(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 796 053**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
C07K 17/14 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2014 PCT/US2014/072092**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **09.07.2015 WO15103028**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2014 E 14876059 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020 EP 3089997**

(54) Título: **Nanomateriales multicomponentes de Au y métodos de síntesis**

(30) Prioridad:

30.12.2013 US 201361964285 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.11.2020

(73) Titular/es:

THE CURATORS OF THE UNIVERSITY OF MISSOURI (100.0%)
316 University Hall
Columbia, MO 65211, US

(72) Inventor/es:

KANNAN, RAGHURAMAN;
ZAMBRE, AJIT y
UPENDRAN, ANANDHI

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 796 053 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

Nanomateriales multicomponentes de Au y métodos de síntesis

Campo técnico

Un campo de la invención son nanomateriales compuestos, concretamente una nanoconstrucción de AuNP(DTDTPA)(biomolécula) según se reivindica y un método de síntesis de los mismos según se reivindica. Ejemplos de aplicaciones de la invención incluyen aplicaciones biomédicas, tales como tratamiento de enfermedades y detección de enfermedades.

Estado de la Técnica

Tsoukalas et al., COST TD1004 Action, "Theranostics Imaging and Therapy: An Action to Develop Novelized Nanosized Systems for Imaging-Guided Drug Delivery", Reunión anual del 1 de septiembre al 3 de septiembre de 2013, página 35 describe Au@DTDTPA funcionalizado con c-RGD y marcado con ^{68}Ga.

Cutler et al., World Journal of Nuclear Medicine, Vol 12, Sup. 1, febrero de 2013, págs. 37-38 describe la distribución de nanopartículas de Au-DTDTPA en pacientes.

El documento US 2006/0222595 A1 describe composiciones que comprenden nanopartículas, p. ej., nanopartículas de oro, y enlazados a su superficie, agentes terapéuticos y/o de diagnóstico, p. ej., un anticuerpo.

Debouttiere et al., Advanced Functional Materials, vol. 16, 2330-2339 (2006) describe la síntesis de nanopartículas de oro funcionalizadas por quelatos de DTDTPA:Gd para su uso como agente de contraste en MRI.

Valk et al., Positron Emission Tomography: Basic Science and Clinical Practice (Springer 2003), pág. 255 describe el marcaje de un anticuerpo anti-miosina con Ga usando el quelante DTPA, y el uso del compuesto para la formación de imágenes por PET.

Yazdanpanah et al., Appl. Phys Lett, 85 (9), 1592-1594 (2004)) describe la síntesis de nanocables de aleación de Au-Ga.

Maecke et al., J Nucl Med, 46 (1), 172S-178S (2005) describe radiofármacos con PET que contienen ^{68}Ga y péptidos acoplados con quelantes.

Zambre et al., Chem Comm 50: 3281-3284 (2014) describe la síntesis y caracterización de nanopartículas de oro multicomponentes, en las que AuNP-DTDTPA está complejado con Ga y conjugado con peroxidasa de rábano picante.

Chanda N et al., Proc Natl Acad Sci USA, 107(19):8760-5 (2010) divulga nanopartículas de oro (AuNP) funcionalizadas con bombesina (BBN). Se investigaron las interacciones celulares y las afinidades de unión de conjugados de AuNP-BBN hacia los receptores GRP en las células de cáncer de próstata humanas.

Antecedentes

Los nanomateriales multicomponentes combinan propiedades físicas y biológicas de múltiples materiales dentro de un solo nanoconstrucción. Los nanomateriales multicomponentes brindan oportunidades únicas para combinar propiedades que se ofrecen por separado en una sola nanoconstrucción. Estas oportunidades pueden ampliar las aplicaciones de un nanomaterial, tal como proporcionar una detección y un tratamiento simultáneos de diversas enfermedades humanas. La combinación de múltiples componentes dentro de un solo nanomaterial plantea importantes desafíos de síntesis. Muchos esfuerzos para combinar diferentes materiales en un solo nanomaterial resultan en la pérdida de una o más propiedades deseadas de los materiales individuales.

AuNP-DTDTPA ha sido conjugado con Gd, In o ^{99m}Tc, y estos elementos tienen excelentes capacidades de formación de imágenes moleculares. R. Zirbs, F. Kienberger, P. Hinterdorfer y W. H. Binder, Langmuir, "Directed assembly of Au nanoparticles onto planar surfaces via multiple hydrogen bonds" 21, 8414-8421 (2005). Esta técnica implicaba interacciones moleculares específicas y dirigidas para unir las partículas a una superficie monocapa. La superficie se preparó con receptores y las nanopartículas de Au se cubrieron con los receptores de ácido barbitúrico complementarios unidos con alta selectividad sobre esta superficie mediante un proceso de auto-ensamblaje mediado por múltiples enlaces hidrógeno. El mecanismo de unión es altamente específico. El DTPA ditiolado (DTDTPA) proporciona ligandos tanto de donantes de N blandos como de donantes de O duros. A diferencia de otros ligandos de N, O, DTPA forma complejos metálicos cinéticamente inertes y termodinámicamente estables en condiciones normales de laboratorio. Los quelatos metálicos a base de DTPA han demostrado excelente estabilidad *in vivo*. F. N. Weizer VG, "The interaction of gold with gallium arsenide" Journal of Applied Physics, 1988, 64, 4618-4623. Véase, C. Alric, J. Taleb, G. Le Duc, C. Mandon, C. Billotey, A. Le Meur-Herland, T. Brochard, F. Vocanson, M. Janier, P. Perriat, S. Roux y O. Tillement, J Am Chem Soc, "Gadolinium chelate coated gold nanoparticles as contrast agents for both X-ray computed tomography and magnetic resonance imaging", 2008, 130, 5908-5915.

Sumario

La presente invención está dirigida, *entre otros,* a una nanoconstrucción de AuNP(DTDTPA)(biomolécula) que comprende una nanopartícula (NP) de Au, DTDTPA, y una biomolécula, en donde la DTDTPA es ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) que está ditiolado (DT), y en donde la DTDTPA está enlazada a la superficie de la nanopartícula de Au uniendo un grupo tiol de la DTDTPA a la superficie de la nanopartícula de Au, caracterizada porque la biomolécula es un péptido terminado en ácido tióctico enlazado a la superficie de la nanopartícula de Au a través de un enlace Au-S. El método de síntesis según se reivindica en la presente invención se lleva a cabo a temperatura ambiente.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra la absorbancia de HRP conjugada como un modelo de biomolécula con diluciones en serie de 10 veces de AuNP(DTDTPA)(Ga);

la Fig. 2 ilustra la síntesis de AuNP-(DTDTPA)(Ga) y AuNP-(DTDTPA)(Ga)(B), en donde B es una biomolécula. En la Fig. 2A se obtiene primero AuNP-(DTDTPA)(Ga) y luego se conjuga una biomolécula al complejo para producir AuNP-(DTDTPA)(Ga)(B). En la Fig. 2B, AuNP-(DTDTPA) se conjuga primero con una biomolécula para producir AuNP-(DTDTPA)(B) y luego el galio reacciona con el complejo para producir AuNP-(DTDTPA)(Ga)(B);

la Fig. 3 muestra datos concernientes a la titulación de $Ga(NO_3)_3$ con el conjugado de AuNP(DTDTPA) y la cantidad de Ga^{3+} detectada por ICP-OES y ^{71}Ga-RMN en términos de relación Au/Ga y Ga^{3+} en mg, respectivamente;

la Fig. 4 muestra espectros de RMN de ^{71}Ga de las soluciones estándares de $Ga(NO_3)_3$ con concentraciones de 0,1 M, 0,01 M, 0,001 M y 0,0001 M en D_2O;

la Fig. 5 muestra espectros de RMN de ^{71}Ga de los sobrenadantes de la reacción de 1 con diferentes cantidades de $Ga(NO_3)_3$;

la Fig. 6A y la FIG. 6B ilustran respectivamente datos de estudios de estabilidad *in vitro* del conjugado de AuNP(DTDTPA) y AuNP-(DTDTPA)(Ga) en diversos medios biológicos; y

la Fig. 7 ilustra un proceso preferido a temperatura ambiente para la conjugación de AuNP-(DTDTPA)(Ga) y AuNP-(DTDTPA)(Ga)HRP;

la Fig. 8 es una imagen TEM de (a) AuNP(DTDTPA)(Péptido) y de (b) AuNP(DTDTPA)(Ga)(Péptido);

la Fig. 9 es estudios de estabilidad in vitro de AuNP(DTDTPA)(Péptido) y de (b) AuNP(DTDTPA)(Ga)(Péptido) mediante espectroscopía de absorción UV-Visible (A, B); por análisis de tamaño DLS (C, D); por potencial zeta (E, F) en diversas soluciones biológicas;

la Fig. 10 es (A) el espectro de estudio XPS de AuNP(DTDTPA)(Péptido 1); (B) el espectro de alta resolución XPS de AuNP(DTDTPA)(Péptido 1), Región C 1s;

la Fig. 11 es (A) espectro de alta resolución XPS de AuNP(DTDTPA)(Péptido 1), Región S 2p; (B) espectro de alta resolución XPS de AuNP(DTDTPA)(Péptido 1), Región Au 4f; y

la Fig. 12 es un ensayo de citotoxicidad MTT dependiente de la dosis de AuNP(DTDTPA)(Péptido 1) (1:2) en células de cáncer de próstata PC-3.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La presente invención está dirigida a la nanoconstrucción de AuNP(DTDTPA)(biomolécula) tal como se reivindica en las reivindicaciones 1 y 7, y al método de síntesis de una nanoconstrucción de AuNP(DTDTPA)(biomolécula) tal como se reivindica en la reivindicación 6. Una realización de la divulgación es un nanomaterial multicomponente AuNP(DTDTPA)(Ga) o AuNP(DTDTPA)(Biomolácula), en donde DTDTPA es un ligando de amino-carboxilato (ácido dietilentriaminopentaacético, DTPA) enlazado a la superficie de la nanopartícula (NP) de Au a través de enlace ditiol (DT). Otra realización de la divulgación es un nanomaterial multicomponente AuNP(DTDTPA)(Ga) con una biomolécula (B) adjunta, AuNP(DTDTPA)(Ga)(B). Las biomoléculas en la presente invención son péptidos terminados en ácido tióctico, mientras que las biomoléculas de la divulgación son cualquier biomolécula que comprende un grupo amina disponible para la conjugación, que incluye, pero no se limita a, péptidos, anticuerpos, anticuerpos ScFv, la porción Fab de un anticuerpo, aficuerpos, enzimas y otras proteínas y moléculas que comprenden un grupo amina. Todos los isótopos de galio son adecuados en estas aplicaciones de la divulgación. En realizaciones preferidas de la divulgación, se pueden usar los siguientes isótopos de galio: Ga-67 o Ga-68.

Se forman fuertes fijaciones. En realizaciones preferidas de la divulgación, la biomolécula se fija para formar un kit. El kit puede enviarse a un centro de salud, y esa fijación permanece estable. En el centro de salud, con la mezcladura a temperatura ambiente de métodos de formación preferidos de la divulgación, se pueden fijar Ga-67 o G-68. La solución se puede administrar a un paciente y se puede realizar una formación de imágenes.

Algunas realizaciones de la divulgación incluyen nanoconstrucciones de AuNP(DTDTPA)(Ga).

Realizaciones adicionales de la divulgación incluyen la nanoconstrucción de AuNP(DTDTPA)(Ga)(B); en donde B es uno de los siguientes: un péptido, anticuerpo, aficuerpo o una proteína.

Las relaciones de Au:Ga de la divulgación pueden ser 1:5; 1:2,5 o 1:1,125, y una realización particular preferida de la divulgación tiene la relación Au:Ga de aproximadamente 1:5. Soluciones preferidas de la divulgación incluyen soluciones de AuNP(DTDTPA)(Ga) y soluciones de AuNP(DTDTPA)(Ga)(B) que tienen una concentración en el intervalo de 30 µg/ml a 5 mg/ml con un pH en el intervalo de 6 a 13. En realizaciones preferidas, los núcleos de Au en el nanomaterial multicomponente tienen un tamaño de ~ 3-5 nm. Algunas nanoconstrucciones tienen un tamaño hidrodinámico de 88 nm y un potencial zeta de -55 mV.

Un método de síntesis preferido de la divulgación implica mezclar $Ga(NO_3)_3$ (58 mM) con AuNP(DTDTPA) disuelto en NaOH a temperatura ambiente con agitación continua. Un AuNP(DTDTPA)(Ga) preferido con un método de síntesis de biomoléculas de la divulgación suspende el AuNP(DTDTPA)(Ga) formado en una solución tampón. Se agrega y agita hidrocloruro de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC). Posteriormente, se agrega una biomolécula en solución y se agita continuamente y se incuba a temperatura ambiente durante un período de tiempo.

Realizaciones preferidas de la invención y la divulgación se discutirán ahora con respecto a experimentos.

En experimentos para demostrar la divulgación, los métodos proporcionaron síntesis de [AuNP(DTDTPA)(Ga)], caracterización de AuNP(DTDTPA)(Ga) utilizando técnicas avanzadas de microscopía electrónica de transmisión por barrido (STEM); estudios detallados de estabilidad y citotoxicidad *in vitro* de AuNP(DTDTPA)(Ga); y síntesis y caracterización de [AuNP(DTDTPA)(Ga)(HRP)], como modelo para la fijación de biomoléculas. La HRP (peroxidasa de rábano picante) tiene seis residuos de amina primaria (lisina), que están disponibles para una conjugación efectiva. (K-G. Welinder, Covalent structure of the glycoprotein horseradish peroxidase (EC 1.11.1.7). 1976, FEBS Lett. 72, 19-23). En general, la conjugación de biomoléculas se puede lograr si las biomoléculas contienen grupos amino libres. Los anticuerpos, los aficuerpos y las proteínas tienen grupos amino libres que se fijan a la nanopartícula de una manera similar. Los péptidos que no contienen grupos amino, por otro lado, se pueden unir a AuNP-DTDTPA usando grupos tiol incorporados dentro de los péptidos. Los grupos tiol se unen con nanopartículas de oro en la superficie.

Los experimentos demostraron que la estructura de carboxilato en capas juega un papel importante para la fijación. Los experimentos confirmaron que la arquitectura de carboxilato multicapa es bastante estable en un amplio intervalo de pH (6 a 13) y a diferentes concentraciones (30 µg/ml a 5 mg/ml).

[AuNP(DTDTPA)(Ga)] de la divulgación se sintetizó tratando el conjugado de AuNP(DTDTPA) con $Ga(NO_3)_3$ a pH 8,0. La relación optimizada determinada Au:Ga es 1:5. El complejo AuNP(DTDTPA)(Ga) exhibe un tamaño del núcleo de ~ 3-5 nm, un tamaño hidrodinámico de 88 nm y un potencial zeta de -55 mV. Titulaciones en serie determinaron la concentración máxima de galio que se puede incorporar dentro de la nanoconstrucción (conjugado de AuNP(DTDTPA). Específicamente, se realizaron titulaciones en serie del conjugado de AuNP(DTDTPA) con Ga^{3+} y el conjugado resultante se evaluó utilizando tanto la espectroscopía de RMN Ga-71 como el análisis ICP-OES. El ^{71}Ga activo por RMN se utiliza como una sonda para determinar la concentración de Ga quelado. RMN de diferentes concentraciones de $Ga(NO_3)_3$ se registraron en D_2O. Se trazó una curva estándar utilizando concentraciones de Ga no quelado frente a valores de integración pico. Utilizando la gráfica, se determinó que 11 mM de Au pueden quelar irreversiblemente hasta 58 mM de Ga. Estos resultados indican que cualquier galio agregado más allá de esta concentración no se quelaría con AuNP-DTDTPA.

Los resultados de RMN se validaron mediante la realización de experimentos adicionales utilizando ICP-OES. En este experimento, las relaciones Au/Ga de los conjugados resultantes se monitorizaron después del tratamiento de 11 mM de conjugado de AuNP(DTDTPA) (Au) con diferentes cantidades de Ga^{3+}. La relación Au/Ga se convierte en una constante después de la adición de 58 mM de Ga^{3+}. Estos experimentos establecen la concentración exacta de Ga que puede ser quelada irreversiblemente al conjugado de AuNP(DTDTPA). El tamaño de núcleo más pequeño de AuNP(DTDTPA)(Ga) de la divulgación hizo que la caracterización fuera bastante desafiante.

Se utilizaron múltiples herramientas analíticas (UV-Vis, TEM, DLS, XPS, EDX, HAADF y EELS) para obtener detalles estructurales de AuNP(DTDTPA)(Ga) de la divulgación. Técnicas convencionales, tales como UV-Vis y TEM confirmaron que la cristalinidad del conjugado de AuNP(DTDTPA) con núcleo de oro se conserva después de la quelación con Ga. Como el tamaño del núcleo de oro es inferior a 5 nm, la resonancia del plasmón de superficie mostró una pequeña joroba a 520 nm antes y después de la complejación.

Ga^{3+} puede efectivamente formar complejos con aniones carboxilato y aminas más cercanas a la superficie del oro. La estructura AuNP-DTDTPA-Ga de la divulgación se analizó adicionalmente usando mediciones XPS. De particular interés es la unión de galio al ligando de la superficie, DTDTPA. DTDTPA unido a la superficie es rico en disulfuros, aminas secundarias y carboxilatos. Aunque la aleación metálica de Ga con Au se conoce a 400°C, es inesperada en el escenario actual, y la divulgación proporciona un resultado sorprendente con la formación a temperatura ambiente. La formación a temperatura ambiente es ventajosa para mantener propiedades deseables. La capacidad

de fijar una biomolécula a temperatura ambiente, tal como se reivindica, *entre otros,* en la reivindicación 6, es ventajoso para evitar daños a la biomolécula.

Es posible que Ga^{3+} pueda unirse con tiol; sin embargo, los tioles están presentes predominantemente como disulfuros en la nanoconstrucción original. Una unión de este tipo requeriría la adición oxidativa de Ga^{3+} a través de enlaces disulfuro, lo que no es factible en base a la química del galio. Sin embargo, los átomos de N y O presentes en el ligando están posicionados geométricamente para quelar con Ga. En el conjugado de AuNP(DTDTPA)(Ga) de la divulgación, los niveles de N(1S) mostraron un pico a 398,8 eV.

Una vez establecida la síntesis y caracterización del conjugado de [AuNP(DTDTPA)Ga] (2) de la divulgación, los autores de la invención centraron su atención para explorar una utilización adicional de ligandos de carboxilato en AuNP(DTDTPA)(Ga) de la divulgación para conjugar con biomoléculas. Para demostrar el concepto de que era factible una conjugación de este tipo, los autores de la invención usaron HRP (peroxidasa de rábano picante) como una biomolécula. Los autores de la invención conjugaron HRP con AuNP(DTDTPA)(Ga) de la divulgación para demostrar que esta biomolécula se conjugó con éxito con AuNP(DTDTPA)(Ga) de la divulgación. La presencia de HRP se detectó mediante la técnica ELISA convencional. Los autores de la invención utilizaron dos conjugados diferentes de AuNP(DTDTPA)(Ga) de la divulgación, con cantidades variables de Ga presentes en cada una de las dos muestras de nanoconjugado; a saber, las muestras de conjugado obtenidas después del tratamiento del conjugado de AuNP(DTDTPA) con 29 mM de Ga, y otras muestras con una cantidad saturante de 58 mM. Se usó deliberadamente una baja concentración de galio (menos de la requerida para la quelación completa) para aumentar el número de carboxilatos libres, mientras que se usó una cantidad muy alta (más de la requerida para la quelación completa) para utilizar todos los carboxilatos posibles presentes en la nanoconstrucción. La absorbancia de la HRP conjugada se trazó frente a la concentración de la nanoconstrucción (AuNP(DTDTPA)(Ga)) de la divulgación para relacionar las capacidades de unión.

La Fig. 1 muestra la absorbancia de HRP conjugada con diluciones en serie de 10 veces de AuNP(DTDTPA)(Ga) de la divulgación. La absorbancia aumenta al aumentar la concentración de AuNP(DTDTPA)(Ga) a medida que aumenta la capacidad de retención de HRP de AuNP(DTDTPA)(Ga). Por otro lado, quelatos con concentraciones variables de Ga (29 mM y 58 mM) no mostraron diferencia alguna en la conjugación con HRP (*recuadro*). Estos datos demuestran que la conjugación de HRP con AuNP(DTDTPA)(Ga) de la divulgación es independiente de la cantidad de Ga quelado.

Los datos pueden interpretarse para demostrar que HRP está conjugada con carboxilatos estéricamente menos concurridos que están disponibles después de la quelación de galio en la nanopartícula. Si bien no es necesario practicar la invención y sin limitarse a la teoría, una teoría respaldada por los datos es que los carboxilatos ubicados en el ligando DTDTPA fijado a la superficie exhiben dos tipos orientativos de carboxilatos; a saber, aquellos que forman una estructura de carboxilato compacta que participa en la quelación con Ga, y un segundo tipo de carboxilato orientativo que no son conformacionalmente favorables para formar un quelato de metal termodinámicamente estable. El segundo tipo de carboxilatos está disponible para la conjugación de biomoléculas. La posibilidad de interacción de los átomos de galio con los carboxilatos conformacionalmente desfavorables es mínima. Debido a esta preferencia de unión de galio y HRP, la eficiencia de conjugación de HRP sigue siendo la misma para AuNP quelado con galio bajo (29 mM) y alto (58 mM).

La citotoxicidad del conjugado de AuNP(DTDTPA) de la divulgación y AuNP(DTDTPA)(Ga) de la divulgación se estudió en células de cáncer de próstata humano (PC-3) bajo condiciones *in vitro* usando un ensayo de viabilidad celular colorimétrica (MTT). Los resultados demuestran que las nanoconstrucciones conjugados de AuNP(DTDTPA) de la divulgación y de AuNP(DTDTPA)(Ga) de la divulgación no muestran citotoxicidad hasta concentraciones de hasta 40 µg/ml. Sin embargo, la viabilidad celular fue ligeramente menor para AuNP(DTDTPA)(Ga) de la divulgación que el conjugado de AuNP(DTDTPA) de la divulgación durante el período de 24 h después del tratamiento. Las AuNP son en sí mismas no tóxicas. Además, los experimentos demostraron que la nanoconstrucción conjugado de AuNP(DTDTPA) de la divulgación, que contiene el recubrimiento de ligando DTDTPA en la superficie de AuNP, tampoco es tóxico. Por lo tanto, la toxicidad mínima exhibida por AuNP(DTDTPA)(Ga) de la divulgación puede atribuirse al galio conjugado. La ausencia de una toxicidad perceptible del conjugado de AuNP(DTDTPA) de la divulgación y de AuNP(DTDTPA)(Ga) de la divulgación hacen que estos nanomateriales sean adecuados para la obtención de imágenes biomédicas.

Materiales Experimentales

Los materiales utilizados para la síntesis de nanopartículas de oro (AuNP) se adquirieron comercialmente. Trihidrato de ácido tetracloroaúrico ($HAuCl_4$ $3H_2O$), borohidruro de sodio ($NaBH_4$), ácido dietilentriaminopentacético (DTPA), anhídrido acético, piridina anhidra, hidrocloruro de 2-aminoetanotiol, trietilamina, ácido acético glacial (CH_3COOH), nitrato de galio ($Ga(NO_3)_3$), hidróxido de sodio (NaOH), ácido clorhídrico (HCl), metanol (MeOH), éter dietílico (Et_2O), cloruro de sodio (NaCl), dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), histidina, albúmina sérica humana (HSA), albúmina sérica bovina (BSA) y cisteína se adquirieron de Aldrich Chemical, EE.UU. y se usaron tal como se recibieron. Para la preparación de soluciones acuosas y para enjuagar nanopartículas de oro, se usó agua Milli-Q (DI) (ρ > 18 MΩ). La síntesis del conjugado de AuNP(DTDTPA) se realizó mediante un protocolo previamente informado. Véase, C. Alric, J. Taleb, G. Le Duc, C. Mandon, C. Billotey, A. Le Meur-Herland, T. Brochard, F.

Vocanson, M. Janier, P. Perriat, S. Roux y O. Tillement, J Am Chem Soc, "Gadolinium chelate coated gold nanoparticles as contrast agents for both X-ray computed tomography and magnetic resonance imaging", 2008, 130, 5908-5915. El kit de ensayo de proliferación celular MTT se obtuvo de Promega Corporation, EE.UU.

Síntesis de AuNP-(DTDTPA)(Ga) (no reivindicada en la presente invención)

Solución acuosa de $Ga(NO_3)_3$ (58 mM) se mezcló con conjugado de AuNP(DTDTPA) (11,36 mM de [Au]) disueltos en NaOH 0,01 M a temperatura ambiente con agitación continua. Se observó la formación inmediata de precipitado. La mezcla de reacción se dejó agitar durante 3 horas y posteriormente se lavó con agua DI (tres veces) y se centrifugó a 20000 rcf durante 20 minutos a 25°C. rcf es la fuerza centrífuga relativa, y corresponde a la fuerza asociada con 1 g, donde g es la aceleración de la gravedad en la superficie de la Tierra. La Fig. 2 ilustra la síntesis de AuNP-(DTDTPA)(Ga), AuNP-PEG+Ga, TA-AuNP+Ga, confirmando los respectivos espectros de HR-TEM y EDX la presencia y ausencia de cationes Ga. Como se muestra en la Fig. 2A, primero se puede obtener AuNP-(DTDTPA)(Ga) y luego se conjuga una biomolécula con el complejo para producir AuNP-(DTDTPA)(Ga) (B). Alternativamente, y como se muestra en la Fig. 2B, AuNP-(DTDTPA) se puede conjugar primero con una biomolécula para producir AuNP-(DTDTPA)(B) y luego el galio reacciona con el complejo para producir AuNP-(DTDTPA)(Ga)(B).

Análisis de AuNP-(DTDTPA)(Ga) (no reivindicado en la presente invención)

A una solución de conjugado de AuNP(DTDTPA) (11,36 mM de [Au]) disueltos en NaOH 0,01 M se añadió una solución de cantidades crecientes de $Ga(NO_3)_3$ (3,9, 9,7, 19,5, 39, 58, 78, 117, 156 mM) en agua DI. El producto quelado se aisló. Se utilizaron 1 mg/ml del sedimento seco (disuelto en NaOH 0,01 M) y los sobrenadantes respectivos para el análisis de ICP. Todas las mediciones se realizaron por triplicado. Para evaluar la concentración de Ga que se quela irreversiblemente al conjugado de AuNP(DTDTPA), los autores de la invención determinaron las concentraciones de [Ga] y [Au] en AuNP-(DTDTPA)(Ga). Basado en el análisis ICP-OES, fue evidente que la relación Au/Ga permanece constante más allá de la concentración de 58 mM de [Ga].

Espectroscopía de RMN de ^{71}Ga

La Fig. 3 muestra la titulación de $Ga(NO_3)_3$ con el conjugado de AuNP(DTDTPA) y la cantidad de Ga^{3+} detectada por ICP-OES y RMN de ^{71}Ga en términos de relación Au/Ga y Ga^{3+} en mg, respectivamente. Para la titulación usando espectroscopía de RMN de ^{71}Ga, cuatro soluciones estándares diferentes de $Ga(NO_3)_3$ con las concentraciones respectivas, 0,1 M, 0,01 M, 0,001 M y 0,0001 M, se prepararon en D_2O. Se registró la RMN de 71Ga para cada una de estas soluciones estándares y se anotaron los valores máximos de integración. Es bien sabido que la RMN de ^{71}Ga depende en gran medida de la simetría del complejo. Si el complejo que contiene galio carece de simetría, la señal de RMN desaparece. Diversas concentraciones de $Ga(NO_3)_3$ (29,3 mM; 58,6 mM o 117 mM) se añadieron a soluciones acuosas de conjugado de AuNP(DTDTPA) (5 mg/mL). Después de agitar durante 3 horas, las mezclas de reacción se centrifugaron (20.000 rcf, 20 min, 25°C) y los sobrenadantes se decantaron y se concentraron a un volumen de 1 mL. Se analizaron las soluciones sobrenadantes y se utilizaron los valores picos de integración para calcular la cantidad de galio presente. La integración pico y las concentraciones de [Ga] se estandarizaron mediante un experimento separado (véase la FIG. 3). La pendiente de la línea recta en el gráfico se ajustaba mejor a los datos y correspondía a la cantidad de galio que se puede coordinar con el conjugado de AuNP(DTDTPA) (5 mg). Mediante este experimento de RMN, queda claro que 11,36 mM de [Au] en el conjugado de AuNP(DTDTPA) requiere al menos 58 mM de [Ga]. La FIG. 4 muestra espectros de RMN de ^{71}Ga de las soluciones estándares de $Ga(NO_3)_3$ con concentraciones de 0,1 M, 0,01 M, 0,001 M y 0,0001 M en D_2O. A través de la integración de los picos de RMN de ^{71}Ga se obtuvo una curva estándar de la integración logarítmica para las diferentes soluciones conocidas de $Ga(NO_3)_3$ como se muestra en el *recuadro.* Cabe señalar que las integraciones se realizaron considerando que el valor de integración de 100 se asocia con la solución concentrada más alta de $Ga(NO_3)_3$ (0,1 M). La FIG. 5 muestra espectros de RMN de ^{71}Ga de los sobrenadantes de reacción de 1 con diferentes cantidades de $Ga(NO_3)_3$. El recuadro muestra la cantidad de galio coordinada a 11,36 mM de [Au] en AuNP-DTDTPA a diversas concentraciones de $Ga(NO_3)_3$.

Síntesis de Conjugados de AuNP-(DTDTPA)(Ga) (no reivindicado en la presente invención)

Se sintetizaron dos conjugados diferentes de AuNP-(DTDTPA)(Ga) que difieren en las concentraciones de iones galio. Las nanopartículas de oro quelado con galio, AuNP-(DTDTPA)(Ga) ([Au] = 11,36 mM y [Ga] = 29,32 mM y 58,0 mM), se suspendieron en 1X PBS. A 500 µl de AuNP-(DTDTPA)(Ga) se añadieron 28 µg de hidrocloruro de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) en tampón ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) 0,1 M (pH 4,6). La reacción se agitó durante 10 min a temperatura ambiente. Después de 10 minutos, se añadió solución de HRP (0,454 M) a la mezcla de reacción en 200 µl de tampón MES 0,1 M (pH 4,6) y se incubó durante 4 horas a temperatura ambiente con agitación continua. La mezcla de reacción se centrifugó a 13500 rcf durante 10 minutos a 25°C y el sedimento se lavó posteriormente dos veces con 1X PBS y se suspendió en solución de 1X PBS. Tanto los sedimentos como los sobrenadantes se usaron para el ensayo de actividad de peroxidasa. El aumento en serie de la absorción de nanopartículas (conjugado de AuNP-(DTDTPA)(Ga))-HRP se controló y se correlacionó con la unión de la proteína HRP a AuNP-(DTDTPA)(Ga). Los carboxilatos de la capa externa en AuNP-(DTDTPA)(Ga) se activaron usando EDC en un tampón de activación y se conjugaron con HRP. El conjugado se caracterizó por ensayo de

peroxidasa usando ELISA y también midiendo el potencial zeta, tamaño, TEM y TEM con EDX. El espectro EDX de un grupo de nanopartículas mostró la presencia de oro y galio en nanoconstrucciones conjugadas con HRP en una rejilla de cobre/carbono.

Ensayo de Actividad de Peroxidasa Usando ELISA

En una placa de 96 pocillos, se añadieron 100 µl de 3 en la primera fila y se realizaron diluciones en serie de 10 veces de las muestras a lo largo de cada una de las columnas usando 1X PBS. A todos los pocillos se añadieron 50 µL de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) y se añadió un componente de sustrato. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y, además, se detuvo la actividad de la enzima mediante la adición de 50 µL de HCl 1 M. La absorbancia de los pocillos individuales se registró en un lector de microplacas a 450 nm inmediatamente. Los estudios ELISA fueron mediciones representativas de triplicados, y las lecturas se representaron como un gráfico de masa (en unidades de ng) de partículas frente a la absorbancia. La HRP se usó tradicionalmente como un agente de marcaje para el C terminal de diversas proteínas, y la presencia de HRP se analizó mediante ensayos de enzimas acopladas.

Estabilidad In Vitro

Los estudios de la estabilidad *in vitro* se realizaron incubando soluciones de conjugado de AuNP(DTDTPA) y de AuNP-(DTDTPA)(Ga) en diversas condiciones de pH: 2, 5, 7, 10 y 12 durante un período de 24 horas. El comportamiento de estabilidad para ambas soluciones también se monitorizó mediante soluciones acuosas enfrentadas a conjugado de AuNP(DTDTPA) y de AuNP-(DTDTPA)(Ga) (0,5 mL) con 0,5 mL de cada uno de cisteína 0,2 M, histidina 0,2 M, HSA 0,2 M y soluciones salinas al 10%: La estabilidad se midió monitorizando la absorbancia visible al UV, el radio hidrodinámico y las mediciones del potencial zeta a las 0 horas a las 96 horas (es decir, a las 0, 1, 24, 48, 72 y 96 horas). Un cambio despreciable en la banda de plasmón UV-Vis del conjugado de AuNP(DTDTPA) y AuNP-(DTDTPA)(Ga) confirmó la retención de la composición de nanopartículas con un comportamiento estable en todas las soluciones a las que se enfrentó, excepto cisteína. Las soluciones tratadas no mostraron cambio perceptible alguno en los radios hidrodinámicos, lo que confirma la estabilidad de estos conjugados. La FIG. 6A y la FIG. 6B, respectivamente, ilustran datos de estudios de estabilidad *in vitro* del conjugado de AuNP(DTDTPA) y de AuNP-(DTDTPA)(Ga) bajo diversos medios biológicos de soluciones de NaCl al 10%, cisteína al 0,5%, histidina 0,2 M, HSA al 0,5% y BSA al 0,5%. Se registraron los espectros de absorción UV-visibles de estas soluciones después de 24 horas de tratamiento.

Caracterización del Conjugado de AuNP(DTDTPA) (no reivindicado en la presente invención)

El tamaño del núcleo del conjugado de AuNP(DTDTPA) que mostró el diámetro hidrodinámico de 88 nm tal como se observó por las mediciones DLS fue de 2-3 nm tal como se observa en las imágenes TEM. Este resultado valida la conservación de la estructura multicapa de DTDTPA en la superficie de AuNP. Cualquier perturbación en la red de unión a H daría como resultado la desestabilización del motivo estructural DTDTPA y estas perturbaciones surgirían de variaciones y diluciones de pH. Los cambios en el diámetro hidrodinámico y el potencial zeta debido al pH y las diluciones se han monitorizado mediante mediciones de DLS.

Efecto del pH

El experimento se realizó en el intervalo de pH de 2 a 13. Se observó una fuerte dependencia del tamaño con la variación del pH. Esta dependencia se muestra en la Tabla 1. A pH más bajo (pH 2) el tamaño era de 2417 nm. Este aumento del tamaño hidrodinámico se atribuye a la protonación de grupos -COOH a pH bajo que resulta en la agregación de nanopartículas. A pH 4 se observó una disminución en el tamaño hasta ~ 213 nm debido a una protonación disminuida. Sin embargo, dentro de un intervalo de pH de 6 - 13, los diámetros hidrodinámicos del conjugado de AuNP(DTDTPA) permanecieron constantes a 78 ± 4 nm, asegurando así que la estructura en capas esté intacta y sea estable en este intervalo de pH.

Tabla 1 - Análisis de tamaño y mediciones de potencial zeta de 1 en soluciones tampón de pH estándar

Conc. de 1 (mg/ml)	pH	Conc de Au	Tamaño por DLS (nm)	Potencial Zeta (mV)	Observaciones		
		(mM)	Media	Desv. Est.	Media	Desv. Est,	
0,50	2	1,16	2417	315	19	1,06	Suspensión
0,50	4	1,16	213	1,60	-32	1,41	Parcialmente Soluble
0,50	5	1,16	212	1.60	-40	0,28	Parcialmente Soluble
0,50	6	1,16	76	0,39	-33	2,90	Soluble (Solución transparente)

Conc. de 1 (mg/ml)	pH	Conc de Au	Tamaño por DLS (nm)	Potencial Zeta (mV)	Observaciones		
		(mM)	Media	Desv. Est.	Media	Desv. Est,	
0,50	9	1,16	82	1,00	-54	0,14	Soluble (Solución Transparente)
0,50	11	1,16	78	1,17	-53	0,98	Soluble (Solución transparente)
0,50	13	1,16	74	0,62	-48	2,60	Soluble (Solución transparente)

Efecto de la Dilución

Los autores de la invención también estudiaron el efecto de la dilución en la estructura en capas del conjugado de AuNP(DTDTPA) usando DLS. Los datos se muestran en la Tabla 2. Con una concentración incrementada de conjugado de AuNP(DTDTPA), de 0,3 mg/mL (Au = 0,05 mM) a 5 mg/mL (Au = 11,36 mM) en agua DI a pH 8 – 8,5, no se observó un cambio en el tamaño hidrodinámico (tamaño de partícula promedio = 88 ± 4 nm) o potencial zeta (potencial zeta promedio = -72 mV).

Tabla 2. Análisis de tamaño y mediciones de potencial Zeta de 1 a diversas diluciones

Conc. de 1 (mg/ml)	Dilución	Conc. de Au (mM)	pH	Tamaño por DLS (nm)		Potencial Zeta (mV)		Tamaño por NTA (nm)
				Media	Desv. Est.	Media	Desv. Est.	
0,03	5 ul de material	0,050	7,80	92	2.14	-70	0,78	DN
0,05	10 ul de material	0,101	8,18	88	0,16	-80	0,49	DN
0,13	25 ul de material	0,303	7,92	90	1,05	-77	0,21	77
0,25	50 ul de material	0,555	7,91	90	0,85	-79	4,73	98
0,50	100 ul de material	1,16	8,53	88	0,65	-71	0,21	63
1,00	200 ul de material	2,27	8,73	84	0,3	-68	0,49	102
1,00	200 ul de material - registrado después de 24h	2,27	8,73	84	0,42	-65	2,96	ND
5,00	Solución de reserva	11,36	-	126	2,08	NM	-	ND
ND: No Determinado; NM: No Medible								

Caracterización de AuNP-(DTDTPA)(Ga) (no reivindicado en la presente invención)

Para comprender el efecto de la quelación de Ga en la estructura en capas, los autores de la invención realizaron un estudio detallado de DLS utilizando el conjugado quelado de Ga AuNP-(DTDTPA)(Ga) a pH 8. Si alguno de los aniones carboxilato en el conjugado de AuNP(DTDTPA) formará un complejo con iones Ga^{3+}, la carga negativa resultante será relativamente menor que la construcción principal. El potencial zeta de AuNP-(DTDTPA)(Ga) es -55 mV (-81 mV para el conjugado de AuNP(DTDTPA)) y la diferencia es ~ 25mV, lo que sugiere la presencia de grupos carboxílicos libres y también confirma la estructura en capas incluso después de la quelación. Las imágenes TEM de AuNP-(DTDTPA)(Ga) también indicaron claramente que las nanopartículas están dispuestas en un racimo de varias nanopartículas. Se espera que un racimo de 50-60 nanopartículas interactúe a través del enlace H macromolecular. Una red de enlace H de este tipo entre estructuras en nanopartículas no es inusual. Además, a medida que los iones Ga rodean a AuNP, está disponible otra capa de carboxilato para formar conjugación con biomolécula. Este experimento confirmó que se conserva la integridad estructural de los carboxilatos multicapa presentes en el conjugado original de AuNP(DTDTPA).

Análisis de Seguimiento de Nanopartículas (NTA)

El análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) también se realizó en el conjugado tanto de AuNP(DTDTPA) como de AuNP-(DTDTPA)(Ga) para confirmar la integridad estructural mediante el seguimiento de nanopartículas que se mueven simultáneamente bajo el movimiento browniano usando NTA. El tamaño de partícula promedio por NTA confirmó el diámetro hidrodinámico de ~ 85 nm para el conjugado de AuNP(DTDTPA) y no se observó cambio importante alguno en el tamaño del conjugado de AuNP-(DTDTPA)(Ga) (~ 98 nm), confirmando que la integridad estructural se conserva tras la quelación.

Investigación de la Unión de Ga^{3+} en AuNP

Se han realizado experimentos sistemáticos para confirmar la quelación de átomos de galio con DTDTPA y no presentes en la superficie de AuNP. Para comprender si la superficie de nanopartículas de oro tiene afinidad hacia iones Ga^{3+}, se eligieron dos nanopartículas de oro "modelo" diferentes.

La primera AuNP modelo que los autores de la invención eligieron fue AuNP recubierta con PEG-750 tiolado (AuNP-PEG-750), en donde la carga (potencial zeta) de AuNP (ζ = - 49 mV) es similar a la de AuNP(DTDTPA) (ζ = -81 mV), pero no contiene ligando quelante alguno tal como DTDTPA en la superficie. AuNP-PEG-750 (caracterizado independientemente) se trató con diferentes relaciones de Ga^{3+}. Las reacciones se realizaron en condiciones idénticas tal como se utilizaron y siguieron para la preparación de AuNP-(DTDTPA)(Ga). Las nanoconstrucciones obtenidas se caracterizaron por análisis HR-TEM, EDX, UV-Visible, tamaño y zeta y los datos se compararon con AuNP-(DTDTPA)(Ga).

El segundo modelo fue AuNP recubierto con ácido tióctico (AuNP-TA). La razón de elegir (AuNP-TA) es la siguiente: (a) el grupo TA tiene carboxilatos por fuera; sin embargo, carece de estructuras de ligando quelantes como las presentes en DTPA. (b) TA también tiene un tamaño (tamaño del núcleo de 3 - 5 nm), que es un tamaño similar al de AuNP(DTDTPA) (1). (c) Adicionalmente, la ruta sintética para la preparación de TA-AuNP también es similar a la de AuNP(DTDTPA). La reacción de Ga^{3+} con TA-AuNP se realizó en las mismas condiciones que se siguieron para la preparación de AuNP-(DTDTPA)(Ga). El producto final se caracterizó a fondo por análisis de HR-TEM, EDX, UV-Visible, tamaño y zeta y los datos se compararon con los de AuNP-(DTDTPA)(Ga).

Reacción de AuNP-PEG con $Ga(NO_3)_3$-(AuNP-PEG+Ga): $Ga(NO_3)_3$ disuelto en agua se añadió a AuNP-PEG (10,05 µM [Au]) en diferentes relaciones molares (relación Au:Ga; 1:5, 1:2,5, 1:1,125) y se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. Se observó la formación de espejo dorado en las paredes (ES-Figura 17) en el espacio de 5 minutos de la adición de nitrato de galio en todas las relaciones. La solución se centrifugó (20.000 rcf durante 20 min) después de 3 horas y los sedimentos obtenidos se lavaron tres veces, se resuspendieron en agua DI y se usaron para la caracterización.

Reacción de TA-AuNP con $Ga(NO_3)_3$-(TA-AuNP+Ga): $Ga(NO_3)_3$ disuelto en agua se añadió a TA-AuNP (6,7 µM [Au]) en una relación molar 1:5 (Au:Ga) y después de 30 minutos de adición, se observó la formación de precipitado y se continuó la agitación durante 3 horas adicionales a temperatura ambiente. La solución se centrifugó (20.000 rcf durante 20 min) para obtener el sedimento y posteriormente se lavó tres veces con agua DI. El sedimento obtenido se resuspendió en NaOH 0,01 M y se usó para la caracterización.

Las imágenes de HR-TEM obtenidas para el sedimento de AuNP-PEG+Ga (Au:Ga, 1:5) no fueron significativamente diferentes de las de AuNP-PEG, excepto que se observaron nanopartículas de mayor tamaño. La formación de nanopartículas de mayor tamaño resultó debido a la agregación inducida por la adición de $Ga(NO_3)_3$. Con respecto a la reacción de TA-AuNP+Ga, el sedimento final no mostró cambio alguno en el tamaño y la distribución de las partículas.

Se registraron los espectros EDX de los sedimentos obtenidos mediante la adición de nitrato de galio a (AuNP-PEG (Au:Ga; 1:5) y (TA-AuNP (Au:Ga; 1:5). Se utilizó la técnica de apuntar y disparar para escanear nanopartículas individuales y el área circundante. El escaneo se realizó adicionalmente a lo largo de la cuadrícula, incluidas las regiones densas de nanopartículas. Si se tuviera que adherir galio a la superficie de la nanopartícula de oro, entonces las señales de galio aparecerían de manera correspondiente. La ausencia de señal *kα de Ga* a 9,25 en sedimentos (AuNP-PEG+Ga (1:5)) y (TA-AuNP+Ga (1:5)), indica claramente que no hay afinidad entre las nanopartículas de oro y los iones galio.

Los resultados experimentales presentados validan inequívocamente que los iones Ga no se adhieren a la superficie de las nanopartículas de oro. Los datos de imagen STEM-HAADF y el análisis HR-TEM-EDX de AuNP-(DTDTPA)(Ga) indicaron que en el punto O_2, que se encuentra entre los núcleos de oro (lejos de la superficie de oro), los autores de la invención detectaron la presencia de Ga, así como un alto contenido de carbono y oxígeno. Este resultado es una prueba independiente de que Ga^{3+} es quelado por DTDTPA, mientras que la creencia convencional es que las interacciones directas de Au y Ga son factibles solo a altas temperaturas (300-400°C). Los datos analíticos de los autores de la invención para AuNP-(DTDTPA)(Ga) y los resultados de nanopartículas "modelo" confirman que los iones Ga no están unidos en la superficie de las nanopartículas de oro.

La FIG. 7 resume la síntesis preferida de la divulgación. En la fase 1 a la fase 2, el AuNP-(DTDTPA)(Ga) de la

divulgación se forma a temperatura ambiente. HRP se fija como un modelo de biomolécula.

Ejemplo 1. (no reivindicado aquí)

Al determinar la cantidad de Au por AAS y la cantidad de Ga por ICP-OES, los autores de la invención han calculado que la relación molar máxima Ga:Au que se puede obtener es ≈1,2, lo que significa que hay ligeramente más Ga en las AuNP que Au. Esto es realmente un resultado plausible si se tiene en cuenta que los núcleos de Au son muy pequeños (3-5 nm) y el recubrimiento polimérico de DTDTPA puede coordinar una cantidad considerable de Ga. El valor potencial zeta de 2 (- 81mV (1) a - 55 mV) muestra un cambio positivo que indica la coordinación de la coordinación electropositiva de galio.

Con el fin de investigar la concentración máxima de galio que se puede incorporar dentro de la nanoconstrucción (1), los autores de la invención realizaron titulaciones en serie de 1 con Ga^{3+} y evaluaron el conjugado resultante utilizando tanto la espectroscopía de RMN de Ga-71 como el análisis ICP-OES (Véase la Fig. 3). La RMN de Ga71 activa se utiliza como una sonda para determinar la concentración de Ga quelado. RMN de diferentes concentraciones de $Ga(NO_3)_3$ se registraron en D2O (Véase la Tabla 3). Se trazó una curva patrón utilizando concentraciones de Ga no quelado frente a valores de integración pico. Usando la gráfica, los autores de la invención determinaron que 11 mM de Au pueden quelar irreversiblemente hasta 58 mM de Ga. Eso indica que cualquier galio agregado más allá de esta concentración no se quelaría con AuNP-DTDTPA. Los resultados de RMN se validaron mediante la realización de experimentos adicionales utilizando ICP-OES. En este experimento, los autores de la invención monitorizaron las relaciones Au/Ga de los conjugados resultantes después del tratamiento de 11 mM de 1 (Au) con diferentes cantidades de Ga3+. La relación Au/Ga se convierte en una constante después de la adición de 58 mM de Ga3+. Mediante estos experimentos, los autores de la invención han demostrado la concentración exacta de Ga que puede quelarse irreversiblemente a 1.

Tabla 3. Titulación de $Ga(NO_3)_3$ con 1 y la cantidad de Ga^{3+} detectado por ICP-OES y RMN de ^{71}Ga en términos de relación de Au/Ga y Ga^{3+} en mg, respectivamente.

Mues.Nº	Cantidad de Ga(NO3)3 en mg	Marcadores de muestra	Valor expl. de Ga 294,363 para 25 ml de solución diluida ppm	Valor expl. para solución madre ppm	Valor expl. de Au 242,794 para 25 ml de solución diluida ppm	Valor expl. para solución madre ppm	valor calculado Au ppm
1	2,5	P-2.5	0,90	112.83	14,04	1755,16	450
2	5,0	P-5.0	0,57	71.65	12,94	1617,61	450
3	10,0	P-10	0,04	5.03	11,20	1399,94	450
4	15	P-15	0,01	1,12	11,28	1410,27	450
5	20	P-20	0,02	2,75	11,53	1441,28	450
6	30	P-30	0,32	39,99	9,90	1238,03	450
7	40	P-40	0,23	29,00	9,41	1175,80	450
1	2,5	S-2.5	0,20	25,13	0,10	11,88	
2	5,0	S-5.0	0,37	45,92	0,10	12,53	
3	10,0	S-10	2,57	320,88	0,06	7,91	
4	15	S-15	4,22	527,21	0,07	9,24	
5	20	S-20	5,69	711,13	0,07	8,55	
6	30	S-30	9,73	1216,32	0,03	3,83	
7	40	S-40	12,82	1603,01	-0,01	-1,72	
1	2,5 mg/ml de construcción	AuNP-DTDTPA	-0,28	-35,44	27,35	3419,07	1125
2	20 mg/ml	Ga $(NO_3)_3$	42,93	5365,74	0,15	18,87	2000

Ejemplo 2.

La síntesis de [AuNP(DTDTPA)(Péptido)] se realizó tal como se describe a continuación. Se usaron los siguientes péptidos.

Péptido 1 = Bombesina de ácido tióctico; Lipoico-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH2 (Lipoico-QWAVGHLM-NH2) (SEQ ID NO: 1)

Péptido 2 = Tioctil-Lys-Lys-Lys (DOTA) -PEG2-Tyr-His-Trp-Tyr-Gly-Tyr-Thr-Pro-Gln-Asn-Val-Ile [Tioctil-KKK (DOTA) -PEG2-YHWYGYTPQNVI] (SEQ ID NO: 2)

Procedimiento general:

El péptido terminado con ácido tióctico se hizo reaccionar con nanopartículas de oro con relaciones estequiométricas de Au:Péptido de 1:0,25, 1:0,5, 1:1, 1:2 y 1:4. Típicamente, en un vial de vidrio de 20 ml se preparó una solución de AuNP-DTDTPA ([Au] = 2,28 µmol) usando una mezcla acuosa/metanólica (1:9) de NaOH 0,01 M. Péptidos terminados con ácido tióctico [0,57 µmol, 1,14 µmol, 2,27 µmol, 4,54 µmol y 9,08 µmol] se disolvieron en 4 mL de MeOH y luego se añadieron a la solución de nanopartículas. La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente y se observó la formación de un precipitado marrón oscuro. La mezcla se centrifugó (9300 g durante 10 min a 20°C) y se retiró el sobrenadante. Las AuNP precipitadas se lavaron dos veces con MeOH y tres veces con agua. El AuNP(DTDTPA)(Péptido) se secó a baja presión y se almacenó a -20°C.

La síntesis de AuNP(DTDTPA)(Ga)(Péptido) de la presente divulgación se realizó como sigue.

La complejación con galio se realizó mediante la adición de Ga(NO3)3 a una solución coloidal de AuNP(DTDTPA)(Péptido) a temperatura ambiente con agitación continua. El contenido óptimo de galio requerido para la quelación se controló mediante análisis titrimétrico realizado en ICP-OES y mediante experimentos con RMN de 71Ga. Típicamente, se preparó una solución de AuNP(DTDTPA)(Péptido) ([Au] = 22 mM) usando NaOH 0,01 M para mantener el pH entre 7 y 8. A esta solución se añadieron 118 mM de Ga(NO3)3 con agitación continua a temperatura ambiente. La formación de precipitado se observó inmediatamente. La mezcla de reacción se dejó agitar durante 3 horas y se recogió un residuo negro parduzco por centrifugación. El residuo se lavó a fondo con agua DI para separar cualquier sal de galio que no haya reaccionado.

La síntesis de AuNP(DTDTPA)(67Ga)(Péptido) de la presente divulgación se realizó como sigue.

En un Eppendorf de 2 mL se mezclaron 190 µL de acetato de amonio 0,4 M (pH ≈ 7) con 20 µL de AuNP(DTDTPA)(Péptido) (5 mg/mL, NaOH 0,01 M). A esta mezcla se añadieron 250 µL de 67GaCl3 (en HCl 0,1 M). La solución se dejó a temperatura ambiente durante 5 min. La solución se filtró luego en un Millipore Amicon Ultra de 0,5 mL 10k. Las AuNP recogidas se diluyeron en 150 µL de H2O y se evaluó su pureza radioquímica por ITLC-SG, usando HCl/MeOH 6 M (5:95) como eluyente (AuNP(DTDTPA)(Péptido): Rf = 0). El rendimiento del radiomarcaje fue del 87,5% y la pureza radioquímica > 95%.

La síntesis de 67Ga-AuNP-DTDTPA de la presente divulgación se realizó como sigue. En un Eppendorf de 2 mL se mezclaron 350 µL de acetato de amonio 0,4 M (pH ≈ 7) con 20 µL de AuNP-DTDTPA (5 mg/mL, [Au] = 11,42 µmol) en NaOH 0,01M). A esta mezcla, se añadieron 250 µL de 67GaCl3 (HCl 0,1 M). La mezcla de reacción se calentó a 85°C durante 15 min. La solución se filtró luego en un Millipore Amicon Ultra de 0,5 mL 10k. Las AuNP recogidas se diluyeron en 150 µL de H2O y se evaluó su pureza radioquímica por ITLC-SG, usando HCl/MeOH 6 M (5:95) como eluyente (67Ga-AuNP-DTDTPA: Rf = 0). El rendimiento del radiomarcaje fue del 86,7% y la pureza radioquímica > 95%.

Luego se estudiaron las propiedades físico-químicas de las nanoconstrucciones. La FIG. 8 es una micrografía de (a) AuNP(DTDTPA)(Péptido) y de (b) AuNP(DTDTPA)(Ga)(Péptido). La Tabla 4 que figura a continuación proporciona propiedades físico-químicas de diversas reacciones de BBN-AuNP-DTDTPA.

Tabla 4: Propiedades físico-químicas de diversas reacciones de BBN-AuNP-DTDTPA.

	Tamaño (nm)	Carga (mv)
Au:Péptido 1 (1:0,4)	110	-73
Au:Péptido 1 (1:2)	105	-69
Au:Péptido 1 (1:4)	120	-66
[AuNP(DTDTPA)(Péptido 1)]	122	-54
AuNP(DTDTPA)(Péptido 2)]	167	-53

Se realizaron estudios adicionales para evaluar la estabilidad in vitro de AuNP(DTDTPA)(Péptido) y AuNP(DTDTPA)(Ga)(Péptido). Estos resultados se presentan en la Fig. 9.

La Fig. 10 proporciona el espectro de XPS survey de AuNP(DTDTPA)(Péptido 1).

La Fig. 11 proporciona el espectro de XPS de alta resolución de AuNP(DTDTPA)(Péptido 1).

La Tabla 5 informa sobre la composición elemental relativa para AuNP(DTDTPA)(Péptido 1)

Tabla 5: Composición Elemental Relativa de AuDTBBN-NP determinada por XPS [% de Átomo]

	C	N	O	Na†	Si*	S	Au
AuNP(DTDTPA)(Péptido1)	57	14	19	3,0	1,2	3,1	3,6
† Sodio detectado debido a la disolución en solución de NaOH * Silicio detectado debido a la deposición en obleas de silicio							

La Tabla 6 informa sobre las composiciones relativas y las asignaciones de pico más probables para las especies de carbono.

Tabla 6: Composiciones Relativas y Asignaciones Pico Más Probables para Especies de Carbono Determinadas por XPS, Región C 1s [% de Átomo]

	C-C, C-H	C-O, C-N	O-C=O, N-C=O
AuNP(DTDTPA)(Péptido 1)	41	35	24

Como se muestra en la Fig. 11, el análisis del espectro de alta resolución XPS para la región S 2p sugiere que hay dos estados S diferentes para la muestra. Las energías para el S elemental y algunas formas orgánicas de S caen en el intervalo de 163-164eV [1], que corresponde al pico de energía de 163.2eV listado como Especie 2. Esto es probablemente S que NO está unido al Au. También hay un pico S (Especie 1) a 162,3 eV, que corresponde al pico de energía informado para la unión S-Au [2]. La energía pico de 84,3 eV para el pico Au 4f7/2 marcado como Especie 2 sugiere que el Au está unido a S [1], aunque esta energía es ligeramente más baja que el valor tabulado. Si no fuera por la evidencia de la unión de Au-S de la alta resolución S 2p, se podría creer que este pico se debió a Au-N [3]. La muestra también contiene un pico a 83,6 eV, lo que probablemente se deba a Au en forma metálica, no unido al material orgánico de ninguna manera.

También se realizó un ensayo de citotoxicidad dependiente de la dosis con AuNP(DTDTPA)(Péptido 1) en células de cáncer de próstata PC-3. Los resultados de este ensayo se informan en la Fig. 12.

REIVINDICACIONES

1. Una nanoconstrucción de AuNP(DTDTPA)(biomolécula) que comprende una nanopartícula (NP) de Au, DTDTPA y una biomolécula, en donde DTDTPA es ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) que está ditiolado (DT), y en donde el DTDTPA está enlazado a la superficie de la nanopartícula de Au fijando un grupo tiol del DTDTPA a la superficie de la nanopartícula de Au, caracterizada por que la biomolécula es un péptido terminado en ácido tióctico enlazado a la superficie de la nanopartícula de Au a través de un enlace Au-S.

2. La nanoconstrucción de AuNP(DTDTPA)(biomolécula) de la reivindicación 1, en donde la nanoconstrucción es estable en una solución con una concentración en un intervalo de 30 µg/ml a 5 mg/ml y con un pH en un intervalo de 6 a 13.

3. La nanoconstrucción de AuNP(DTDTPA)(biomolécula) de la reivindicación 1, en donde el péptido terminado en ácido tióctico es bombesina tióctica.

4. La nanoconstrucción de AuNP(DTDTPA)(biomolécula) de la reivindicación 3, en donde la bombesina tióctica tiene la secuencia: Lipoico-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH_2 (SEQ ID NO: 1).

5. La nanoconstrucción de AuNP(DTDTPA)(biomolécula) de la reivindicación 1, en donde el péptido terminado en ácido tióctico tiene la secuencia: Tioctil-Lys-Lys-Lys(DOTA)-PEG2-Tyr-His-Trp-Tyr-Gly-Tyr-Thr-Pro-Gln-Asn-Val-Ile (SEQ ID NO: 2).

6. Un método para la síntesis de una nanoconstrucción de AuNP(DTDTPA)(biomolécula) que comprende una nanopartícula (NP) de AU, DTDTPA y una biomolécula, comprendiendo el método:

mezclar una solución metanólica de una biomolécula con una solución de conjugado de AuNP(DTDPTA) disuelto en una mezcla acuosa/metanólica (1:9) de NaOH 0,01 M a temperatura ambiente a relaciones estequiométricas de Au:biomolécula en el intervalo de 1:0,25 a 1:4; y agitar la solución mixta durante un período de tiempo predeterminado hasta que precipite la formación de AuNP(DTDPTA)(biomolécula),

caracterizado por que la biomolécula es un péptido terminado en ácido tióctico unido a la superficie de la nanopartícula de Au a través de un enlace Au-S; y

separar los precipitados de AuNP(DTDTPA)(biomolécula) de la mezcla de reacción y secar los precipitados de AuNP(DTDPTA)(biomolécula).

7. Una nanoconstrucción de AuNP(DTDTPA)(biomolécula) que comprende una nanopartícula (NP) de Au, DTDTPA y una biomolécula que es un péptido terminado en ácido tióctico, en donde DTDTPA es ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) que está ditiolado (DT),

caracterizada por que la nanoconstrucción se obtiene uniendo un grupo tiol de DTDTPA a la superficie de la nanopartícula de AU y enlazando además el péptido terminado en ácido tióctico a la superficie de la nanopartícula de Au a través de un enlace Au-S.

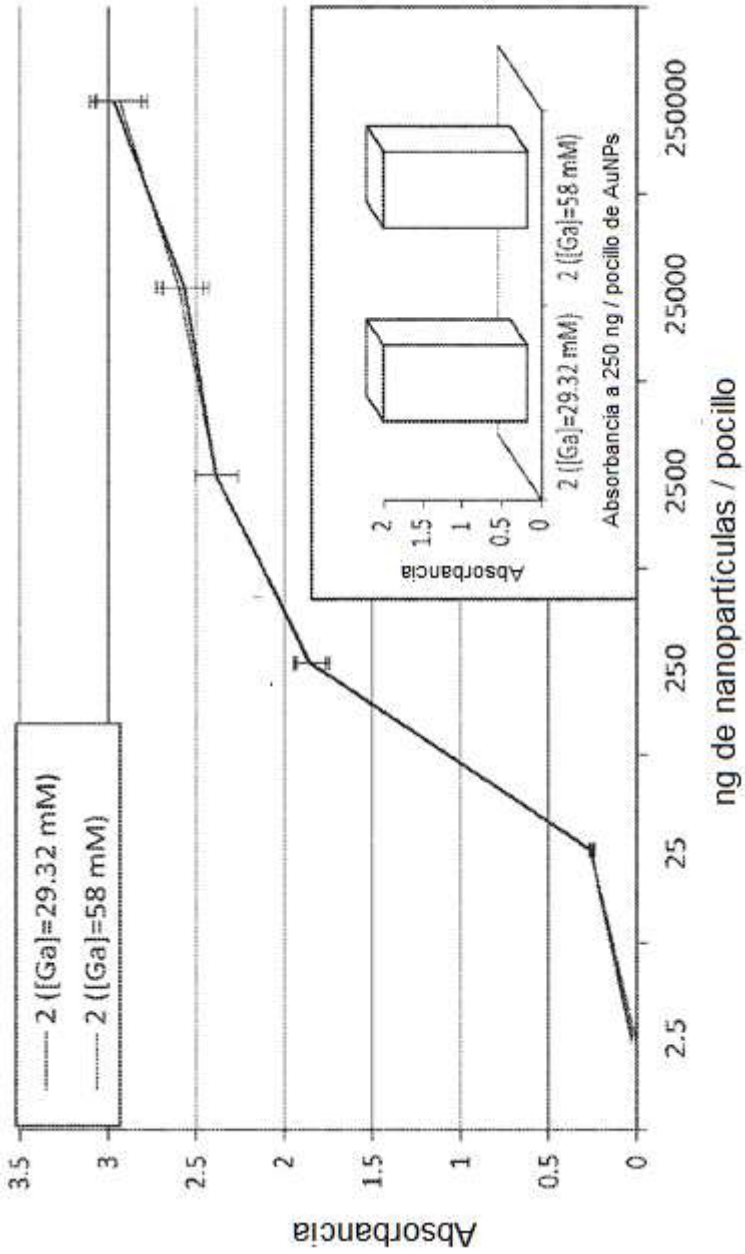
Absorbancia
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
2.5
25
250
2500
25000
250000
ng de nanopartículas / pocillo
2 ([Ga]=29.32 mM)
2 ([Ga]=58 mM)
Absorbancia
2
1.5
1
0.5
0
2 ([Ga]=29.32 mM)
2 ([Ga]=58 mM)
Absorbancia a 250 ng / pocillo de AuNPs

FIG. 1

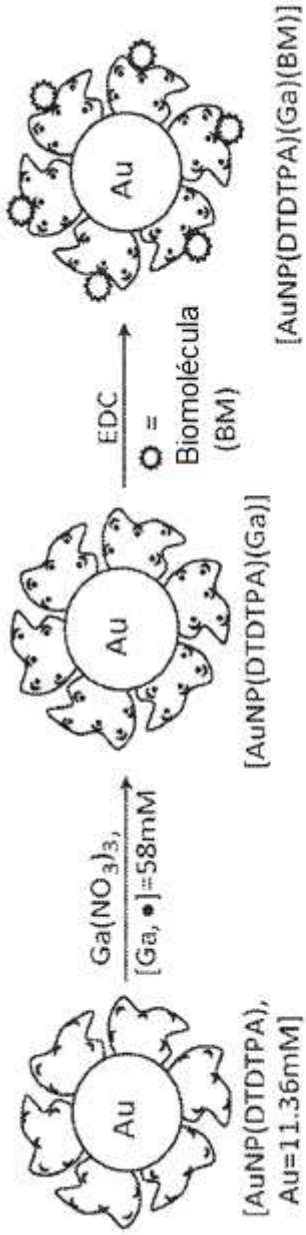
Au
[AuNP(DTDTPA),
Au=11.36mM]
Ga(NO3)3,
[Ga, ●]=58mM
Au
[AuNP(DTDTPA)(Ga)]
EDC
○ =
Biomolécula
(BM)
Au
[AuNP(DTDTPA)(Ga)(BM)]

FIG. 2A

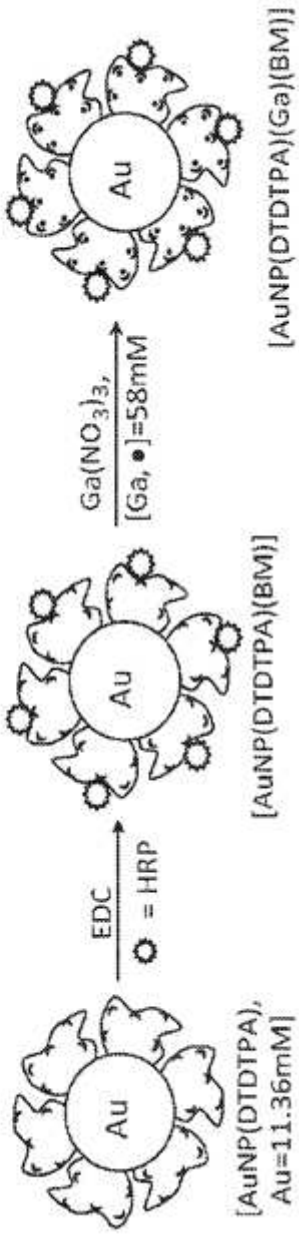
Au
[AuNP(DTDTPA),
Au=11.36mM]
EDC
○ = HRP
Au
[AuNP(DTDTPA)(BM)]
Ga(NO3)3,
[Ga, ●]=58mM
Au
[AuNP(DTDTPA)(Ga)(BM)]

FIG. 2B

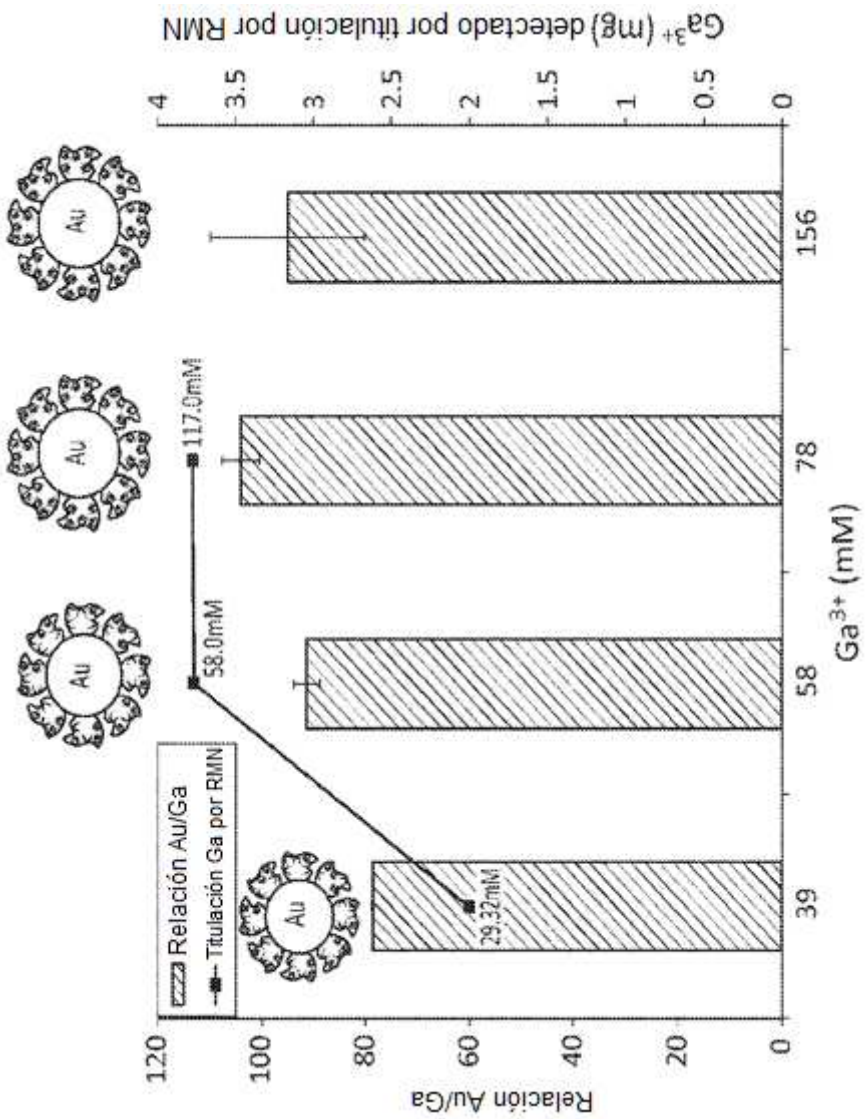
Relación Au/Ga
Titulación Ga por RMN
Au
29.32mM
58.0mM
117.0mM
120
100
80
60
40
20
0
39
58
78
156
Ga^{3+} (mM)
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Ga^{3+} (mg) detectado por titulación por RMN

FIG. 3

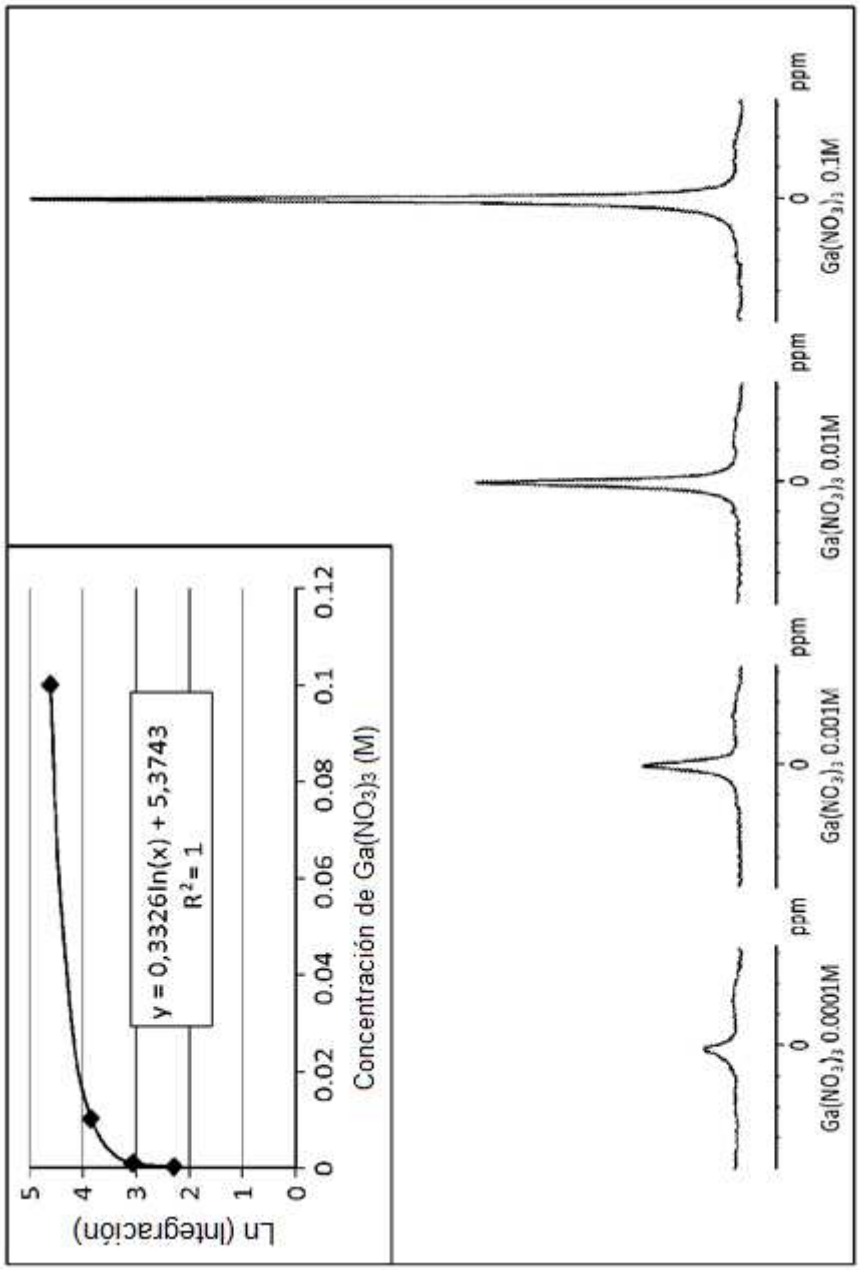
Ln (Integración)
5
4
3
2
1
0
0
0.02
0.04
0.06
0.08
0.1
0.12
Concentración de Ga(NO3)3 (M)
y = 0,3326ln(x) + 5,3743
R2 = 1
Ga(NO3)3 0.0001M
Ga(NO3)3 0.001M
Ga(NO3)3 0.01M
Ga(NO3)3 0.1M
ppm
0

FIG. 4

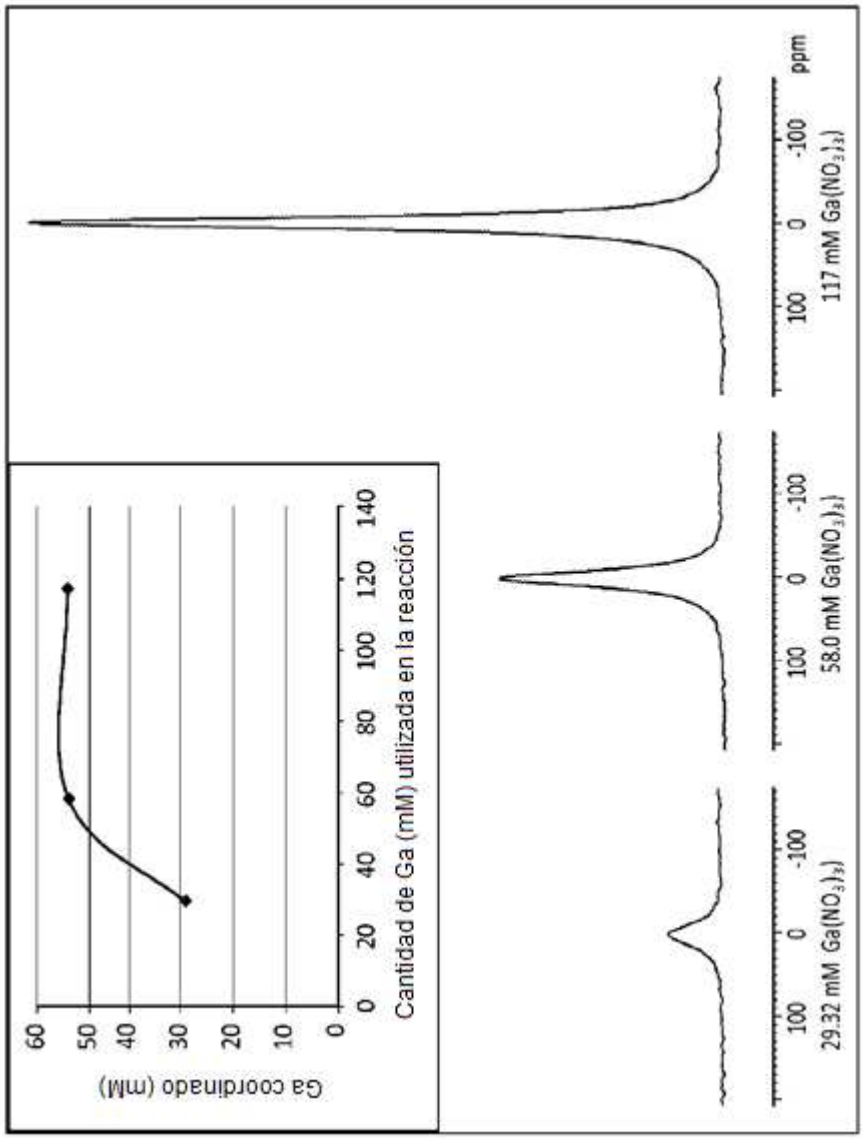
Ga coordinado (mM)
60
50
40
30
20
10
0
0
20
40
60
80
100
120
140
Cantidad de Ga (mM) utilizada en la reacción
100
0
-100
29.32 mM Ga(NO3)3)
100
0
-100
58.0 mM Ga(NO3)3)
100
0
-100
117 mM Ga(NO3)3)
ppm

FIG. 5

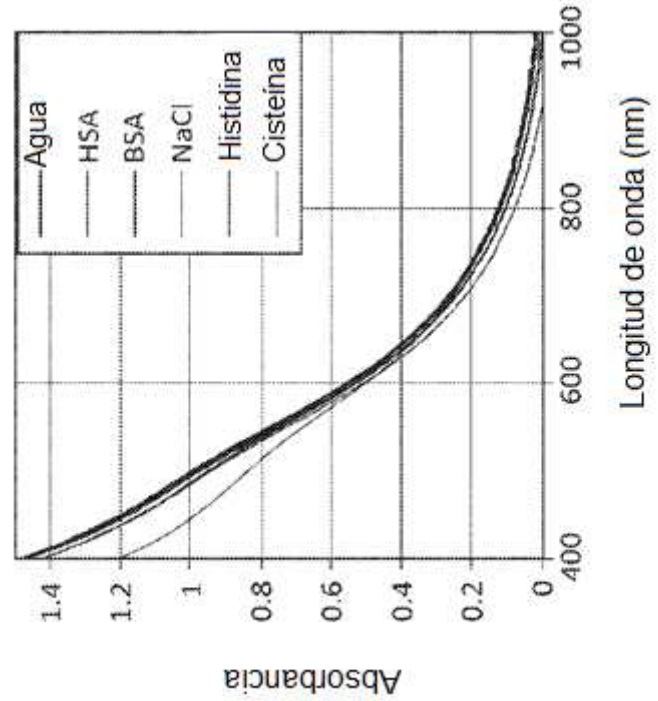
Agua
HSA
BSA
NaCl
Histidina
Cisteína
Absorbancia
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
400
600
800
1000
Longitud de onda (nm)

FIG. 6B

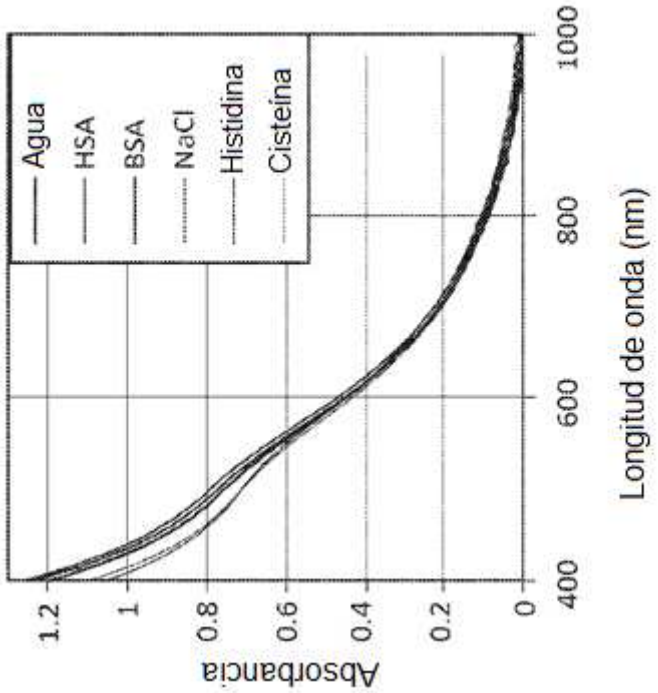
Agua
HSA
BSA
NaCl
Histidina
Cisteína
Absorbancia
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
400
600
800
1000
Longitud de onda (nm)

FIG. 6A

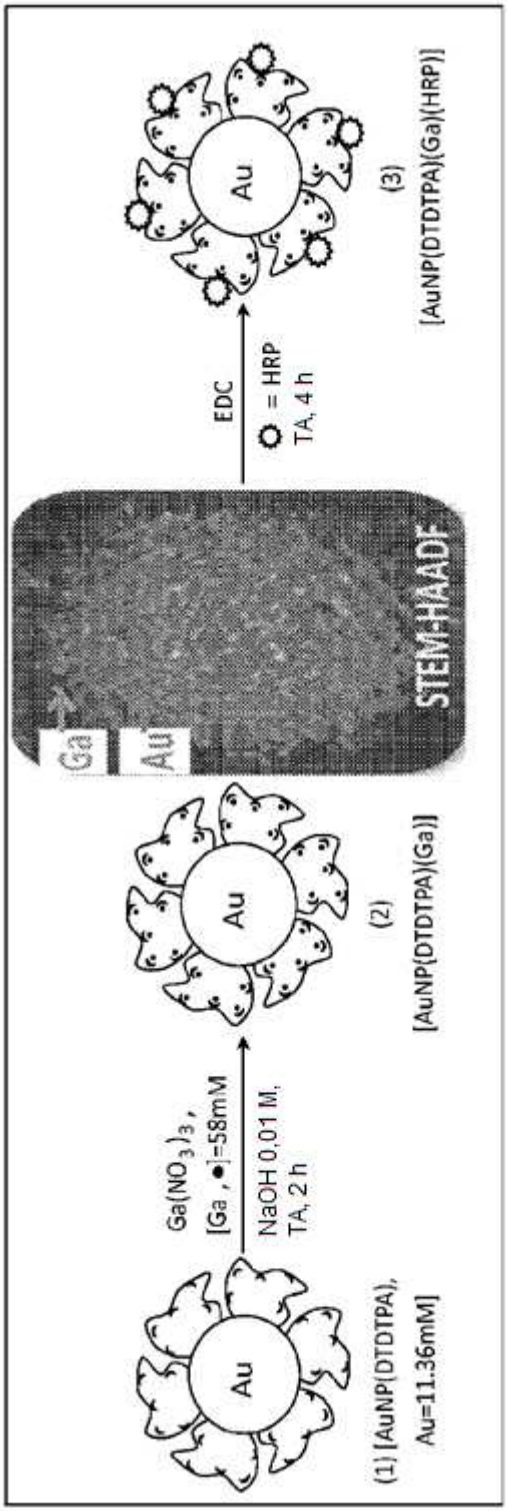
Au
(1) [AuNP(DTDTPA),
Au=11.36mM]
Ga(NO3)3 ,
[Ga ,•]=58mM
NaOH 0,01 M,
TA, 2 h
Au
(2)
[AuNP(DTDTPA)(Ga)]
Ga
Au
STEM-HAADF
EDC
= HRP
TA, 4 h
Au
(3)
[AuNP(DTDTPA)(Ga)(HRP)]

FIG. 7

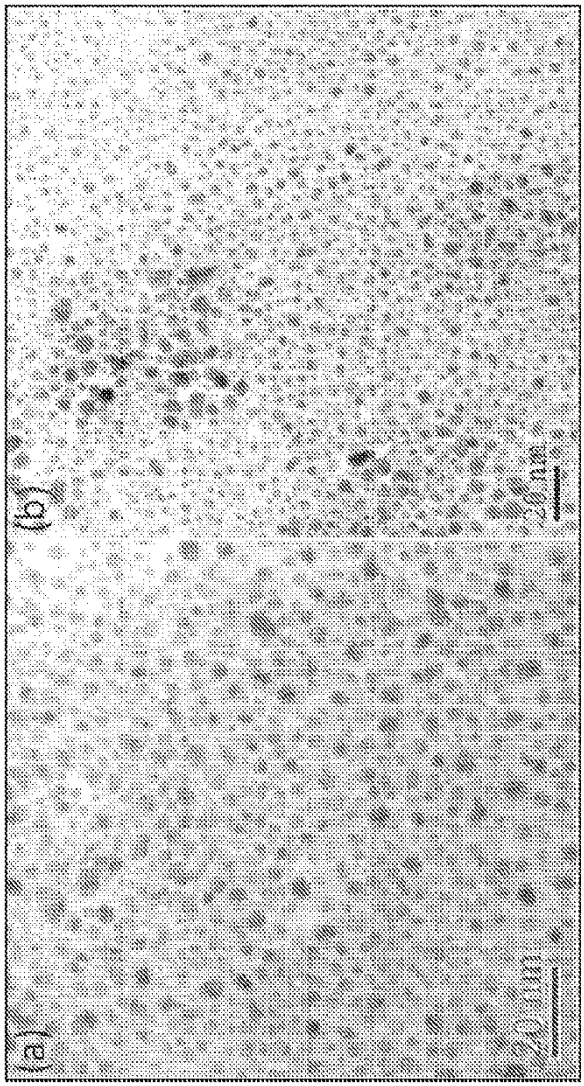

FIG. 8

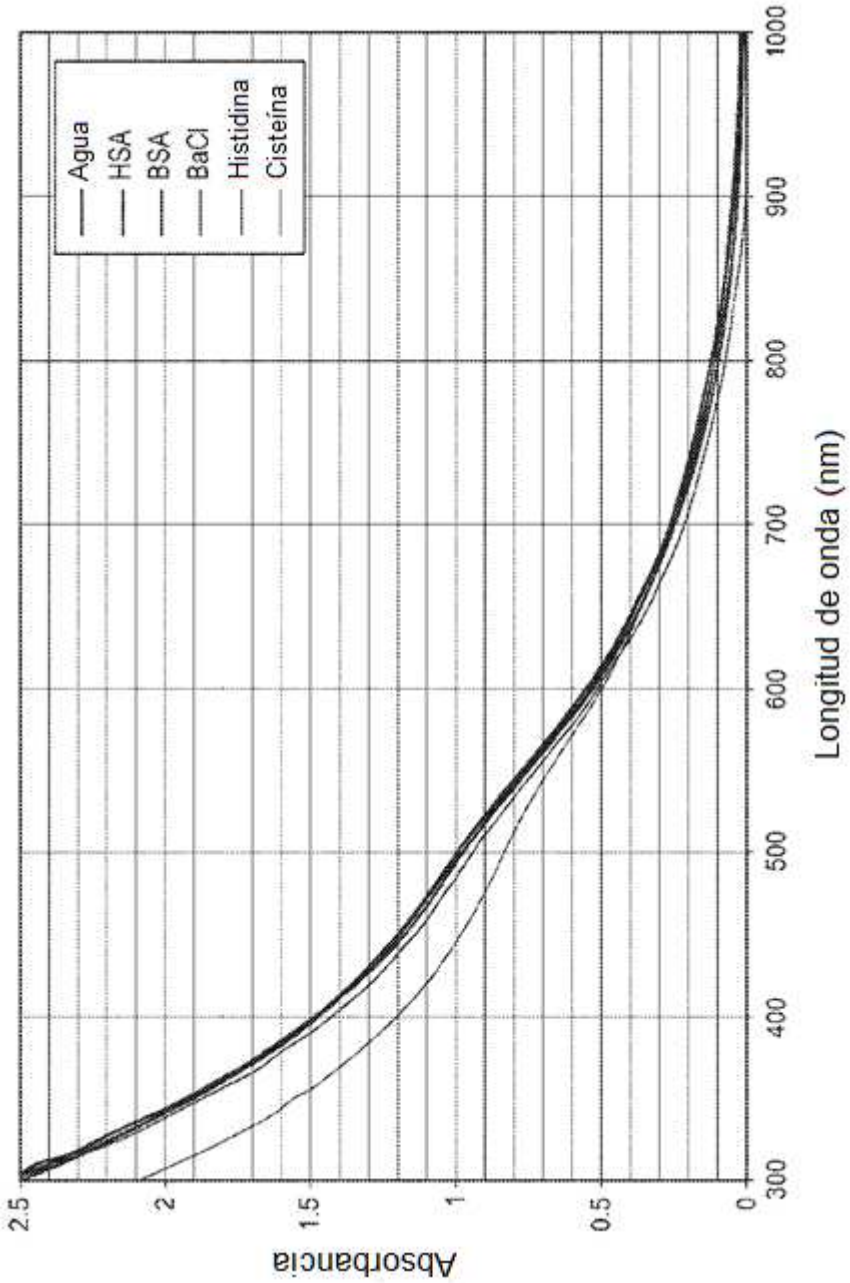
Agua
HSA
BSA
BaCl
Histidina
Cisteína
Absorbancia
2.5
2
1.5
1
0.5
0
300
400
500
600
700
800
900
1000
Longitud de onda (nm)

FIG. 9A

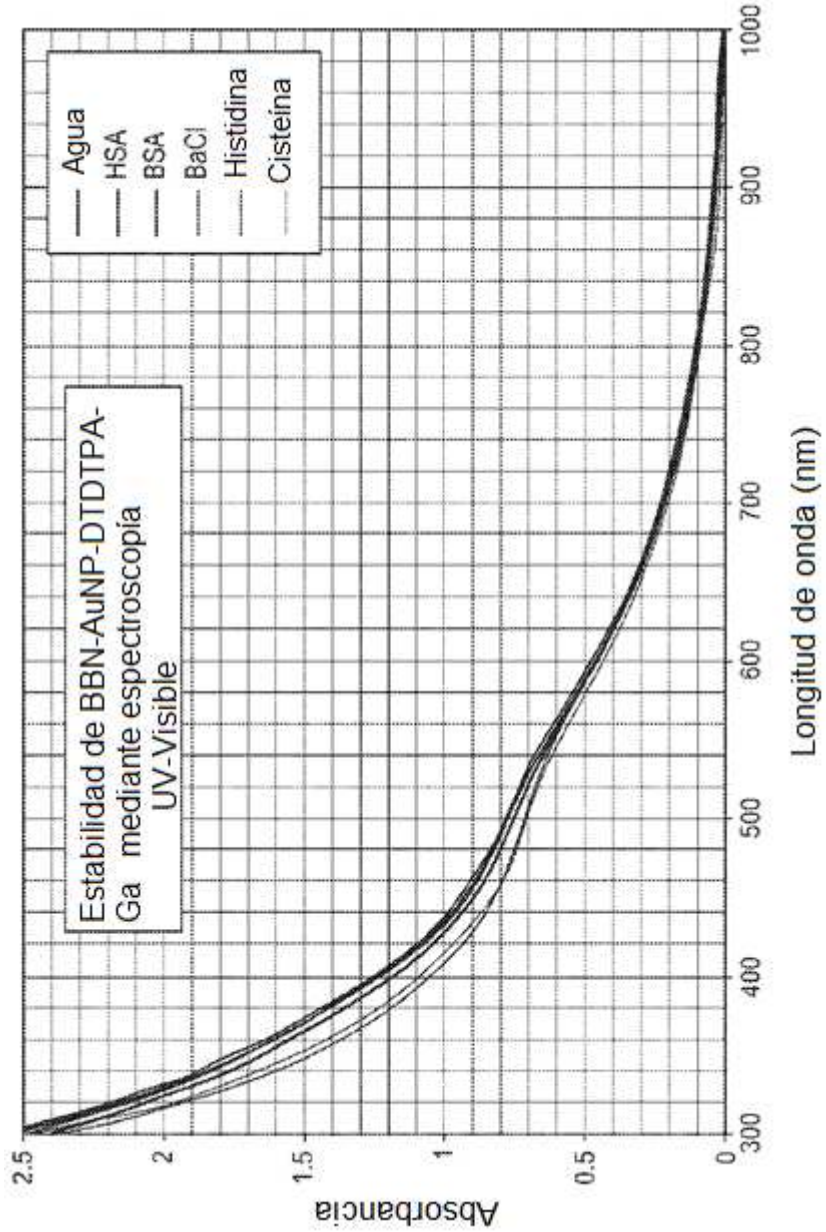
Estabilidad de BBN-AuNP-DTDTPA-Ga mediante espectroscopía UV-Visible
Agua
HSA
BSA
BaCl
Histidina
Cisteína
Absorbancia
2.5
2
1.5
1
0.5
0
300
400
500
600
700
800
900
1000
Longitud de onda (nm)

FIG. 9B

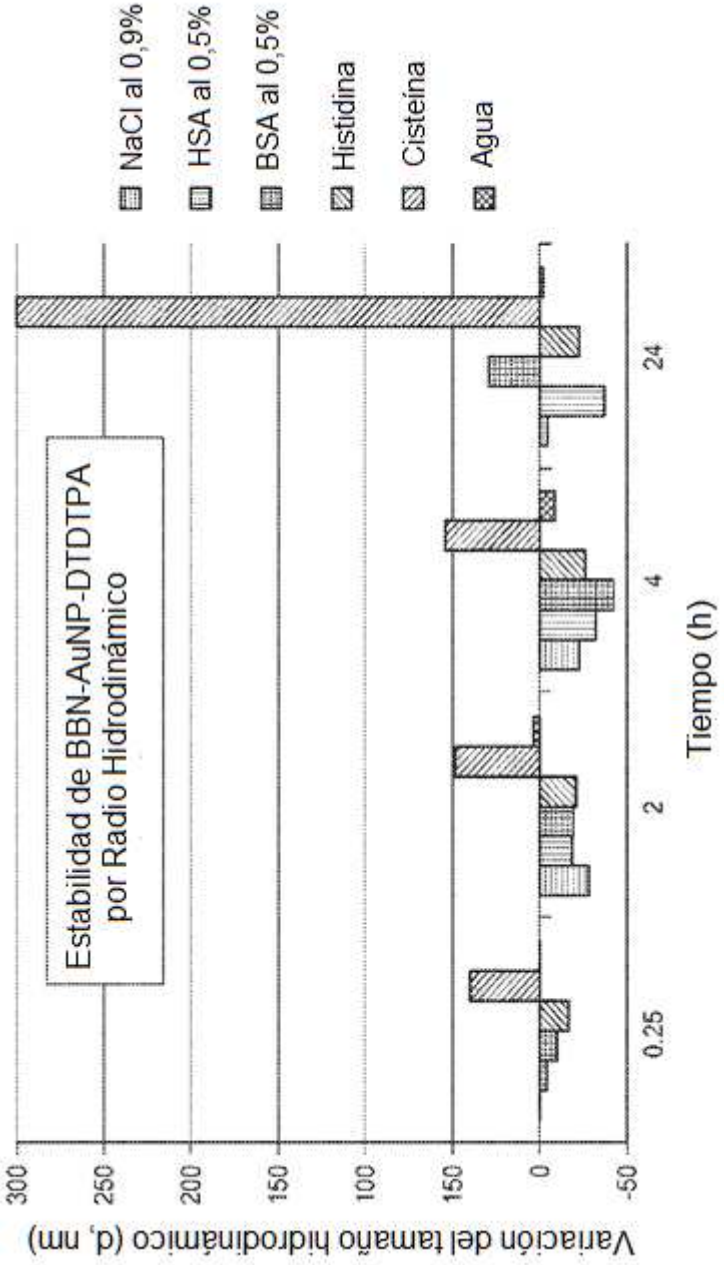
Estabilidad de BBN-AuNP-DTDTPA
por Radio Hidrodinámico
NaCl al 0,9%
HSA al 0,5%
BSA al 0,5%
Histidina
Cisteína
Agua
Variación del tamaño hidrodinámico (d, nm)
300
250
200
150
100
150
0
-50
0.25
2
4
24
Tiempo (h)

FIG. 9C

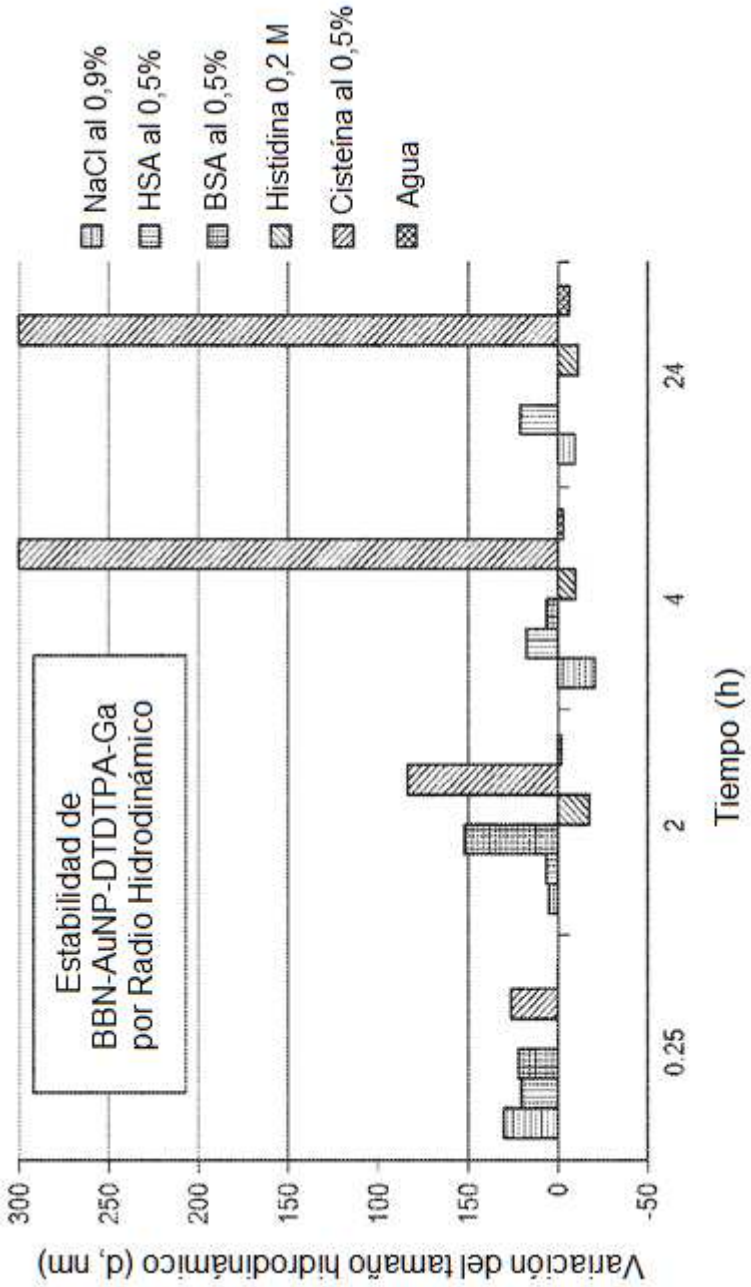
Estabilidad de
BBN-AuNP-DTDTPA-Ga
por Radio Hidrodinámico
NaCl al 0,9%
HSA al 0,5%
BSA al 0,5%
Histidina 0,2 M
Cisteína al 0,5%
Agua
Variación del tamaño hidrodinámico (d, nm)
300
250
200
150
100
150
0
-50
0.25
2
4
24
Tiempo (h)

FIG. 9D

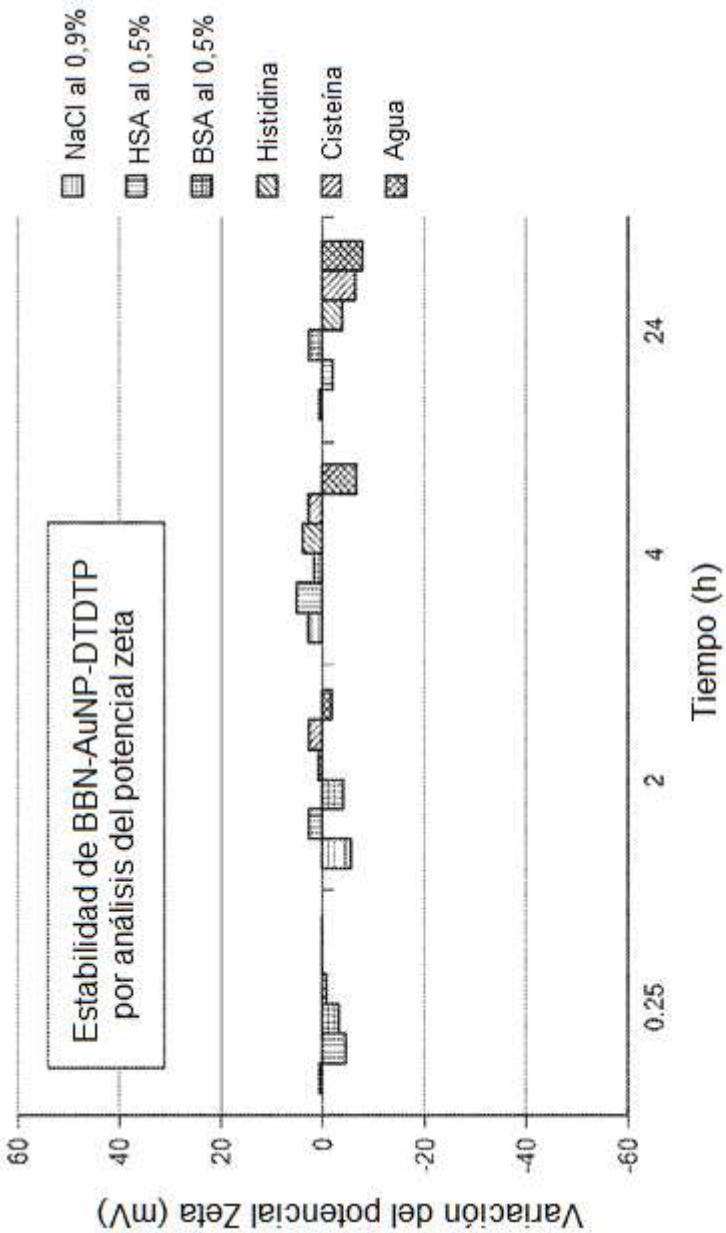
Estabilidad de BBN-AuNP-DTDTP
por análisis del potencial zeta
NaCl al 0,9%
HSA al 0,5%
BSA al 0,5%
Histidina
Cisteína
Agua
Variación del potencial Zeta (mV)
60
40
20
0
-20
-40
-60
0,25
2
4
24
Tiempo (h)

FIG. 9E

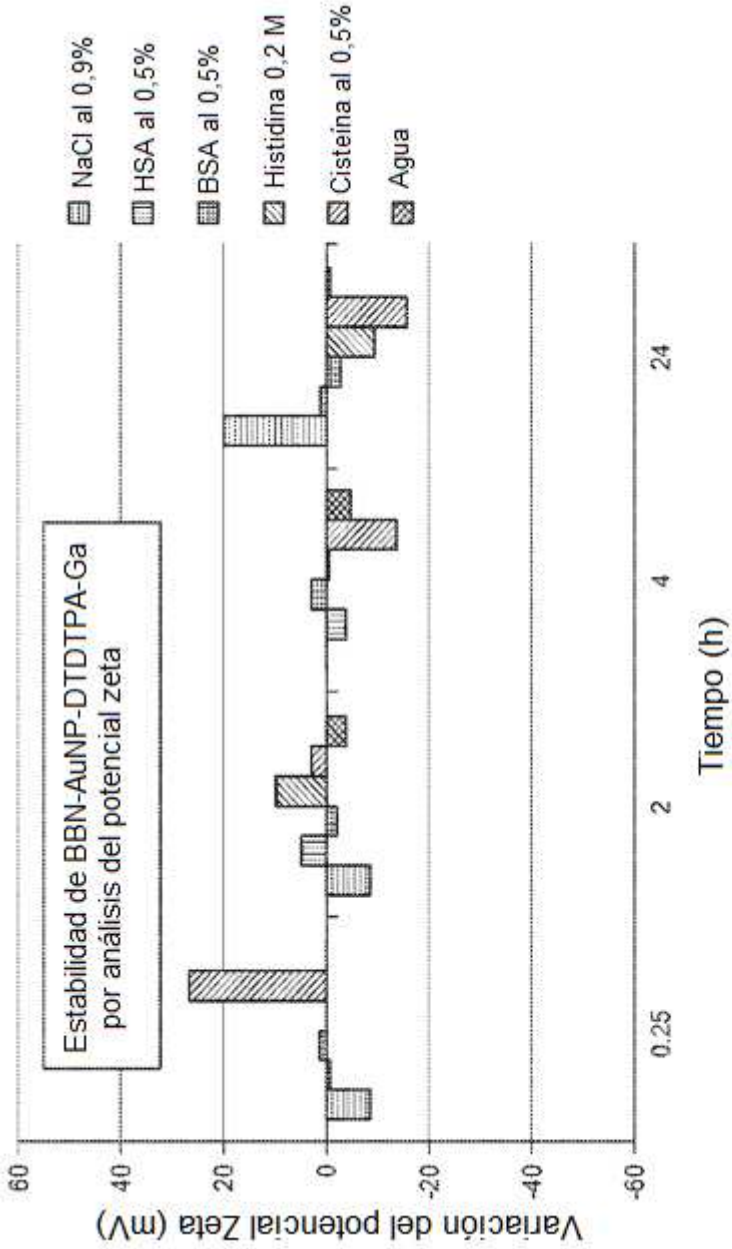
Estabilidad de BBN-AuNP-DTDTPA-Ga
por análisis del potencial zeta
NaCl al 0,9%
HSA al 0,5%
BSA al 0,5%
Histidina 0,2 M
Cisteína al 0,5%
Agua
Variación del potencial Zeta (mV)
60
40
20
0
-20
-40
-60
0,25
2
4
24
Tiempo (h)

FIG. 9F

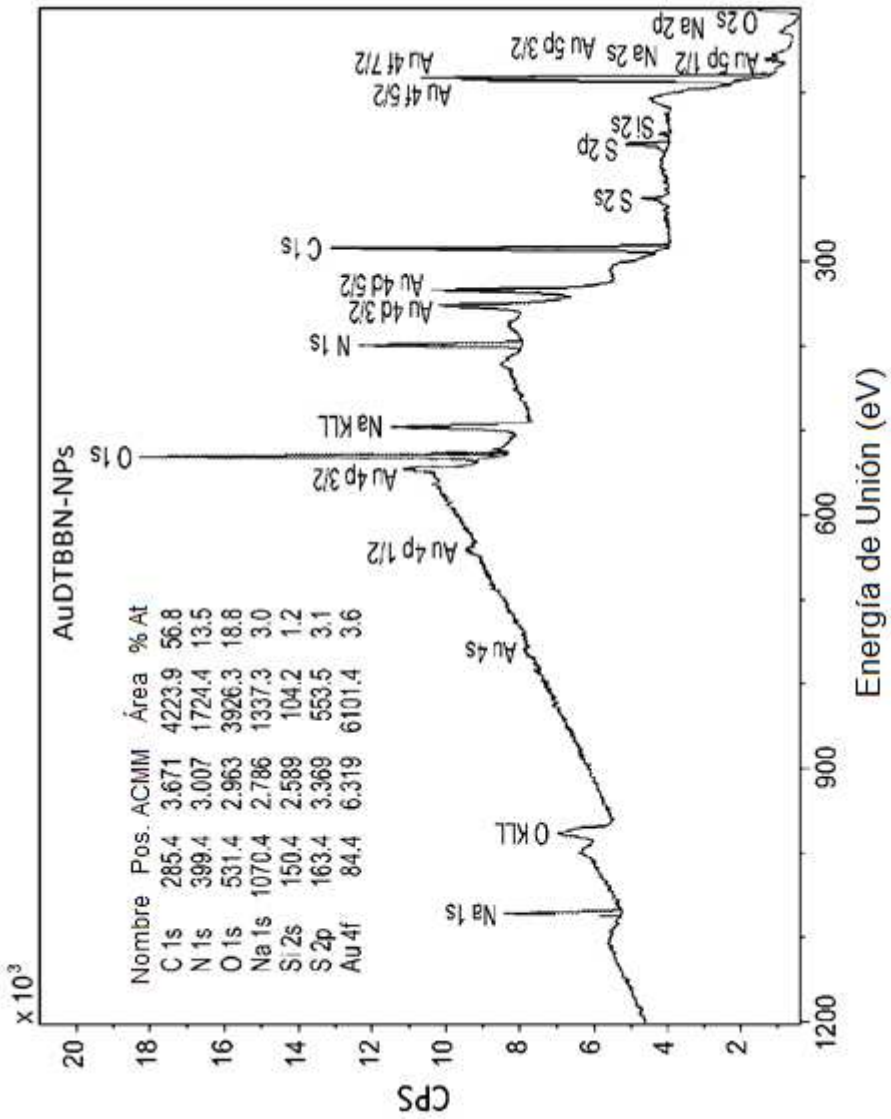
AuDTBBN-NPs
x 10³
Nombre Pos. ACMM Área % At
C 1s 285.4 3.671 4223.9 56.8
N 1s 399.4 3.007 1724.4 13.5
O 1s 531.4 2.963 3926.3 18.8
Na 1s 1070.4 2.786 1337.3 3.0
Si 2s 150.4 2.589 104.2 1.2
S 2p 163.4 3.369 553.5 3.1
Au 4f 84.4 6.319 6101.4 3.6
CPS
Energía de Unión (eV)
Na 1s
O KLL
Au 4s
Au 4p 1/2
Au 4p 3/2
O 1s
Na KLL
N 1s
Au 4d 3/2
Au 4d 5/2
C 1s
S 2s
Si 2s
S 2p
Au 4f 5/2
Au 4f 7/2
Au 5p 1/2
Na 2s
Au 5p 3/2
O 2s
Na 2p

FIG. 10A

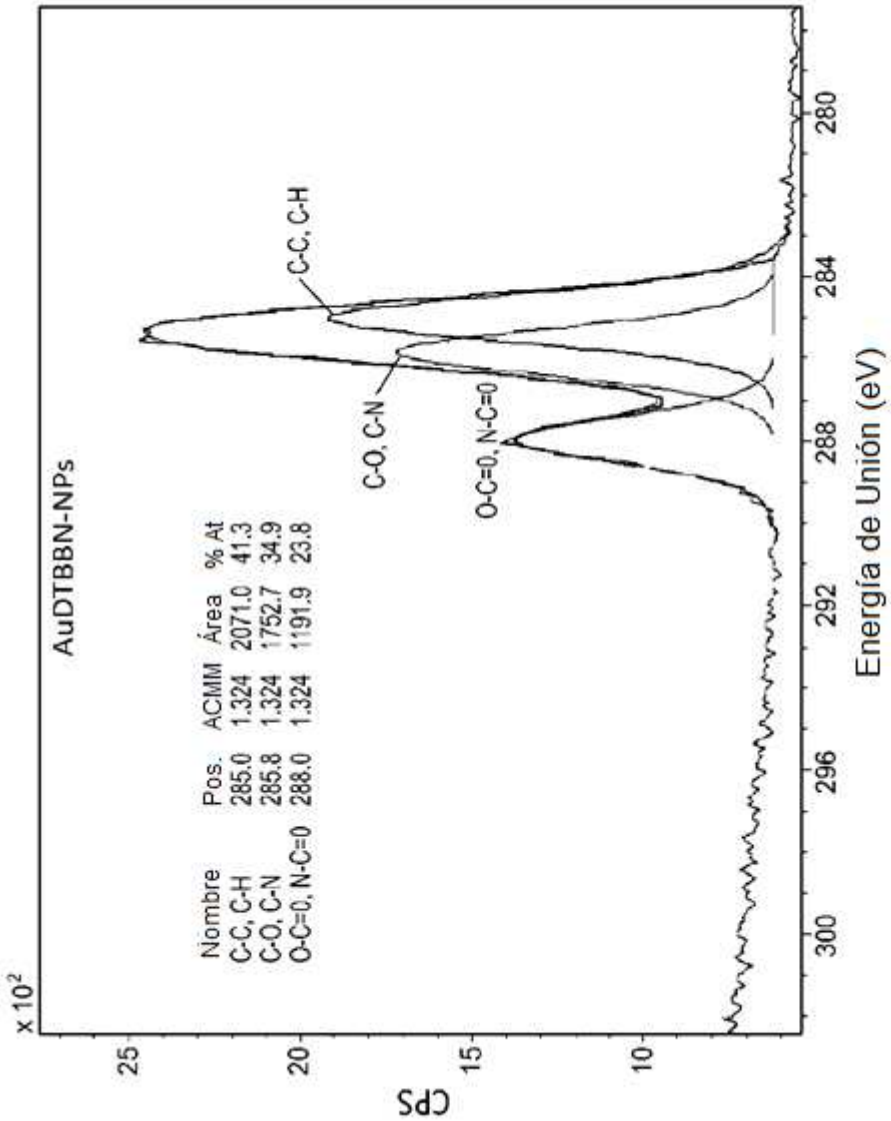
AuDTBBN-NPs
x 10²
Nombre Pos. ACMM Área % At
C-C, C-H 285.0 1.324 2071.0 41.3
C-O, C-N 285.8 1.324 1752.7 34.9
O-C=0, N-C=0 288.0 1.324 1191.9 23.8
C-C, C-H
C-O, C-N
O-C=0, N-C=0
CPS
25
20
15
10
300
296
292
288
284
280
Energía de Unión (eV)

FIG. 10B

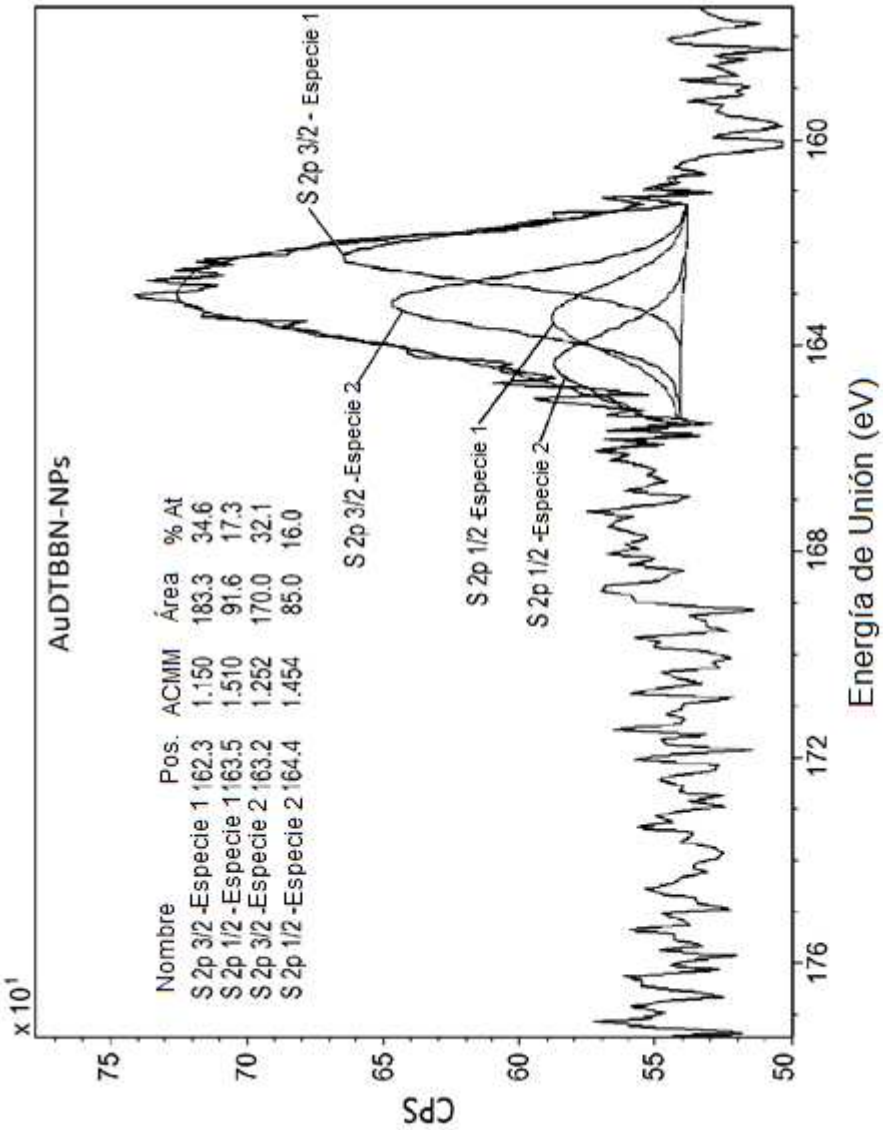
AuDTBBN-NPs
x 10¹
Nombre Pos. ACMM Área % At
S 2p 3/2 -Especie 1 162.3 1.150 183.3 34.6
S 2p 1/2 -Especie 1 163.5 1.510 91.6 17.3
S 2p 3/2 -Especie 2 163.2 1.252 170.0 32.1
S 2p 1/2 -Especie 2 164.4 1.454 85.0 16.0
S 2p 3/2 - Especie 1
S 2p 3/2 -Especie 2
S 2p 1/2 -Especie 1
S 2p 1/2 -Especie 2
CPS
75
70
65
60
55
50
176
172
168
164
160
Energía de Unión (eV)

FIG. 11A

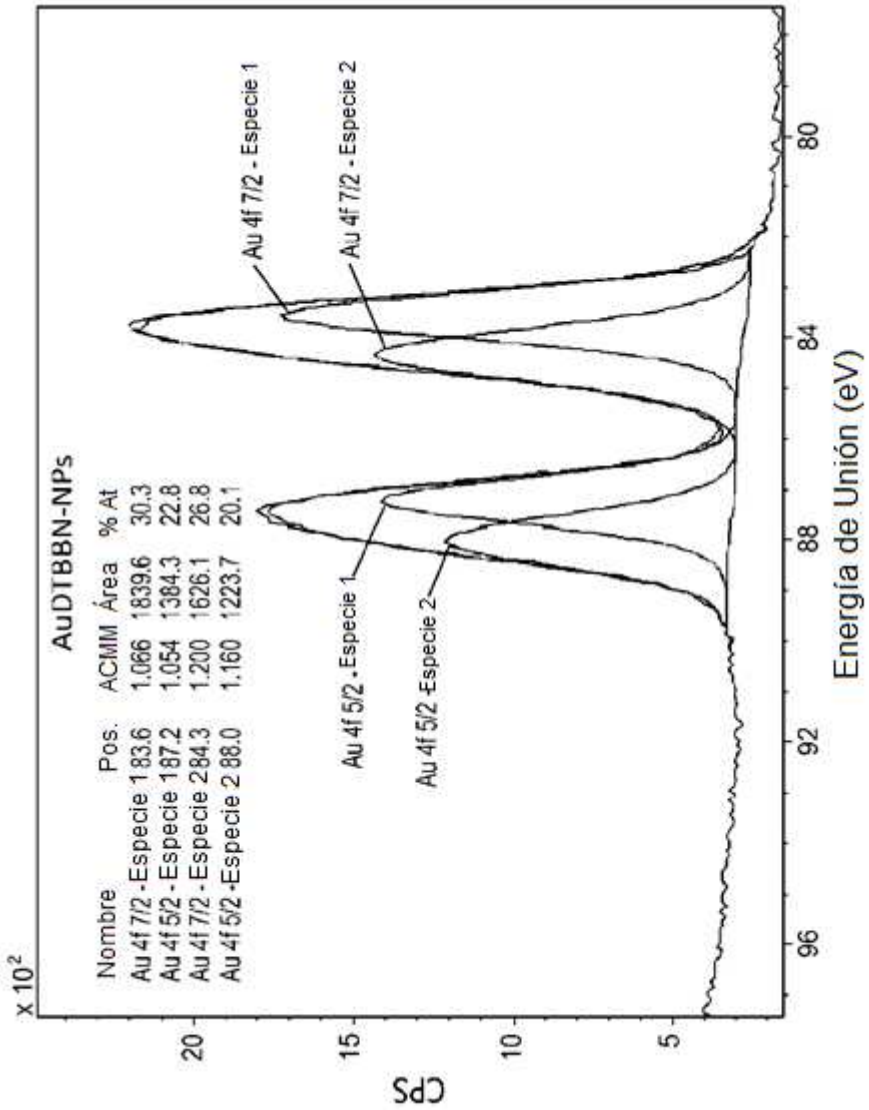
x 10²
AuDTBBN-NPs
Nombre Pos. ACMM Área % At
Au 4f 7/2 - Especie 1 83.6 1.066 1839.6 30.3
Au 4f 5/2 - Especie 1 87.2 1.054 1384.3 22.8
Au 4f 7/2 - Especie 2 84.3 1.200 1626.1 26.8
Au 4f 5/2 - Especie 2 88.0 1.160 1223.7 20.1
Au 4f 7/2 - Especie 1
Au 4f 7/2 - Especie 2
Au 4f 5/2 - Especie 1
Au 4f 5/2 -Especie 2
CPS
20
15
10
5
96
92
88
84
80
Energía de Unión (eV)

FIG. 11B

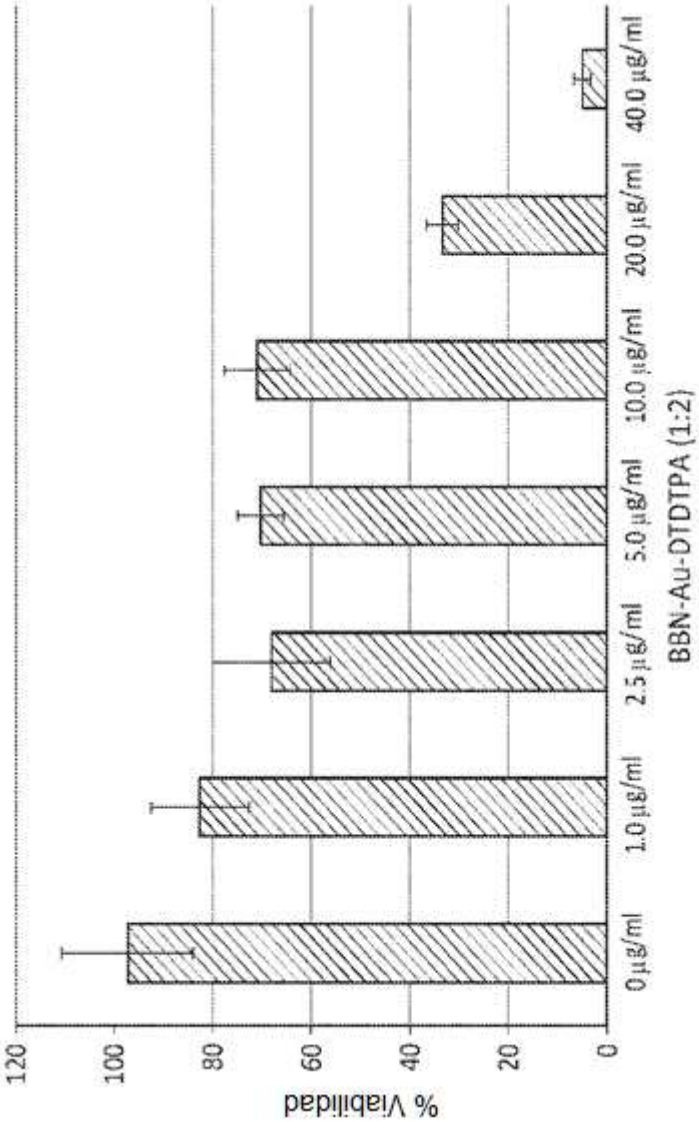
% Viabilidad
120
100
80
60
40
20
0
0 µg/ml
1.0 µg/ml
2.5 µg/ml
5.0 µg/ml
10.0 µg/ml
20.0 µg/ml
40.0 µg/ml
BBN-Au-DTDTPA (1:2)

FIG. 12