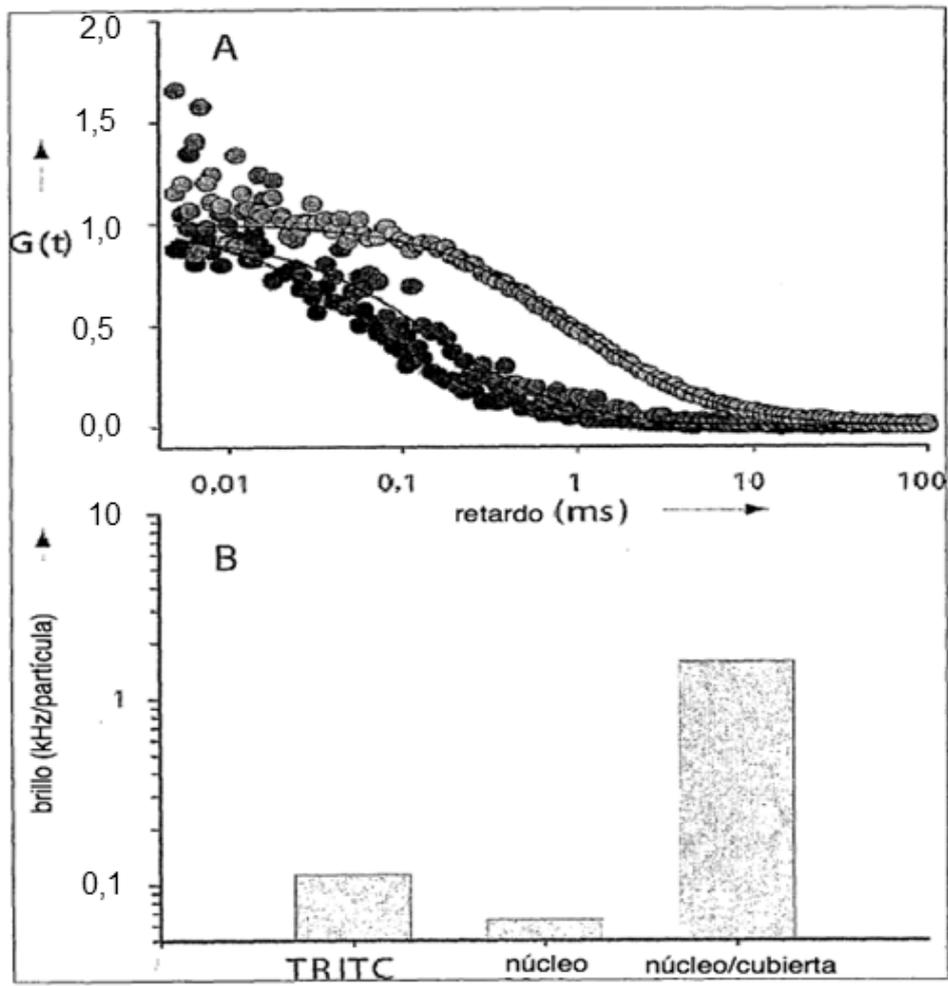
La Figura 8C ilustra la caracterización TEM de las nanopartículas: Las nanopartículas (sin un núcleo rojo) se embebieron en epoxi, se cortaron con micrótopo a secciones delgadas de 30 nm y se colocaron en una rejilla de  
45 cobre. La imagen se tomó en un TEM LEO 922 con filtración de energía, a 200 keV en un campo elástico claro con un aumento de 44.000 X. Los mesoporos ordenados cúbico-bicontinuos son claramente visibles.

**REIVINDICACIONES**

1. Una nanopartícula fluorescente que comprende:
  - un núcleo, comprendiendo el núcleo un compuesto de silano fluorescente y que tiene un diámetro de 25 nm a 200 nm;
- 5 una cubierta de sílice en el núcleo, en la que la cubierta de sílice tiene un grosor de 25 nm a 800 nm y en la que la cubierta de sílice cubre del 10 al 100 por ciento del área superficial del núcleo; y
  - un ligando, el ligando conjugado o dispuesto como recubrimiento en la superficie de la nanopartícula fluorescente para formar una nanopartícula fluorescente ligada, cubriendo el ligando de 0,1 a 100 por ciento del área de la superficie del núcleo,
- 10 **caracterizada porque** el núcleo comprende organosilano que tiene la fórmula general  $R_{(4-n)}SiX_n$ , donde
  - X es etoxi, metoxi o 2-metoxi-etoxi;
  - R es un radical orgánico monovalente de 1 a 12 átomos de carbono; y
  - n es un número entero de 0 a 3, y en el que el radical orgánico monovalente comprende un grupo orgánico funcional mercapto, y
- 15 **caracterizado porque** el diámetro de la nanopartícula fluorescente es de 50 nm a 1.000 nm.
2. La nanopartícula fluorescente de la reivindicación 1, que comprende además un agente terapéutico en la que el agente terapéutico está en la superficie o conjugado con la superficie de la nanopartícula fluorescente.
3. La nanopartícula fluorescente de la reivindicación 1 o 2, en la que el agente terapéutico es absorbido en los intersticios y/o poros de la cubierta de sílice de la nanopartícula fluorescente, o está dispuesto como recubrimiento sobre la cubierta de sílice de la nanopartícula fluorescente.
- 20 4. La nanopartícula fluorescente de la reivindicación 1, 2 o 3, en la que la cubierta de sílice está incompleta, y en la que el agente terapéutico está asociado con el núcleo fluorescente.
5. La nanopartícula fluorescente de las reivindicaciones 2 a 4, en la que el agente terapéutico está asociado con el ligando.
- 25 6. La nanopartícula fluorescente de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso:
  - como agente de diagnóstico específico de diana,
  - como agente de monitorización de movimiento para células o componentes celulares,
  - como portador farmacéutico,
  - como vehículo de administración de fármacos,
  - 30 como agente de formación de imágenes fluorescentes,
  - como composición farmacéutica,
  - en el marcado, detección, identificación y monitorización de movimiento de un analito biológico o no biológico,
  - en acoplamiento pasivo o covalente de material biológico en la detección de un cáncer o tumor.
7. Un procedimiento para monitorizar el movimiento de un componente celular de una célula que comprende:
  - 35 poner en contacto la célula con la nanopartícula fluorescente de las reivindicaciones 1 a 5 para formar una célula decorada selectivamente con la nanopartícula fluorescente ligada; y grabar el movimiento de un lugar fluorescente.
8. Un kit que comprende:
  - la nanopartícula fluorescente de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en:
    - detección de un analito, o
    - 40 detección y monitorización de un componente de la superficie celular, en el que la nanopartícula fluorescente ligada detecta el componente de la superficie celular.
9. El kit de la reivindicación 8 para detectar y monitorizar un componente de la superficie celular, que comprende adicionalmente un registrador para monitorizar el componente de la superficie celular.



*Fig. 1*



*Fig.2*

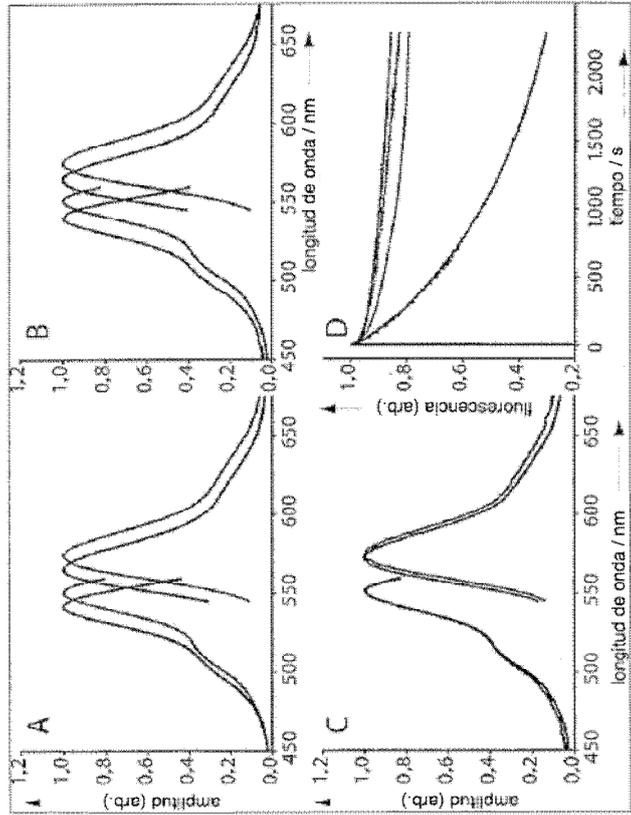
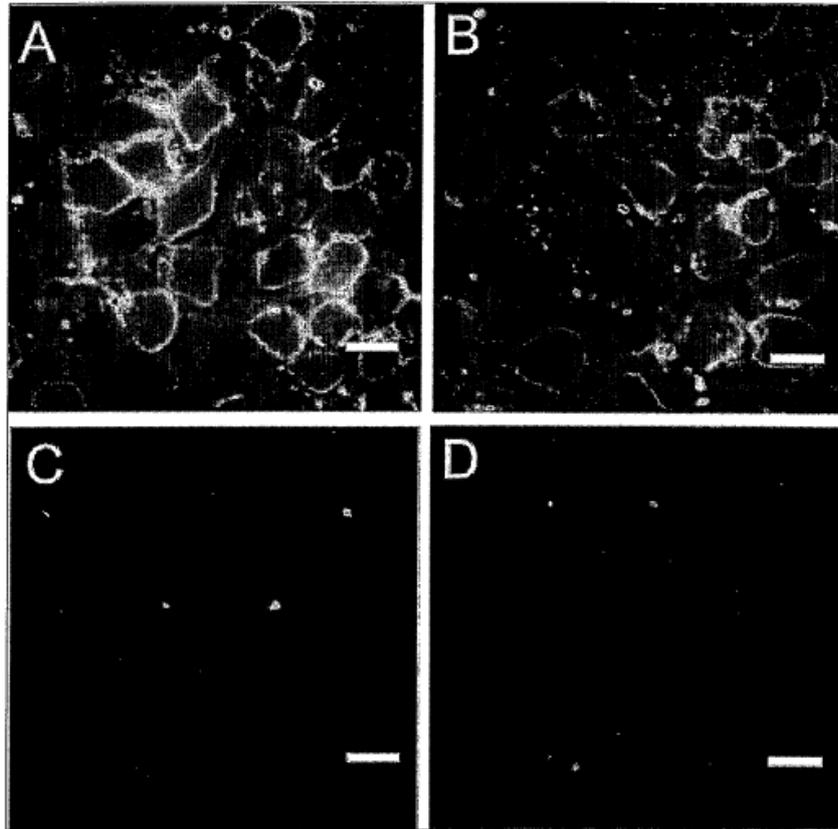


Fig. 3



*Fig. 4*

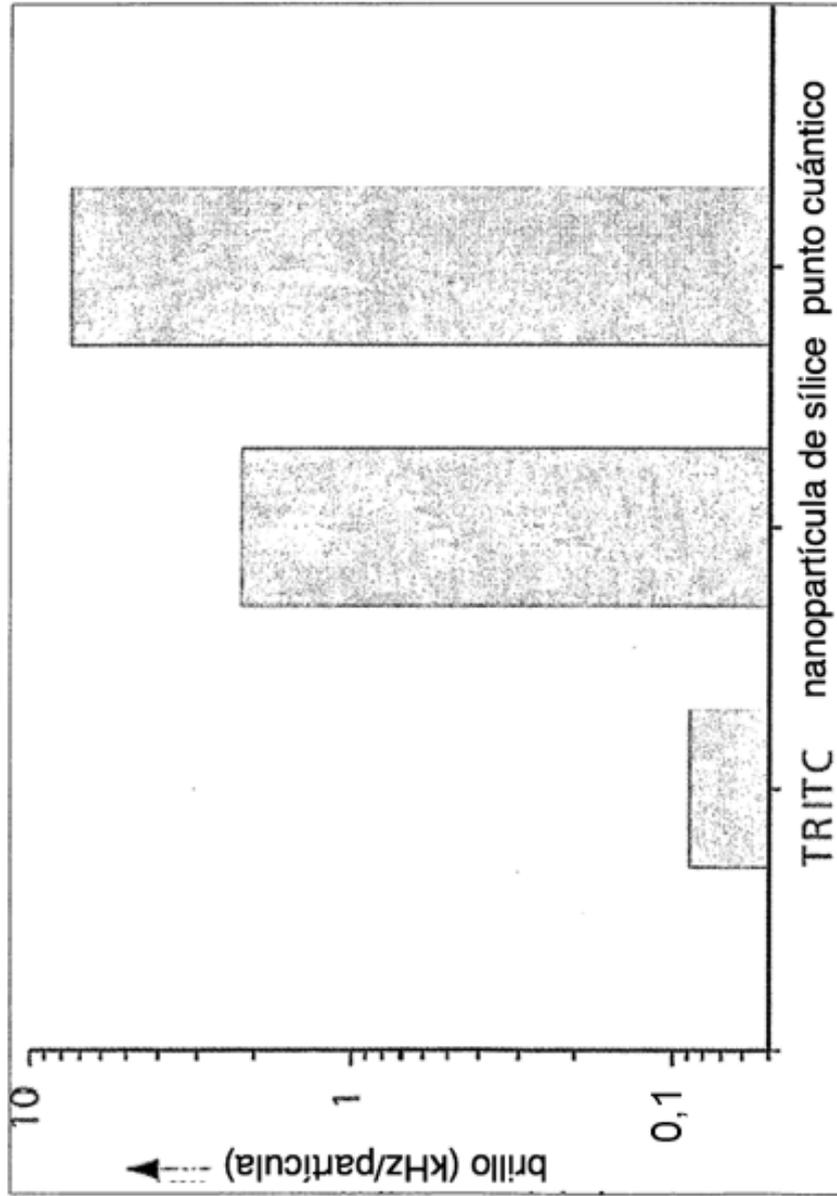
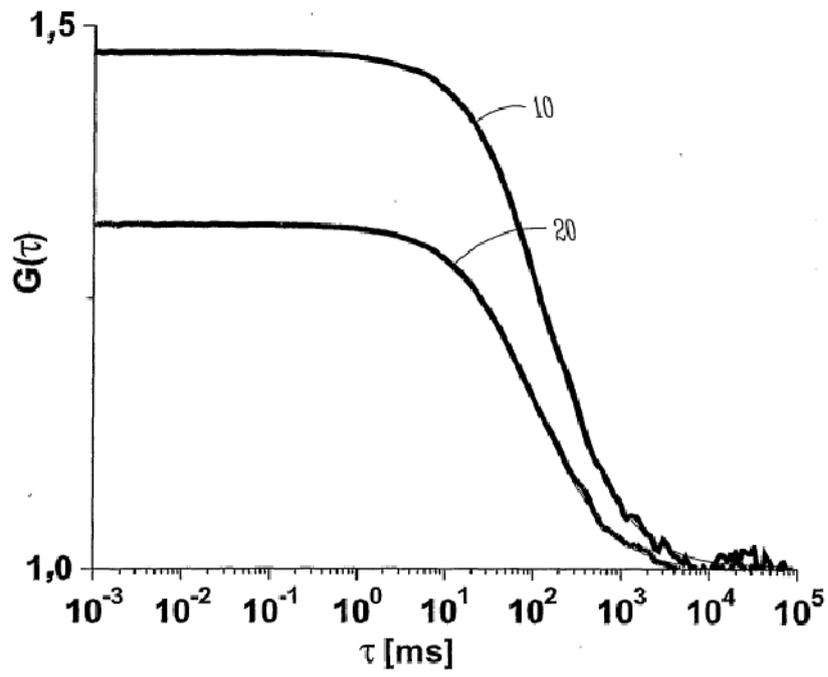
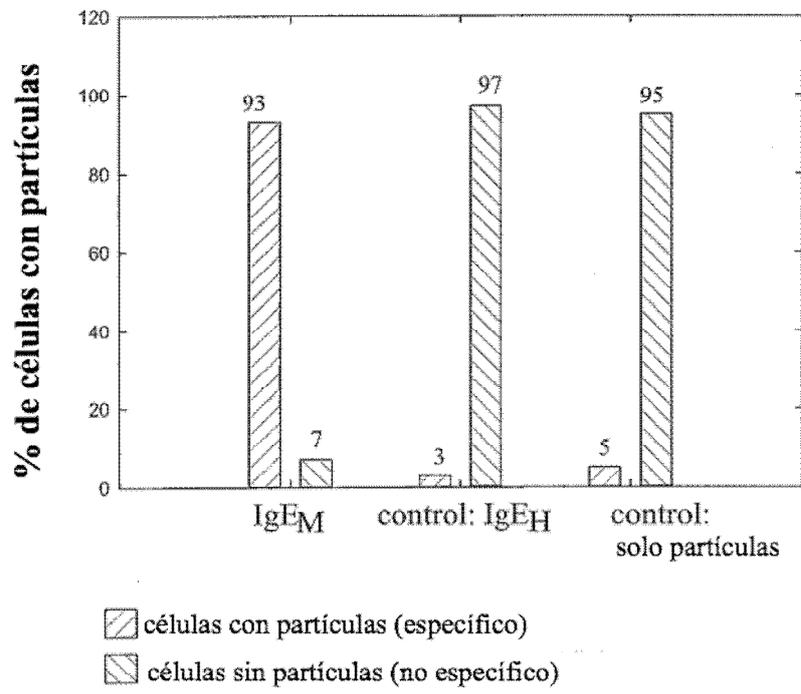


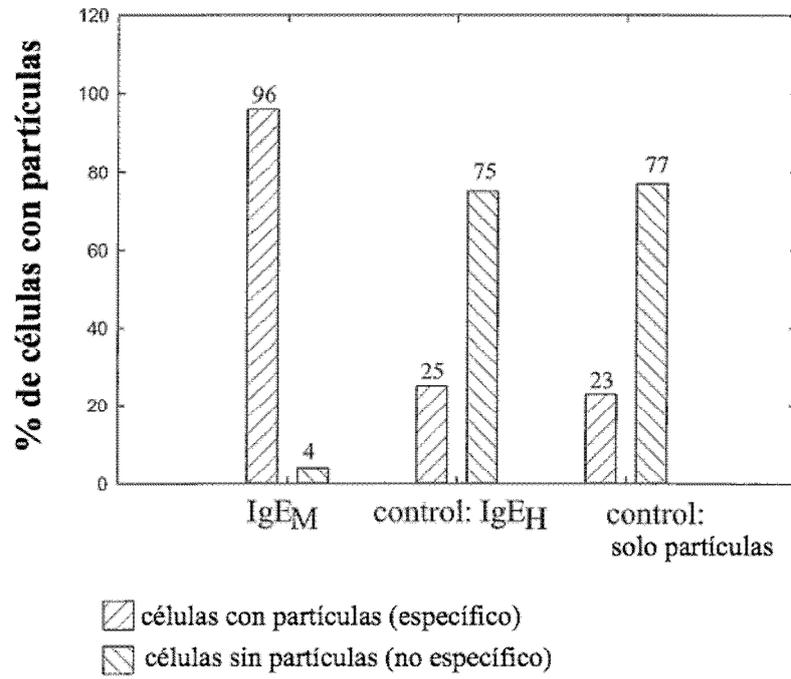
Fig.5



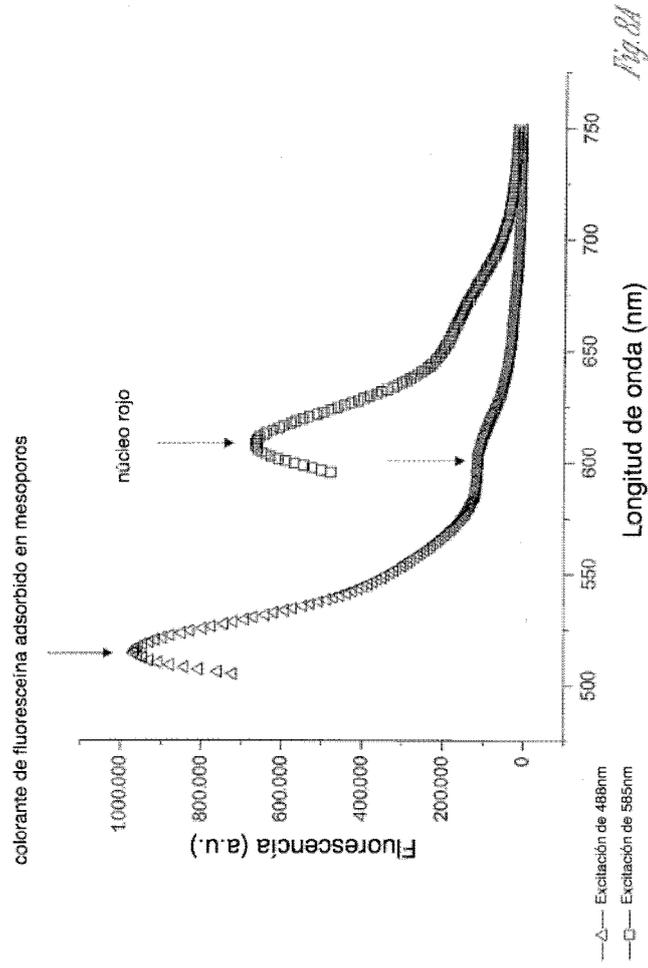
*Fig. 6*

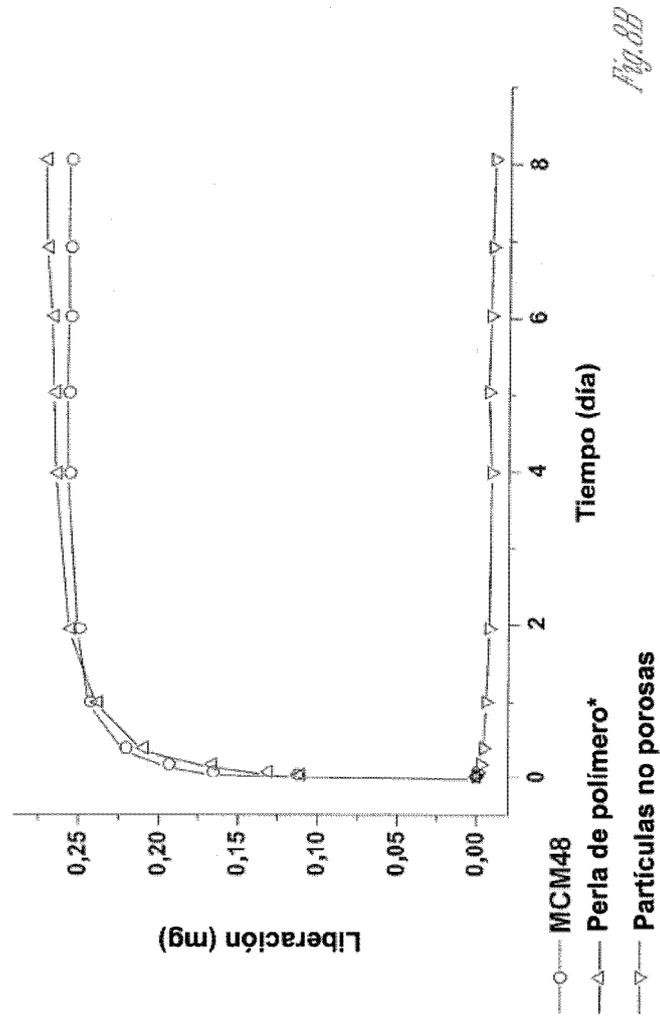


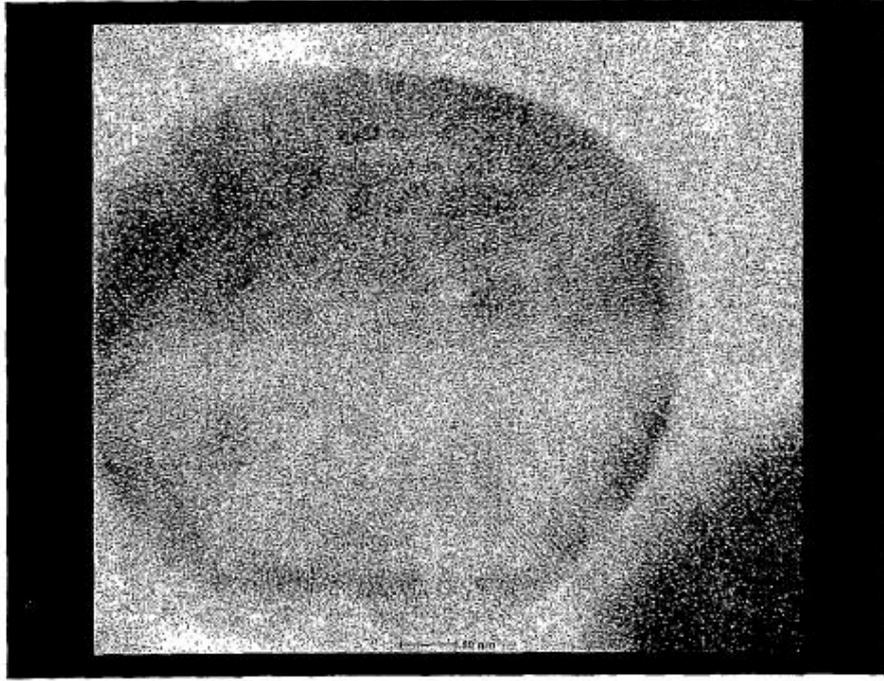
*Fig. 7A*



*Fig. 7B*







*Fig. 8C*