(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 346 319**

(51) Int. Cl.:
A61K 9/51 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **05026069 .4**
(96) Fecha de presentación : **16.10.2001**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1671625**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **21.06.2006**

(54) Título: **Nanopartículas.**

(30) Prioridad: **16.10.2000 GB 0025414**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.10.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.10.2010

(73) Titular/es: **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**
c/ Serrano, 113
28006 Madrid, ES
MIDATECH LIMITED

(72) Inventor/es: **Penades, Soledad;**
Rojo, Javier y
Martín-Lomas, Manuel

(74) Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a nanopartículas, y en particular a nanopartículas que tienen ligandos inmovilizados que comprenden grupos hidratos de carbono, y a su uso en el estudio de la interacción de estos ligandos con otras especies. La presente invención se refiere además a aplicaciones de las nanopartículas, por ejemplo para cribado, diagnosis y terapia.

Antecedentes de la invención

Existen tres clases importantes de biopolímeros, los ácidos nucleicos, las proteínas y los hidrato de carbono. La estructura y las interacciones de las proteínas y los ácidos nucleicos se han estudiado de manera extensiva en la técnica y el hecho de que la síntesis de las proteínas y los ácidos nucleicos se efectúe dirigida con una plantilla y que estos polímeros sean lineales ha dado lugar a que las técnicas para su producción y su estudio se hayan automatizado ampliamente.

Sin embargo, los hidratos de carbono y sus interacciones con otras especies son también de extrema importancia biológica y no han sido objeto de estudios concertados. La dificultad en el estudio de los hidratos de carbono y sus interacciones proviene de la diversidad de los enlaces de los hidratos de carbono y del hecho de que no existen técnicas análogas a la clonación para amplificar y modificar los hidratos de carbono. Por el contrario, el complejo camino de multietapas en el que se ensamblan los hidratos de carbono en las células significa que los hidratos de carbono y los glicoconjugados asociados tales como glicoproteínas y glicolípidos se caracterizan por un alto grado de variabilidad y no resulta trivial su síntesis o su estudio. Además, las interacciones mediadas por hidratos de carbono tienden a ser débiles y polivalentes y, por consiguiente, difíciles de detectar. Por tanto, no existen en la técnica herramientas satisfactorias para llevarlo a cabo.

Sin embargo, a pesar de estas características, las interacciones mediadas por hidratos de carbono son biológicamente importantes. Las superficies de muchos tipos de células están cubiertas con una densa capa de glicoconjugados que dan lugar a los denominados glicocálices. Se cree que el glicocáliz es el responsable de las fuerzas repulsivas que evitan la adhesión no específica de las células. Sin embargo, en algunas configuraciones de las células, la barrera repulsiva se encuentra contrabalanceada por la formación de contactos célula-célula a través de fuerzas atractivas [1]. Ahora existe evidencia de que, aparte de las bien conocidas interacciones de hidratos de carbono-proteína[2], las células usan las interacciones atractivas entre la superficies de los hidratos de carbono como un nuevo mecanismo para la adhesión y reconocimiento de las células[3]. Un hecho característico de estas interacciones es su baja afinidad, que está compensada mediante una presentación polivalente de ligandos y receptores en la superficie de las células[4].

Las investigaciones de las interacciones entre hidratos de carbono-proteína polivalentes se han llevado a cabo usando diferentes sistemas de modelos de hidratos de carbono multivalente[5]. Los ejemplos de aproximaciones en antecedentes de la técnica incluyen conjuntos de dos dimensiones de glicoconjugados sobre superficies de oro[6a], el uso de liposomas para desplegar los hidratos de carbono, la tecnología de dendrímeros y el uso de polímeros para proporcionar conjuntos de hidratos de carbono esféricos y lineales[5a,b]. Sin embargo, los problemas del estudio de las interacciones que implican hidratos de carbono se encuentran lejos de estar resueltos y existe en la técnica una continua necesidad de nuevos procedimientos y herramientas para llevarlo a cabo.

El documento WO 99/61911A describe partículas de tamaño nanométrico funcionalizadas que comprenden un núcleo que comprende por lo menos un metal o una aleación metálica.

Resumen de la invención

De manera amplia, la presente invención proporciona materiales y procedimientos para el estudio y la modulación de la interacción de los hidratos de carbono que contienen partes con otras especies. En particular, la presente invención proporciona partículas pequeñas, p.e., grupos de átomos de metal y opcionalmente semiconductores, que se pueden emplear como substrato para inmovilizar una diversidad de ligandos, comprendiendo estos ligandos a grupos de hidratos de carbono. Estas "nanopartículas" se pueden usar a continuación para estudiar las interacciones mediadas por hidratos de carbono, p.e., con otros hidratos de carbono o proteínas, y como reactivos terapéuticos o para diagnóstico. Por tanto, la presente invención proporciona un medio para dar lugar a un conjunto esférico del ligando inmovilizado sobre una partícula detectable. En algunas realizaciones, las partículas tienen la ventaja adicional de que son solubles, p.e., en agua y en diferentes solventes orgánicos, y se pueden usar en diversos formatos de aplicaciones homogéneas.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una nanopartícula que comprende un núcleo de átomos de metal o semiconductores unidos covalentemente a, por lo menos, 20 ligandos, donde las nanopartículas tienen dos o más especies de ligando unidas al núcleo y donde una de las especies de ligando comprende un grupo de hidratos de carbono. Los ligandos pueden comprender los grupos de hidratos de carbono solos o en combinación con péptidos, dominios de proteínas, segmentos de ácido nucleico o grupos fluorescentes.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona composiciones que comprenden poblaciones de una o más de las partículas definidas anteriormente. En algunas realizaciones, las poblaciones de nanopartículas pueden tener diferentes densidades de los mismos o diferentes ligandos unidos al núcleo.

En otro aspecto, la presente invención proporciona las partículas definidas anteriormente para su uso en un procedimiento de tratamiento químico.

En todavía otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de las partículas definidas anteriormente para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una condición que se mejora mediante la administración del ligando. A modo de ejemplo, esto puede ocurrir cuando el ligando bloquea una interacción mediada por hidratos de carbono que, de otra manera, tiende a llevar a una patología.

En esta realización, la presente invención tiene ventajas sobre las aproximaciones que existen en la técnica anterior para el tratamiento de las condiciones que implican interacciones mediadas por hidratos de carbono. Tal como se ha descrito anteriormente, de manera típica las interacciones son polivalentes mientras que el agente usado para tratar las interacciones sólo es capaz, a menudo, de modular una o unas pocas de estas interacciones. El resultado es que resulta difícil que un agente llegue al punto de la interacción que es capaz de modular fiablemente la interacción del efecto terapéutico deseado. En contraste con este problema, la presente invención proporciona agentes que tienen una diversidad de ligandos para la modulación de las interacciones mediadas por hidratos de carbono, salvando potencialmente la dificultad en la modulación de las interacciones polivalentes.

En las realizaciones preferidas, el diámetro medio del núcleo, preferiblemente el núcleo metálico, tiene entre 0,5 y 100 nm, más preferiblemente entre 1 y 50 nm, y todavía más preferiblemente entre 1 y 20 nm. El diámetro medio se puede medir usando sistemas bien conocidos en la técnica, tal como la microscopía electrónica de transmisión.

El material del núcleo puede ser un metal y opcionalmente comprende además un semiconductor, y puede estar formado por más de un tipo de átomo. Preferiblemente, el material del núcleo es un metal seleccionado entre Au, Ag o Cu. También se han descrito núcleos de nanopartículas formadas por aleaciones, incluyendo Au/Ag, Au/Cu, Au/Ag/Cu, Au/Pt, Au/Pd y Au/Ag/Cu/Pd y se pueden usar en la presente invención. Los materiales preferidos para el núcleo son Au y Ag, siendo el Au el material más preferido. Cuando se usan agregados de oro, preferiblemente tienen entre aproximadamente 100 y 500 átomos de oro para proporcionar diámetros del núcleo en el rango del nanómetro. Otros materiales del núcleo particularmente útiles son, o están recubiertos con uno o más átomos que son, activos a la RMN, permitiendo así que las nanopartículas se puedan detectar usando la RMN, tanto *in vitro* como *in vivo*. Ejemplos de átomos activos a la RMN incluyen el gadolinio y el europio.

Los núcleos de nanopartículas que comprenden átomos semiconductores se pueden detectar como cristales semiconductores a escala de nanómetro y son capaces de actuar como punto de quantun, es decir, pueden absorber luz, con lo cual se excitan electrones de los materiales a niveles de energía superiores, y consecuentemente liberan fotones de luz a frecuencias características del material. Un ejemplo de material de núcleo semiconductor es el seleniuro de cadmio.

Las nanopartículas y los resultados de sus interacciones se pueden detectar usando diferentes técnicas bien conocidas por los expertos. Estas técnicas pueden ir desde detectar la agregación que resulta cuando las nanopartículas se unen a otras especies, p.e., mediante una inspección visual simple o mediante el uso de dispersión de luz (transmitancia de una solución que contiene las nanopartículas), hasta el uso de técnicas sofisticadas tales como la microscopía electrónica de transmisión (TEM) o la microscopía de fuerza atómica (AFM) para visualizar las nanopartículas. Otro método para detectar las partículas metálicas es el empleo de resonancia plasmónica, es decir la excitación de electrones en la superficie de un metal, normalmente originada por radiación óptica. El fenómeno de la resonancia plasmónica de superficie (SPR) existe en la interfase de un metal (tal como Ag o Au) y un material dieléctrico tal como el aire o el agua. Debido a que tienen lugar cambios en la SPR cuando los analitos se unen al ligando inmovilizado sobre la superficie de una nanopartícula, se produce un cambio del índice de refracción de la interfase. Una ventaja adicional de la SPR es que se puede usar para controlar las interacciones a tiempo real. Tal como se ha mencionado anteriormente, si las nanopartículas incluyen, o están recubiertas con, átomos que son activos a la RMN, entonces esta técnica se puede usar para detectar las partículas, tanto *in vitro* como *in vivo*, usando técnicas bien conocidas por los expertos. Las nanopartículas también se pueden detectar tal como se ha descrito en [18], usando un sistema basado en una amplificación de señal cuantitativa, empleando la reducción de la plata (I) promovida por la nanopartícula y usando como lector un digitalizador de imágenes plano. Si las nanopartículas incluyen ligandos que combinan los grupos hidratos de carbono y sondas fluorescentes se puede usar la espectroscopía de fluorescencia. También se puede usar el marcado isotópico de los hidratos de carbono para facilitar su detección.

El ligando unido al núcleo comprende uno o más grupos hidratos de carbono (sacáridos), p.e., comprende un polisacárido, un oligosacárido o un único grupo sacárido. El ligando también puede ser un glicanoconjugado tal como un glicolípido o una glicoproteína. Además del grupo de los hidratos de carbono, el ligando puede comprender adicionalmente uno o más grupos peptídicos, un dominio proteína, una molécula de ácido nucleico (p.e., un segmento de DNA) y/o una sonda fluorescente.

Las partículas de la presente invención tienen más de una especie de ligando inmovilizada en las mismas, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 10, 20 ó 100 ligandos diferentes. Además, se pueden utilizar juntas una serie de diferentes tipos de partículas.

En la presente invención, el número medio de ligandos unidos a un núcleo metálico individual de la partícula es por lo menos de 20 ligandos, preferiblemente por lo menos 50 ligandos, y más preferiblemente por lo menos 100 ligandos. Las densidades preferidas de ligandos se encuentran en el rango de 70-100 ligandos por cada 200 átomos de oro, tal como se determina mediante análisis elemental.

Los ligandos se encuentran unidos covalentemente al núcleo de las partículas. Los protocolos para llevarlo a cabo resultan conocidos en la técnica, aunque el trabajo descrito en este documento es el primer informe de las reacciones que se usan para enlazar covalentemente los ligandos hidratos de carbono al núcleo de la partícula. Se puede llevar a cabo mediante la reacción con oro de ligandos con grupos terminales reductores, bajo condiciones reductoras. Un procedimiento preferido para la preparación de las partículas emplea grupos de hidratos de carbono con derivados tiol para acoplar los ligandos a las partículas. Por tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de las partículas anteriormente definidas, y el procedimiento comprende:

-- sintetizar un sulfuto derivado del ligando;

-- reacción del ligando derivatizado con sulfuro con el ácido tetracloroáurico en presencia de un agente reductor para dar lugar a las partículas.

En una realización preferida, el ligando se derivatiza en forma de un disulfuro protegido. De manera conveniente, el ligando protegido con disulfuro, en metanol, se puede añadir a una solución acuosa de ácido tetracloroáurico. Un agente reductor preferido es el hidruro de boro y sodio. Otras condiciones preferidas del procedimiento se describen en los ejemplos que siguen.

La presente invención proporciona una manera de presentar un conjunto esférico de ligandos que contienen hidratos de carbono y que presentan ventajas sobre otros tipos de conjuntos propuestos en la técnica anterior. En particular, las nanopartículas son solubles en muchos solventes orgánicos y especialmente en agua. Esta solubilidad puede ser usada en su purificación y significa, de manera importante, que se pueden usar en solución como macroconjuntos para exponer el ligando inmovilizado sobre la superficie de la partícula. El hecho de que las nanopartículas sean solubles tiene la ventaja de presentar los hidratos de carbono en una conformación natural. Para aplicaciones terapéuticas, las nanopartículas no son tóxicas, son solubles y se excretan en la orina.

En la técnica se conocen diferentes interacciones mediadas por hidratos de carbono y se pueden estudiar o modular usando las nanopartículas descritas en este documento. Estas interacciones incluyen la adhesión leucocito-célula endotelial, interacciones de hidratos de carbono-anticuerpo, hidratos de carbono-infecciones proteína bacteriana y viral, reconocimiento immunológico de células tumorales, células tumorales-células endoteliales (p.e., para estudiar metástasis) y reconocimiento de tejido y células extrañas. Los siguientes ejemplos de aplicación de las nanopartículas se proporcionan a modo de ilustración y no de limitación, como soporte de la amplia aplicabilidad de las tecnologías descritas en este documento.

En general, ha constituido un problema difícil en la técnica el detectar o modular las interacciones mediadas por hidratos de carbono debido a que la unión de los hidratos de carbono a otras especies tales como proteínas u otros hidratos de carbono es muy débil y, para modular la interacción, los agentes monovalentes sólo han tenido un éxito limitado en la supresión de las interacciones basadas en hidratos de carbono polivalentes.

En las realizaciones de la invención relacionadas con las interacciones de hidratos de carbono con hidratos de carbono, se pueden identificar dos tipos de interacciones. En las interacciones homofílicas, los hidratos de carbono idénticos interaccionan uno con otro y se pueden detectar mediante un incremento sostenido de la concentración de partículas que tienen una única especie de ligandos inmovilizados sobre la superficie hasta que tiene lugar la agregación. Ello se puede detectar mediante dispersión de la luz o mediante efectos electrónicos. Las interacciones heterofílicas se pueden detectar mezclando dos o más nanopartículas diferentes y determinando el estado de agregación de las partículas.

Por tanto, la presente invención proporciona una plataforma versátil para el estudio y modulación de las interacciones mediadas por hidratos de carbono. Por ejemplo, las partículas se pueden usar para detectar los anticuerpos antihidratos de carbono, detectando la unión de los anticuerpos a los ligandos sobre la superficie a través de la dispersión de la luz con el fin de detectar la agregación de las partículas, o los efectos de los campos eléctricos, tales como la resonancia plasmónica de superficie, que puede modificarse cuando los átomos de metal en las partículas se agregan entre sí.

En un ejemplo de este aspecto de la invención, las nanopartículas se pueden emplear para determinar los grupos de sangre, tal como se efectúa en medicina de manera normal para determinar los donantes y receptores compatibles en una transfusión de sangre. Los grupos de la sangre son debidos a que las bacterias comunes en el intestino tienen antígenos de hidratos de carbono que son similares o idénticos a los antígenos de los grupos de la sangre presentes sobre la superficie de las células rojas de la sangre, y estos antígenos bacterianos estimulan la producción de anticuerpos en individuos que no llevan los correspondientes antígenos en sus propias células rojas de la sangre. Por tanto, el suero de un individuo se analiza para los anticuerpos que aglutinan las células rojas de la sangre del donante y viceversa, en un ensayo cruzado para detectar los anticuerpos potencialmente perjudiciales en el receptor. En la actualidad, la

determinación del grupo de la sangre se lleva a cabo usando estos ensayos de aglutinación que son inconvenientes y no fácilmente susceptibles de automatización o de realización en gran número de muestras.

Los antígenos del grupo de la sangre son hidratos de carbono, p.e., para el antígeno común:

Tipo 0	R-GlcNAc-Gal(Fuc)
Tipo A	R-GlcNAc-Gal(Fuc)-GaINAc
Tipo B	R-GlcNAc-Gal(Fuc)-GaI
Tipo AB	Antígenos Tipo A y Tipo B

Por tanto, se pueden preparar poblaciones de nanopartículas que tengan los antígenos de los grupos de la sangre inmovilizados sobre su superficie. Así, si una muestra contiene suero capaz de unirse al antígeno del grupo de la sangre y, a continuación, se añaden las nanopartículas a una muestra de un paciente es posible determinar el tipo de sangre de los donantes y los receptores.

Otra aplicación de las nanopartículas es modular la inflamación. En particular, miembros de la familia de las selectinas participan en la unión inicial de las células blancas de la sangre (leucocitos) a las células endoteliales durante el proceso del reclutamiento de leucocitos en el tejido inflamado. La L-selectina se expresa sobre los leucocitos, la P-selectina sobre las plaquetas y la E-selectina sobre las células endoteliales. La E-selectina y la P-selectina se inducen sobre las células endoteliales en respuesta a las citoquinas pro-inflamatorias y se unen a los receptores ELAM sobre la superficie de las células endoteliales. La L-selectina se expresa constitutivamente sobre los leucocitos circulantes y se une a las glicoproteínas expresadas únicamente sobre el endotelio activado. Por consiguiente, todas estas interacciones se podrían emplear como objetivos terapéuticos para modular la inflamación y, en particular, para reducir la inflamación aberrante.

Las aproximaciones que existen en la técnica en el empleo de selectinas como objetivos terapéuticos se basan en el hecho de que las selectinas comparten un dominio común de las lectinas que es calcio dependiente y que puede ser el objetivo de los ligandos basados en hidratos de carbono. En una revisión de la técnica se ha encontrado que las tres selectinas se unen al tetrasacárido sialilado y fucosilado sialil Lewis X (sLe^x) y que esta molécula y sus análogos se pueden unir a la selectina, aunque de manera débil. Las aproximaciones anteriores de la técnica tienen el problema de que la interacción entre sLe^x y la selectina es débil y que la interacción de las células que expresan la selectina es polivalente. De acuerdo con ello, en uno de estos aspectos, la presente invención propone un tratamiento de la inflamación usando nanopartículas que tienen uno o más ligandos de selectina inmovilizados sobre las mismas. En la referencia[5b] se proporciona una discusión de la inflamación mediada por selectina y de los compuestos que se pueden usar para modular la interacción.

En un aspecto adicional, las nanopartículas en las que el grupo de los hidratos de carbono (sacárido) es un antígeno se pueden administrar como una vacuna, p.e., balísticamente, usando una escopeta para la administración con el fin de acelerar su paso transdérmico a través de la parte más externa de la epidermis. Las nanopartículas pueden, a continuación, ser absorbidas, p.e., por las células dendríticas, que maduran al tiempo que migran a través del sistema linfático, dando lugar a una modulación de la respuesta inmune y de la vacunación contra el antígeno sacárido, tal como se describe en [19].

En una aplicación adicional, se sabe que los hidratos de carbono de la superficie de la célula actúan como ligandos en los receptores virales o bacterianos (llamados adhesinas) y que la unión de los hidratos de carbono a los receptores es un hecho necesario durante la infección. Los hidratos de carbono sintéticos, p.e., los gliconjugados, que son capaces de modular estas interacciones, se pueden inmovilizar en las nanopartículas de la invención y se pueden usar como reactivos para estudiar estas interacciones y como agentes terapéuticos para evitar la infección por virus o bacterias.

Un ejemplo de una infección bacteriana mediada por un ligando hidrato de carbono es el *Helicobacter pylori* que ocasiona gastritis crónica activa, úlceras gástricas y duodenales, adenocarcinoma gástrico y linfoma del tejido linfoide asociado a la mucosa en humanos. Puesto que la unión específica del *H. pylori* a la célula puede ocurrir a través de múltiples hidratos de carbono, incluyendo el antígeno Lewis b, los oligosacáridos sialilados, las glicoproteinas de mucina sulfatadas y las nanopartículas capaces de modular (es decir, bloquear) las diferentes interacciones de la adhesina se pueden usar como tratamiento de las anteriores condiciones.

Los ejemplos de infecciones virales mediadas por hidratos de carbono incluyen el virus de la gripe que afecta las células a través de enlace multivalente de las moléculas de hemaglutinina de la envoltura viral a los glicoconjugados del huésped terminados en ácido siálico. Por tanto, la infección se puede inhibir mediante la interrupción de este hecho.

El HIV-1 también infecta las células por reconocimiento de las estructuras de los hidratos de carbono de la superficie de la célula y el glicolípido galactosilceramida (GalCer) se ha identificado como un ligando del receptor gp120 del

HIV-1. Por tanto, el GalCer, o análogos del mismo, se podrían inmovilizar sobre la superficie de las nanopartículas y utilizarse para inhibir la interacción del GalCer celular y el HIV-1.

En otra aplicación, la presente invención puede ser útil en la modulación de la respuesta inmune, p.e., después de un trasplante. Cuando se inicia el reconocimiento inmunológico del tejido con las interacciones mediadas con hidratos de carbono entre los hidratos de carbono de superficie presentes en el tejido trasplantado y los componentes del sistema inmune del huésped tales como los anticuerpos, todo ello puede ser el objetivo para mejorar las reacciones inmunes que resultan de esta interacción. A modo de ejemplo, el hidrato de carbono Galα1-3Galβ1-4GlnAc (el epitope "αGal") se ha implicado como un epítopo antigénico importante implicado en el rechazo del tejido trasplantado. Por tanto, la modulación de la interacción del epitopo αGal y el sistema inmune puede ser un objetivo terapéutico para las nanopartículas descritas en este documento.

Una aproximación alternativa puede resultar útil en el tratamiento del cáncer ya que los antígenos asociados a muchos tumores o factores autocrinos tumorales se basan en hidratos de carbono. En este caso, las nanopartículas se podrían proporcionar como vacunas que inician el sistema inmune para producir anticuerpos que son capaces de atacar las células tumorales que presentan los hidratos de carbono en su superficie. En este sentido, se sabe que muchas células tumorales poseen secuencias de glicosilación aberrantes que pueden facilitar la respuesta inmune estimulada por las nanopartículas al estar dirigidas específicamente a las células tumorales como opuestas a las células normales sanas. Las nanopartículas también se pueden usar para inhibir metástasis en cáncer, p.e., mediante la migración de las células tumorales a través de las células endoteliales.

En un aspecto adicional, las nanopartículas se pueden usar como soporte para incorporar los anticuerpos capaces de unirse específicamente al ligando. Esto resulta particularmente ventajoso ya que puede ser un desafío en la técnica para conducir los anticuerpos contra las partes que contienen hidratos de carbono ya que, a menudo, son pequeñas y no dan lugar a respuestas inmunes fuertes.

En todavía otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para determinar cuándo tienen lugar interacciones mediadas por hidratos de carbono, y el procedimiento comprende la puesta en contacto de una o más especies de nanopartículas con un candidato a la unión y la subsiguiente determinación de si tiene lugar dicha unión.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de análisis de substancias capaces de unirse a un ligando que comprende un grupo hidrato de carbono, y el procedimiento comprende:

-- contacto de las partículas que comprenden un núcleo metálico unido a muchos de los ligandos con uno o más compuestos candidatos;

-- detección de si los compuestos candidatos se unen a los ligandos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para determinar la presencia en una muestra de una substancia capaz de unirse a un ligando que comprende un ligando de hidrato de carbono, el procedimiento comprende el contacto de la muestra con las nanopartículas unidas al ligando y la determinación de si la unión tiene lugar. El procedimiento se puede usar para determinar la presencia o cantidad de uno o más analitos en una muestra, p.e., para su uso en el diagnóstico de una enfermedad asociada con la presencia de un analito.

En una realización adicional, las nanopartículas se pueden usar para el estudio o detección de interacciones mediadas por hidratos de carbono en conjunción con especies inmovilizadas sobre la superficie de sólidos, por ejemplo, ligandos inmovilizados sobre superficies de oro tal como se describe en [6a]. Estas especies pueden ser otros hidratos de carbono, especies candidatas a la unión o analitos.

En otro aspecto, los hidratos de carbono se pueden unir a nanocristales de seleniuro de cadmio para proporcionar puntos cuánticos que, a continuación, se pueden guiar hasta la estructura celular requerida por las nanopartículas. Tal como se discute en [20], los puntos cuánticos tienen usos potenciales en imágenes biológicas, tanto en dispositivos electrónicos como eléctricos, computadores cuánticos y análisis de medicamentos candidatos.

Las realizaciones de la presente invención se describen a continuación a modo de ejemplo no limitante con referencia a las figuras que se acompañan.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra esquemáticamente el procedimiento usado para la síntesis de las nanopartículas.

La Figura 2 muestra las micrografías electrónicas de transmisión y los histogramas (insertados) de distribución del tamaño del núcleo de las gliconanopartículas de lacto 2-Au (arriba) y de Le^x3-Au (abajo).

La Figura 3 muestra los espectros de ^{1}H RMN de: (A) 2-Au en D_2O (a); 2 en D_2O (b) y 2 en CD_3OD (c) y (B) 3-Au en D_2O (a); 3 en D_2O (b) y 3 en 70% CD_3OD/D_2O (c).

Descripción detallada

Composiciones Farmacéuticas

Las nanopartículas descritas en este documento o sus derivados se pueden formular en composiciones farmacéuticas y administrar a pacientes en una gran variedad de formas, en particular para tratar las condiciones que pueden mejoran mediante la administración del ligando. A modo de ejemplo, ésto puede ocurrir debido a que el ligando bloquea una interacción mediada por un hidrato de carbono que, de otra manera, llevaría a una patología. Por tanto, las nanopartículas se pueden usar como medicamento para la modulación de la adhesión entre leucocito-célula endotelial, las interacciones entre hidratos de carbono-anticuerpo, hidratos de carbono-infección proteína bacteriana y viral, reconocimiento inmunológico de las células tumorales, inhibición de la metástasis y reconocimiento de tejidos y células extrañas.

Las composiciones farmacéuticas para la administración oral pueden estar en forma de pastilla, cápsula, polvo o líquido. Una pastilla puede incluir un soporte sólido tal como gelatina o un adyuvante o un diluyente inerte. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente incluyen un soporte líquido tal como agua, petróleo, aceite animal o vegetal, aceite mineral o aceite sintético. También se puede incluir una solución salina fisiológica, o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Dichas composiciones y preparaciones generalmente contienen por lo menos 0,1% en peso del compuesto.

La administración parenteral incluye la administración por las siguientes rutas: intravenosa, cutánea o subcutánea, nasal, intramuscular, intraocular, transepitelial, intraperitoneal y tópica (incluyendo dérmica, ocular, rectal, nasal, inhalación y aerosol), y rutas sistémicas rectales. Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o la inyección en el punto de la aflicción, el ingrediente activo estará en la forma de una solución acuosa aceptable parenteralmente, que significa libre de pirógenos y que tenga un pH adecuado, e isotonicidad y estabilidad. Aquellas personas expertas en la técnica serán capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, soluciones de los compuestos o de un derivado de los mismos, p.e., en una solución fisiológica salina, una dispersión preparada con glicerina, polietilen glicol líquido o aceites.

Además de uno o más de los compuestos, opcionalmente en combinación con otros ingredientes activos, las composiciones pueden comprender uno o más excipientes, soporte, medio tamponante, estabilizante, agente isotónico, conservante o antioxidante u otros materiales farmacéuticamente aceptables y que resultan bien conocidos por los expertos en la técnica. Dichos materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza precisa del soporte o de otro material puede depender de la ruta de administración, p.e., oral o parenteralmente.

Las composiciones farmacéuticas líquidas se formulan de manera típica para que tengan un pH entre aproximadamente 3,0 y 9,0, más preferiblemente entre aproximadamente 4,5 y 8,5, y todavía más preferiblemente entre aproximadamente 5,0 y 8,0. El pH de una composición se puede mantener mediante el uso de un medio tamponante tal como acetato, citrato, fosfato, succinato, Tris o histidina, empleados típicamente en el margen entre aproximadamente 1 mM a 50 mM. Por otra parte, el pH de las composiciones se puede ajustar usando ácidos o bases fisiológicamente aceptables.

En las composiciones farmacéuticas generalmente se incluyen conservantes para retardar el crecimiento microbiano, aumentando así la vida de las composiciones y permitiendo el empaquetado de múltiples usos. Los ejemplos de conservantes incluyen fenol, metacresol, alcohol bencílico, ácido parahidroxibenzoico y sus ésteres, paraben de metilo, paraben de propilo, cloruro de benzalconio y cloruro de benzetonio. Los conservantes se emplean típicamente en el margen de aproximadamente 0,1 a 1,0% (peso/volumen).

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se administran a un sujeto individual "en una cantidad profilácticamente efectiva" o "en una cantidad terapéuticamente efectiva" (según sea el caso, aunque la profilaxis puede ser considerada terapia), y que sea suficiente para demostrar beneficio al individuo. Típicamente, significa que dé lugar a una actividad útil terapéuticamente proporcionando un beneficio al individuo. La cantidad real de los compuestos que se administra, y la velocidad y tiempo de administración, dependerá de la naturaleza y severidad de la condición a tratar. La prescripción del tratamiento, p.e., las decisiones sobre la dosificación, etc, queda dentro de la responsabilidad de los médicos en general, y de manera típica tiene en cuenta el desorden que se debe tratar, la condición del paciente particular, el sitio de la liberación, el procedimiento de administración y otros factores conocidos por los médicos. Se pueden encontrar ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. (ed), 1980. A modo de ejemplo, las composiciones se administran preferiblemente a los pacientes en dosis entre aproximadamente 0,01 y 100 mg de compuesto activo por kg de peso corporal, y más preferiblemente entre aproximadamente 0,5 y 10 mg/kg de peso corporal.

Anticuerpos

Las nanopartículas se pueden usar como soportes para promover las respuestas de los anticuerpos contra los ligandos unidos a las partículas del núcleo que contienen hidratos de carbono. Estos anticuerpos se pueden modificar usando metodologías que resultan normales en la técnica. Los anticuerpos similares a los que se ejemplifican por primera vez en este documento también se pueden preparar utilizando lo que aquí se describe conjuntamente con los

procedimientos conocidos. Estos procedimientos de preparación de anticuerpos incluyen el inmunizar a un mamífero (p.e., ratón, rata, conejo, caballo, cabra, cordero o mono) con la(s) nanopartícula(s). Los anticuerpos se pueden obtener de los animales inmunizados usando una cualquiera de las diferentes metodologías conocidas en la técnica y se analizan preferiblemente usando la unión del anticuerpo al antígeno de interés. El aislamiento de los anticuerpos y/o de las células que producen los anticuerpos a partir de un animal puede estar acompañado de una etapa de sacrificio del animal.

Como una alternativa o suplemento a la inmunización de un animal con una nanopartícula, se puede obtener un anticuerpo específico para el ligando y/o la nanopartícula a partir de una biblioteca producida de manera recombinatoria de dominios variables de inmunoglobulinas expresadas, p.e., usando bacteriófagos lambda o bacteriófagos filamentosos que contienen en su superficie dominios de unión de inmunoglobulinas funcionales; por ejemplo, ver la patente WO92/01047. La biblioteca puede ser ingenua, es decir, construida a partir de secuencias obtenidas de un organismo que no se ha inmunizado con ninguna de las nanopartículas, o puede ser una que se ha construida usando secuencias obtenidas a partir de un organismo que se ha expuesto al antígeno de interés.

El término "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en este documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos substancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos independientemente de las posibles mutaciones que tienen lugar de manera natural y que pueden estar presentes en pequeña cantidad. Los anticuerpos monoclonales se pueden producir mediante el procedimiento descrito por primera vez por Kohler and Milstein, Nature, 256:495, 1975 o se pueden preparar mediante procedimientos recombinantes, ver Cabily *et al*., patente U.S. nº 4816567, o Mage y Lamoyl en Técnicas y Aplicaciones de la Producción de Anticuerpos Monoclonales, páginas 79-97, Marcel Dekker Inc., Nueva York, 1987.

En el procedimiento del hibridoma, se inmuniza un ratón u otro animal huésped apropiado con el antígeno por ruta subcutánea, intraperitoneal o intramuscular para evitar los linfocitos que producen, o son capaces de producir, anticuerpos que se unirán específicamente a las nanopartículas usadas para la inmunización. Alternativamente, se puede inmunizar los linfocitos *in vitro*. A continuación, los linfocitos se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma, ver Goding, Anticuerpos Monoclonales: Principios y Práctica, p. 59-103 (Academic Press, 1986).

Las células de hibridoma así preparadas se pueden sembrar y crecer en un medio de cultivo apropiado que contiene preferiblemente una o más substancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma parental no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parental no contienen el enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá de manera típica hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), substancias que evitan el crecimiento de las células deficientes en HGPRT.

Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, mantienen un alto nivel estable de expresión del anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como medio HAT.

El medio de cultivo en el que se hace crecer las células de hibridoma se ensaya para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra las nanopartículas/ligandos. Preferiblemente, la especificidad de unión se determina mediante un ensayo de inmunoabsorbancia unida a una enzima (ELISA). Los anticuerpos monoclonales de la invención son aquellos que se unen específicamente a las nanopartículas/ligandos.

En una realización preferida de la invención, el anticuerpo monoclonal tendrá una afinidad que es mayor que micromolar o una afinidad mayor (es decir, una afinidad mayor de 10^{-6} molar) tal como se determina, por ejemplo, por análisis de Scatchard, ver Munson y Pollard, Anal. Biochem., 107: 220, 1980.

Una vez se ha identificado las células de hibridoma que producen los anticuerpos neutralizantes de la especificidad y afinidad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y hacer crecer mediante procedimientos stándard. Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen el medio de Eagle modificado de Dulbecco o medio RPM1-1640. Además, las células de hibridoma pueden crecer *in vivo* como tumores ascitis en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, del fluido ascítico o del suero por procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, protein A-Sepharosa, cromatogradia de hidroxilapatita, electroforesis de gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

El ácido nucleico que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se aísla y se secuencia fácilmente usando procedimientos bien conocidos en la técnica, p.e., usando sondas de oligonucleótido que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos murinos. Las células de hibridoma de la invención son una fuente preferida del ácido nucleico que codifica los anticuerpos o fragmentos del mismo. Una vez aislado, el ácido nucleico se liga a vectores de expresión o de clonación, que a continuación se transfectan a células huésped, que se pueden cultivar de manera que los anticuerpos monoclonales se producen en el cultivo de las células huésped recombinantes.

Los hibridomas capaces de producir anticuerpos con las características de unión deseadas quedan dentro del alcance de la presente invención, ya que son células huésped que contienen ácido nucleico que codifica los anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpo) y son capaces de su expresión. La invención también proporciona procedimientos de producción de los anticuerpos incluyendo el crecimiento de una célula capaz de producir el anticuerpo bajo condiciones en las que el mismo se produce, y preferiblemente se excreta.

Los anticuerpos según la presente invención se pueden modificar de diferentes maneras. En realidad el término "anticuerpo" debe interpretarse incluyendo cualquier substancia de unión que tenga un dominio de unión con la especificidad requerida. Por tanto, la invención cubre los fragmentos de anticuerpo, los derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos, incluyendo moléculas sintéticas y moléculas cuya forma mimetice la de un anticuerpo permitiendo que se una a un antígeno o epítopo, en este caso un ligando de hidratos de carbono tal como se ha definido en este documento.

Ejemplos de fragmentos de anticuerpo, capaces de unión a un antígeno u otra pareja de unión, son el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CI y CH1; el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo; el fragmento dAb que consiste en un dominio VH; las regiones CDR aisladas y los fragmentos $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab unidos a un puente disulfuro en la región de anclaje. También están incluidos los fragmentos Fv de cadena única.

Un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal según la presente invención se puede someter a mutación genética u otros cambios. También se entenderá por parte de los expertos en la técnica que un anticuerpo monoclonal se puede someter a las técnicas de la tecnología de ADN recombinante para dar lugar a otros anticuerpos, anticuerpos humanizados o moléculas quiméricas que retienen la especificidad del anticuerpo original. Dichas técnicas pueden implicar la introducción de ADN que codifique la región variable de inmunoglobulina, o las regiones determinantes de complementariedad (CDRs), de un anticuerpo a las regiones constantes, o las regiones constantes más las regiones marco de una inmunoglobulina diferente. Ver, por ejemplo, las patentes EP 0 184 187A, GB 2 188 638A o EP 0 239 400A. La clonación y expresión de los anticuerpos quiméricos se describe en las patentes EP 0 120 694A y EP 0 125 023A.

Experimental

Como estrategia para el diseño de superficies de hidratos de carbono polivalentes para investigar el reconocimiento de hidratos de carbono a hidratos de carbono en solución, se ha usado una aproximación por la cual los hidratos de carbono se unen a nanopartículas de oro[7]. A modo de ejemplo, se describe a continuación la preparación, caracterización y estudios de interacción preliminar de una monocapa funcionalizada de azúcar y nanoagregados de oro solubles en agua. Se han preparado neoglicoconjugados derivatizados de tiol de dos oligosacáridos significantes biológicamente, el disacárido lactosa (Galβ(1→4) Glcβ1-OR) 1 y 2 y el antígeno Le^x del trisacárido:

(Galβ(1-4)[Fucα(1-3)]GlcNAcβ1-OR) 3

para unirlos a las nanopartículas de oro. El trisacárido Le^x y el disacárido lactosa construyen el antígeno del glicoesfingolípido (GSL)Le^x:

(Galβ1-4[Fucl3]GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-Ocer)

que se ha propuesto para mediar la compactación de la mórula y la metástasis en células sanas y de carcinoma de ratón, respectivamente, a través de una interacción de hidrato de carbono a hidrato de carbono homotípica[8].

Las gliconanopartículas *lacto y* Le^x protegidas proporcionan una superficie similar a glicocalix con una matriz sintética químicamente bien definida y de forma globular. Además, esta aproximación abre el camino para preparar gliconanopartículas que contienen diversos ligandos de hidrato de carbono así como diferentes densidades de superficie que proporcionan un modelo bajo control para estudios estructura-función y para investigar la agregación de hidratos de carbono[9] y los efectos de la orientación en una superficie[10]. Las nanopartículas funcionalizadas de *lacto y* Le^x serán nuestro sistema de modelo polivalente para imitar la agregación GSL en la membrana de plasma[11] y para investigar en solución las fuerzas de atracción y repulsión implicadas en la agregación de las células a través de las interacciones de hidratos de carbono a hidratos de carbono. Estudios previos utilizando receptores sintéticos han proporcionado la primera evidencia sólida de que en el agua existen interacciones estabilizantes entre superficies de hidratos de carbono lipofílicas[12].

La síntesis de los disulfuros 1, 2 y 3 se ha llevado a cabo mediante glicosidación del derivado de lactosa y Le^x convenientemente protegido con 11-tioacetato undecanol (para el 2 y 3) usando el procedimiento de tricloroacetimidato, ver la Figura 1[13]. Los compuestos 1, 2 y 3 se aislaron en forma de disulfuro y se usaron en esta forma para la formación de las gliconanopartículas protegidas con oro. Las gliconanopartículas 1-Au, 2-Au y 3-Au solubles en

agua se han obtenido en metanol siguiendo el procedimiento de Brust *et al*., para la síntesis de los nanoagregados de oro protegidos con monocapa[7a]. Una serie de nanopartículas protegidas con oro, todas ellas solubles en solventes orgánicos, se han preparado recientemente con diferentes propósitos[14]. Las gliconanopartículas de lacto-Au y Le^x-Au son solubles en agua, son estables y se pueden manipular como macromoléculas biológicas solubles en agua. Se han purificado mediante diálisis y se han caracterizado mediante ^{1}H-RMN, UV y microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Síntesis de gliconanopartículas: Una solución de disulfuro 1, 2 o 3 (0,012 M, 5,5 eq) en MeOH se añade a una solución de ácido tetracloroáurico (0,025 M, 1 eq) en agua. Se añade $NaBH_4$ (1 M, 22 eq) en agua, en pequeñas porciones y con agitación rápida. La suspensión negra que se forma se agita durante otras 2 horas y a continuación se elimina el solvente con vacío. El crudo de la reacción se lava con MeOH y se centrifuga durante 10 minutos. Se elimina el metanol y se repite el proceso varias veces hasta que no se detecta el producto de partida por CCF. Las gliconanopartículas son completamente insolubles en metanol pero bastante solubles en agua. Se purifican por diálisis: 50 mg de producto crudo se disuelve en 10 ml de agua (NANOpura). Esta solución se carga en segmentos de 10 cm de membrana de diálisis de ester de celulosa (SIGMA, MWCO=12400) y se colocan en 4 l de agua (NANOpura). La solución oscura de gliconanopartículas se recoge de los segmentos de diálisis y se liofiliza. Los productos obtenidos están libres de sales y de producto de partida (ausencia de señales debidas al disulfuro y Na^+ en RMN).

Se lleva a cabo un examen de las muestras mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) con microscopio Philips CM200 que trabaja a 200 kV. Se coloca una única gota de solución acuosa 0,1 mg/ml de las gliconanopartículas de oro en una rejilla de cobre recubierta con una película de carbono. La rejilla se deja secar al aire durante varias horas a temperatura ambiente. Se evalúa la distribución del tamaño de partícula de los agregados de Au a partir de varias micrografías usando un analizador de imágenes automático. El número de partículas seleccionadas para su consideración es de aproximadamente 400, que da lugar a una estadística de distribución de tamaño estable.

La Figura 2 muestra las imágenes de TEM y los histogramas de distribución de tamaño de núcleo para las gliconanopartículas de oro 2-Au y 3-Au. Las partículas de oro estabilizadas con la lactosa muestran una distribución de tamaño de partícula más homogénea y más estrecha que las partículas estabilizadas con el conjugado Le^x. En ambas muestras se ha encontrado un diámetro medio de 1,8 nm para el núcleo de oro de las nanopartículas funcionalizadas. Dicho tamaño de partícula promedio corresponde, según el trabajo previo[15], a un número promedio de átomos de oro por partícula de aproximadamente 200, y 70 glicoconjugados protegidos con alcanotiolato. Las soluciones acuosas de las nanopartículas son estables durante meses y no se detecta aglomeración mediante TEM.

A continuación se investigó la presentación de las moléculas de hidratos de carbono en la superficie de las nanopartículas. Las propiedades moleculares de los neoglicoconjugados 1, 2 y 3 sufren un cambio diferencial después de su unión a la superficie del oro. Por ejemplo, el lacto derivado 2, que es soluble en metanol e insoluble en agua, da lugar a gliconanopartículas 2-Au insolubles en metanol pero con buena solubilidad en agua. El derivado Le^x 3 es soluble en metanol y en agua, sin embargo, su nanopartícula 3-Au es insoluble en metanol y muy soluble en agua. Estas diferencias en solubilidad se pueden usar para purificar las gliconanopartículas de los disulfuros no reaccionados mediante lavado con metanol. Sin embargo, el hecho más significativo en estos cambios es que revelan la influencia de la agregación en la superficie sobre la presentación de los hidratos de carbono respecto a los alrededores.

Los espectros de ^{1}H-RMN de las gliconanopartículas muestran claramente estas diferencias (Figura 3). Los espectros de las lactonanopartículas 1-Au y 2-Au en D_2O difieren fuertemente de los espectros de los lacto-disulfuros 1 y 2 (Figura 3A, espectro de 1, no mostrado) viéndose el ensanchamiento de la línea de las macromoléculas de lenta rotación en solución. La señal de los metilenos más próximos a la interfase tiolato/Au desaparece completamente, ya que tiene lugar en los nanoagregados de oro protegidos con una monocapa de alcanotiol. En contraste, estas diferencias no se encuentran en el caso de las nanopartículas de 3-Au. Los espectros de ^{1}H-RMN en D_2O de 3 y de 3-Au muestran un ensanchamiento similar para todas las señales (Figura 3B, a, b), indicando una agregación intramolecular ya presente en el disulfuro de Le^x 3. Esta autointeracción persiste incluso en una solución de agua altamente diluida y desaparece por adición de cantidades crecientes de CD_3OD a la solución en D_2O de 3. Algunas señales bien resueltas aparecen en solución de CD_3OD/D_2O (1:1), y en una solución al 70% de CD_3OD/D_2O todas las señales están bien resueltas en el espectro (Figura 3B, c). La tendencia del disulfuro de Le^x 3 a la autoagregación en agua no se puede atribuir exclusivamente a la hidrofobicidad de la cadena alifática, sino más bien a la participación específica de los grupos hidratos de carbono en esta agregación, tal como pone de manifiesto la falta de agregación en agua que se observa en el espectro de ^{1}H-RMN de los lactodisulfuros 1 y 2 (Figura 3A). La capacidad de autoagregación tendrá consecuencias en la organización y agregación de los GSLs que contienen Le^x, tal como se ha reivindicado por parte de algunos autores[16] y contrariamente a la propuesta de otros de que el grupo de hidrato de carbono de cabeza juega un papel insignificante en la formación de microdominios enriquecidos en glicolípidos en la membrana del plasma[17].

El hacinamiento estérico de los hidratos de carbono en las superficies de las nanopartículas también se comprueba mediante el diferente comportamiento de 1 y 2 y sus correspondientes nanoagregados 1-Au y 2-Au con β-glucosidasas. La β-galactosida de la *E. coli* procesa a 1 y 2 a un nivel comparable a la propia lactosa (5-10% en relación a la actividad específica de GONP), mientras que la hidrólisis por la enzima, bajo las mismas condiciones, de las nanopartículas de 1-Au y 2-Au se detecta escasamente (< 3% en relación a la actividad enzimática con los ligandos 1 y 2 libres).

Estos experimentos demuestran que es posible usar nanopartículas para preparar modelos diseñados de hidratos de carbono globulares que imiten los agregados GSL en la membrana del plasma, permitiendo por primera vez llevar a

cabo investigaciones en solución de un nuevo mecanismo de adhesión celular a través de las interacciones de hidratos de carbono con hidratos de carbono. La aproximación de gliconanopartícula descrita en este documento proporciona una estrategia para preparar, en un único camino, una gran variedad de conjuntos de hidratos de carbono globulares que pueden competir de manera ventajosa con otras disposiciones de hidratos de carbono esféricos (dendrímeros, liposomas) o lineales. Las nanopartículas de *lacto-* y *Le*^{x} se pueden considerar modelos apropiados para intervenir en los procedimientos de adhesión célula-célula y de reconocimiento.

Referencias

Todas las referencias que se mencionan en este documento se han incorporado expresamente como referencia.

[1] a) G. I. **Bell**, M. **Dembo**, P. **Bongrand**, *Biophys. J.* 1984, 45, 1051-1064; b) A. **Frey**, K.T. **Giannasca**, R. **Weltzin**, P. J. **Giannasca**, H. **Reggio**, W. I. **Lencer**, M. R. **Neutra**, *J. Exp. Med.* 1996, 184, 1045-1059.

[2] W. I. **Weis**, K. **Drickamer**, *Annu. Rev. Biochem.* 1996, 65, 441-73.

[3] a) S. **Hakomori**, *Pure & Appl. Chem.* 1991, 63, 473-482; b) G. N. **Misevic**, *Microsc. Res. Tech.* 1999, 44, 304-309 and references therein.

[4] M. **Mammen**, S. **Choi**, G. M. **Whitesides**, *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998, 37, 2754-2794.

[5] a) L. **Kiessling**, N. L. **Pohl**, *Chemistry & Biology* 1996, 3, 71-77; b) K. J. **Yarema**, C.R. **Bertozzi**, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1998, 2, 62-66; c) P. I. **Kitov**, J. M. **Sadowska**, G. **Mulvey**, G. D. **Armstrong**, H. **Ling**, N. S. **Pannus**, R. J. **Read**, D. R. **Bundle**, *Nature* 2000, 403, 669-672.

[6] a) B. T. **Houseman**, M. **Mrksich**, *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, 38, 782-785; b) N. **Horan**, L. **Yan**, H. **Isobe**, G. M. **Whitesides**, D. **Kahne**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 11782-11786.

[7] a) M. **Brust**, J. **Fink**, D. **Bethell**, D. J. **Schiffrin**, C. **Kiely**, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1995, 1655-1656; b) A. C. **Templeton**, W. P. **Wuelting**, R. W. **Murray**, *Acc. Chem. Res.* 2000, 33, 27-36; c) J.J. **Storhoff**, C. A. **Mirkin**, *Chem. Rev.* 1999, 99, 1849-1862.

[8] I. **Eggens**, B. **Fenderson**, T. **Toyokuni**, B. **Dean**, M. **Stroud**, S. **Hakomori**, *J. Biol. Chem.* 1989, 264, 9476-9484.

[9] a) P. H. **Weigel**, R. L. **Schnaar**, M. S. **Kuhlenschmidt**, E. **Schmell**, R. T. **Lee**, Y. C. **Lee**, S. **Roseman**, *J. Biol. Chem.* 1979, 254, 10830-10838; b) R. **Liang**, J. **Loebach**, N. **Horan**, M. **Ge**, C. **Thompson**, L. **Yan**, D. **Kahne**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 10554-10559.

[10] N. **Strömberg**, P.-G. **Nyholm**, I. **Pascher**, S. **Normark**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88, 9340-9399.

[11] S. **Hakomori**, K. **Handa**, K. **Iwabuchi**, S. **Yamamura**, A. **Prinetti**, *Glycobiology* 1998, 8, xi-xix.

[12] a) J. M. **Coterón**, C. **Vicent**, C. **Bosso**, S. **Penadés**, *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 10066-10076; b) J. **Jiménez-Barbero**, E. **Junquera**, M. **Martin-Pastor**, S. **Sharma**, C. **Vicent**, S. **Penadés**, *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 11198-11204; c) J. C. **Morales**, D. **Zurita**, S. **Penades**, *J. Org. Chem.* 1998, 63, 9212-9222.

[13] R. R. **Schmidt**, K.-H. Jung in Preparative Carbohydrate Chemistry, (Ed. Stephen Hanessian), Marcel Dekker Inc. 1997, pp 283-312. The synthesis of the neoglycoconjugates 1,2 and 3 will be published elsewhere.

[14] a) D. **Fitzmaurice**, S. **Nagaraja Rao**, J. A. **Preece**, J. F. **Stoddart**, S. **Wenger**, N. **Zaccheroni**, *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, 38, 1147-1150; b) J. **Liu**, S. **Mendoza**, E. **Román**, M. J. **Lynn**, R. **Xu**, A. E. **Kaifer**, *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 4304-4305; c) A. K. **Boal**, F. **Iihan**, J. E. **DeRouchey**, T. **Thurn-Albrecht**, T. P. **Russell**, V. M. **Rotello**, *Nature* 2000, 404, 746-748.

[15] A.C. **Templeton**, S. **Chen**, S.M. **Gross**, R.W. **Murray**, *Langmuir* 1999, 15, 66-76.

[16] K. **Simon**, E. **Ikonen**, *Nature* 1997, 387, 569-572.

[17] D. A. **Brown**, E. **London**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, 240, 1-7.

[18] **Taton** *et al*, *Science*, 289: 1757-1760, 2000.

[19] G. **Ada**, *N. Engl. J. Med.*, 345 (14), 1042-1053, 2001.

[20] E. **Klarreich**, *Nature*, 413, 450-452, 2001.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad al respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 9961911 A [0006]
- WO 9201047 A [0057]
- US 4816567 A [0058]
- EP 0184187 A [0069]
- GB 2188638 A [0069]
- EP 0239400 A [0069]
- EP 0120694 A [0069]
- EP 0125023 A [0069]

Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción

- **Kohler**; **Milstein**. *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0058]
- **Mage**; **Lamoyi**. Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications. *Marcel Dekker Inc*, 1987, 79-97 [0058]
- **Goding**. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. *Academic Press*, 1986, 59-103 [0059]
- **Munson**; **Pollard**. *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 107, 220 [0063]
- G. I. **Bell**; M. **Dembo**; P. **Bongrand**. *Biophys. J.*, 1984, vol. 45, 1051-1064 [0080]
- A. **Frey**; K.T. **Giannasca**; R. **Weltzin**; P. J. **Giannasca**; H. **Reggio**; W. I. **Lencer**; M. R. **Neutra**. *J. Exp. Med.*, 1996, vol. 184, 1045-1059 [0080]
- W. I. **Weis**; K. **Drickamer**. *Annu. Rev. Biochem.*, 1996, vol. 65, 441-73 [0080]
- S. **Hakomori**. *Pure & Appl. Chem.*, 1991, vol. 63, 473-482 [0080]
- G. N. **Misevic**. *Microsc. Res. Tech.*, 1999, vol. 44, 304-309 [0080]
- M. **Mammen**; S. **Choi**; G. M. **Whitesides**. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1998, vol. 37, 2754-2794 [0080]
- L. **Kiessling**; N. L. **Pohl**. *Chemistry & Biology*, 1996, vol. 3, 71-77 [0080]
- K. J. **Yarema**; C.R. **Bertozzi**. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1998, vol. 2, 62-66 [0080]
- P. I. **Kitov**; J. M. **Sadowska**; G. **Mulvey**; G. D. **Armstrong**; H. **Ling**; N. S. **Pannus**; R. J. **Read**; D. R. **Bundle**. *Nature*, 2000, vol. 403, 669-672 [0080]
- B. T. **Houseman**; M. **Mrksich**. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1999, vol. 38, 782-785 [0080]
- N. **Horan**; L. **Yan**; H. **Isobe**; G. M. **Whitesides**; D. **Kahne**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, vol. 96, 11782-11786 [0080]
- M. **Brust**; J. **Fink**; D. **Bethell**; D. J. **Schiffrin**; C. **Kiely**. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1995, 1655-1656 [0080]
- A. C. **Templeton**; W. P. **Wuelfing**; R. W. **Murray**. *Acc. Chem. Res.*, 2000, vol. 33, 27-36 [0080]
- J.J. **Storhoff**; C. A. **Mirkin**. *Chem. Rev.*, 1999, vol. 99, 1849-1862 [0080]

• I. **Eggens**; B. **Fenderson**; T. **Toyokuni**; B. **Dean**; M. **Stroud**; S. **Hakomori**. *J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264, 9476-9484 [0080]

• P. H. **Weigel**; R. L. **Schnaar**; M. S. **Kuhlenschmidt**; E. **Schmell**; R. T. **Lee**; Y. C. **Lee**; S. **Roseman**. *J. Biol. Chem*, 1979, vol. 254, 10830-10838 [0080]

• R. **Liang**; J. **Loebach**; N. **Horan**; M. **Ge**; C. **Thompson**; L. **Yan**; D. **Kahne**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, 10554-10559 [0080]

• N. **Strömberg**; P.-G. **Nyholm**; I. **Pascher**; S. **Normark**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 9340-9344 [0080]

• S. **Hakomori**; K. **Handa**; K. **Iwabuchi**; S. **Yamamura**; A. **Prinetti**. *Glycobiology*, 1998, vol. 8, xi-xix

• J. M. **Coterón**; C. **Vicent**; C. **Bosso**; S. **Penadés**. *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, vol. 115, 10066-10076

• J. **Jiménez-Barbero**; E. **Junquera**; M. **Martin-Pastor**; S. **Sharma**; C. **Vicent**; S. **Penadés**. *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, vol. 117, 11198-11204 [0080]

• J. C. **Morales**; D. **Zurita**; S. **Penadés**. *J. Org. Chem.*, 1998, vol. 63, 9212-9222 [0080]

• R. R. **Schmidt**; K.-H. **Jung**. Preparative Carbohydrate Chemistry. *Marcel Dekker Inc*, 1997, 283-312

• D. **Fitzmaurice**; S. **Nagaraja Rao**; J. A. **Preece**; J. F. **Stoddart**; S. **Wenger**; N. **Zaccheroni**. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1999, vol. 38, 1147-1150 [0080]

• J. **Liu**; S. **Mendoza**; E. **Román**; M. J. **Lynn**; R. **Xu**; A. E. **Kaifer**. *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, vol. 121, 4304-4305 [0080]

• A. K. **Boal**; F. **Iihan**; J. E. **DeRouchey**; T. **Thurn-Albrecht**; T. P. **Russell**; V. M. **Rotello**. *Nature*, 2000, vol. 404, 746-748 [0080]

• A.C. **Templeton**; S. **Chen**; S.M. **Gross**; R.W. **Murray**. *Langmuir*, 1999, vol. 15, 66-76 [0080]

• K. **Simon**; E. **Ikonen**. *Nature*, 1997, vol. 387, 569-572 [0080]

• D. A. **Brown**; E. **London**. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997, vol. 240, 1-7 [0080]

• **Taton** *et al*. *Science*, 2000, vol. 289, 1757-1760 [0080]

• G. **Ada**. *N. Engl. J. Med.*, 2001, vol. 345 (14), 1042-1053 [0080]

• E. **Klarreich**. *Nature*, 2001, vol. 413, 450-452 [0080]

REIVINDICACIONES

1. Nanopartícula que comprende un núcleo de átomos de metal o semiconductores unidos covalentemente a, por lo menos, 20 ligandos, donde la nanopartícula tiene dos o más especies de ligando unidas al núcleo y donde una de las especies de ligando comprende un grupo de hidratos de carbono.

2. Nanopartícula según la reivindicación 1, donde el núcleo de la nanopartícula está unido covalentemente a por lo menos 50 ligandos.

3. Nanopartícula según las reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el núcleo de la nanopartícula está unido covalentemente a por lo menos 100 ligandos.

4. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el núcleo es un núcleo metálico.

5. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el núcleo de la nanopartícula tiene un diámetro medio entre 0,5 y 100 nm.

6. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el núcleo de la nanopartícula tiene un diámetro medio entre 1 y 20 nm.

7. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, donde el núcleo metálico comprende Au, Ag o Cu.

8. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el núcleo comprende un átomo que es activo en RMN.

9. Nanopartícula según la reivindicación 8, donde el átomo activo en RMN es gadolinio y europio.

10. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el núcleo incluye un átomo que es capaz de detectarse usando la resonancia de plasmón superficial.

11. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la nanopartícula comprende como un marcador.

12. Nanopartícula según la reivindicación 11, donde el marcador es un grupo fluorescente o un isótopo radioactivo.

13. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, donde el núcleo metálico es una aleación seleccionada entre Au/Ag, Au/Cu, Au/Ag/Cu, Au/Pt, Au/Pd o Au/Ag/Cu/Pd.

14. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, donde el núcleo metálico comprende entre aproximadamente 100 y 500 átomos de Au.

15. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o reivindicaciones 5 a 14, donde los átomos semiconductores son capaces de actuar como un punto cuántico.

16. Nanopartícula según la reivindicación 15, donde el núcleo de la nanopartícula está formado de seleniuro de cadmio.

17. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las especies adicionales de ligando comprenden un ligando de péptido, un ligando de dominio de proteína, un ligando de ácido nucleico o un ligando de grupo fluorescente.

18. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el ligando que comprende un grupo de hidratos de carbono comprende además un péptido, un dominio de proteína, un segmento de ácido nucleico o un grupo fluorescente.

19. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el ligando que comprende un grupo de hidratos de carbono comprende un grupo polisacárido, oligosacárido o monosacárido.

20. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el ligando comprende un glicanoconjugado.

21. Nanopartícula según la reivindicación 20, donde el glicanoconjugado es un glicolípido o una glicoproteína.

22. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el grupo de hidratos de carbono es un ligando de selectina.

23. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, donde el grupo de hidratos de carbono es un ligando para un receptor viral o bacteriano.

24. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, donde el grupo de hidratos de carbono es un antígeno asociado a un tumor o un factor autocrino de tumor.

25. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 24, donde el ligando está unido al núcleo metálico mediante un grupo sulfuro.

26. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la nanopartícula es soluble en agua.

27. Composición que comprende una población de una o más nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26.

28. Composición según la reivindicación 27 que comprende una serie de nanopartículas que tienen diferentes grupos ligando.

29. Composición que comprende una población de una o más nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 para su uso en terapia o diagnóstico.

30. Composición que comprende una población de una o más nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, o reivindicaciones 24 a 26, donde el grupo de hidratos de carbono es un antígeno, y donde la composición es una vacuna.

31. Uso de una nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una condición mejorada mediante la administración del ligando.

32. Método de preparación de una nanopartícula según la reivindicación 1 que tiene un núcleo que comprende átomos de oro, comprendiendo el método:

sintetizar sulfuro derivados de los ligandos;

reaccionar los ligandos derivatizados de sulfuro y ácido tetracloroáurico en presencia de un agente reductor para producir las nanopartículas.

33. Método según la reivindicación 32, donde el ligando está derivatizado como un disulfuro protegido.

34. Método *in vitro* de interrupción de una integración entre un hidrato de carbono y una pareja de unión, comprendiendo el método el contacto entre el hidrato de carbono y la pareja de unión con nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, donde el ligando que comprende un grupo de hidratos de carbono que interrumpe la interacción del hidrato de carbono y la pareja de unión.

35. Método *in vitro* de cribado de sustancias capaces de unirse a un ligando que comprende un grupo de hidratos de carbono, comprendiendo el método (a) poner en contacto las nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 con uno o más compuestos candidatos y (b) determinar si los compuestos candidatos se unen al ligando.

36. Método de determinación de la presencia en una muestra de una sustancia capaz de unirse a un ligando que comprende un grupo de hidratos de carbono, comprendiendo el método (a) poner en contacto la muestra con las nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, de manera que la sustancia se une al grupo de hidratos de carbono de las nanopartículas y (b) determinar si tiene lugar la unión.

37. Método según la reivindicación 36, que comprende además la etapa de correlacionar la presencia o ausencia de unión con el diagnóstico de un estado patológico asociado con la presencia de la sustancia.

38. Método según la reivindicación 36 o la reivindicación 37, donde la sustancia es un anticuerpo que es capaz de unirse al grupo de hidratos de carbono.

39. Método *in vitro* de determinación si tiene lugar la interacción mediada por hidrato de carbono, comprendiendo el método (a) poner en contacto una o más especies sospechosas de interaccionar a través de una interacción mediada por hidrato de carbono con las nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 y (b) determinar si las nanopartículas modulan la interacción mediada por hidrato de carbono.

40. Método según cualquiera de las reivindicaciones de 34 a 39, donde las nanopartículas son detectadas mediante resonancia magnética nuclear (RMN), agregación, microscopía electrónica de transmisión (MET), microscopía de fuerza atómica (MFA), resonancia de plasmón superficial (RPS), o con nanopartículas que comprenden átomos de plata, amplificación de señal usando la reducción de plata (I) inducida por nanopartículas.

41. Método según cualquiera de las reivindicaciones 33 a 40, donde las nanopartículas comprenden un marcador fluorescente, un marcador isotópico, un átomo activo en RMN, o un punto cuántico.

42. Uso de una nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 para desarrollar y aislar anticuerpos capaces de unirse específicamente al ligando.

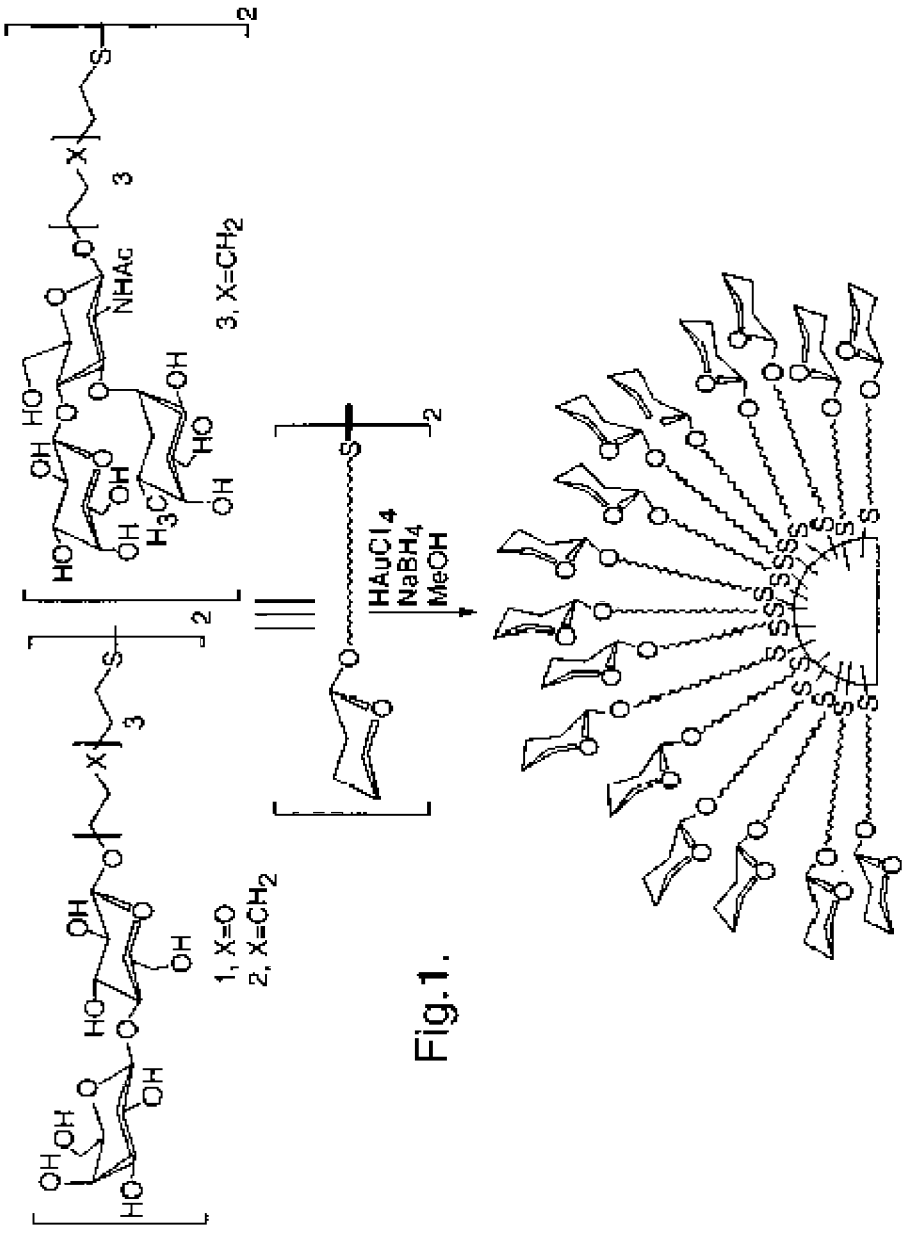
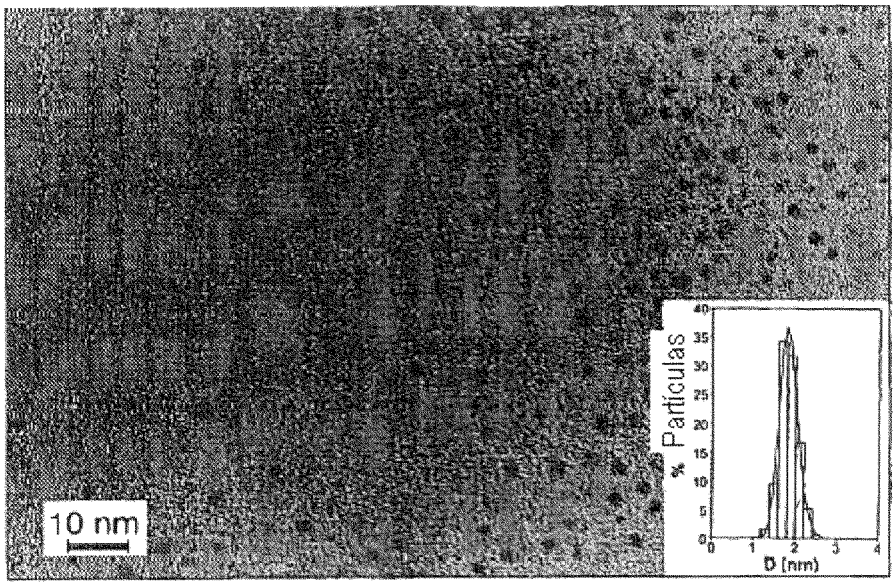


Fig.1.

Fig.2.



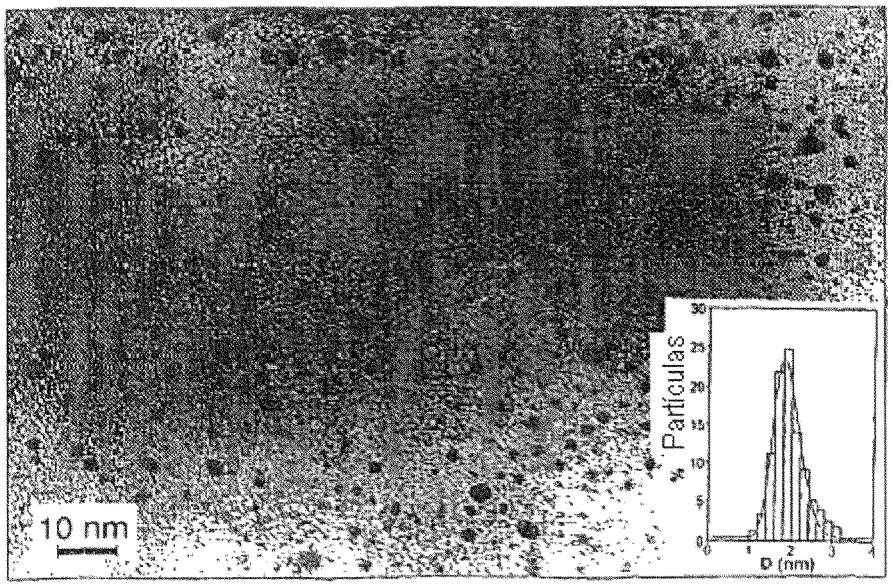


Fig.3A.

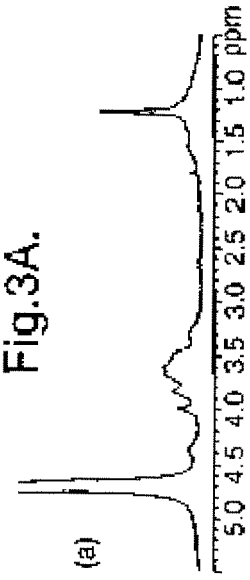
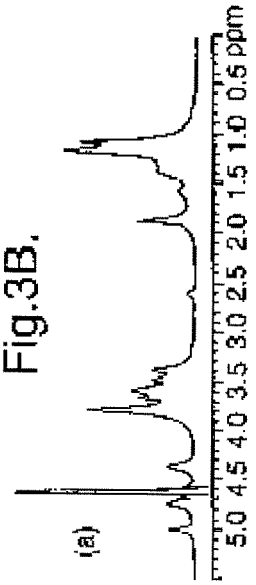

(a)
(b)
(c)
5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 ppm

Fig.3B.


(a)
(b)
(c)
5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 ppm