



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 355 728**

51 Int. Cl.:
A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04736221 .5**

96 Fecha de presentación : **07.06.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1631318**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.03.2006**

54 Título: **Nanopartículas magnéticas ligadas a un ligando.**

30 Prioridad: **09.06.2003 GB 0313259**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.03.2011

73 Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
MIDATECH LIMITED**

72 Inventor/es: **Penades, S.;
Martín-Lomas, M.;
Martínez de la Fuente, J. y
Rademacher, Thomas William**

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).

DESCRIPCION

Nanopartículas magnéticas ligadas a un ligando

Campo de la invención

5 **[0001]** La presente invención se refiere a nanopartículas magnéticas, y en particular a nanopartículas magnéticas que tienen ligandos inmovilizados 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, diagnóstico y terapia.

Antecedentes de la invención

10 **[0002]** El desarrollo de metodologías para producir nanopartículas con propiedades biosensibles ha abierto el camino para producir herramientas útiles para los diagnósticos moleculares, la terapéutica y la biotecnología [1]. Las nanopartículas coloidales metálicas, semiconductoras y magnéticas son actualmente objeto de un intenso estudio para posibles aplicaciones [2].

15 **[0003]** Se han fabricado nanopartículas que contienen materiales paramagnéticos tales como óxido de hierro que presentan propiedades magnéticas excepcionalmente fuertes bajo campos magnéticos externos. Estas nanopartículas magnéticas pueden usarse en muchas aplicaciones biomédicas que incluyen separación de células, marcado de células y de tejidos *in vivo*, mejora del contraste en la obtención de imágenes de resonancia magnética, elección de tumores como diana, terapias de hipertermia y administración de fármacos.

20 **[0004]** Para tales aplicaciones, las nanopartículas deberán ser preferentemente suficientemente pequeñas para evitar provocar una respuesta inmunitaria y ser captadas por células, si es necesario. También es útil si el tamaño de las partículas puede controlarse, ya que las partículas deberán ser de aproximadamente el mismo tamaño de forma que muestren las mismas propiedades magnéticas. Las partículas también deberán ser preferentemente químicamente estables de forma que no sean descompuestas por el cuerpo.

25 **[0005]** También se prefiere que las nanopartículas magnéticas para uso en biomedicina sean solubles, especialmente en agua, con el fin de que puedan almacenarse y administrarse eficazmente. Idealmente, tales partículas serían estables en disolución y no se agregarían, tanto cuando se almacenaran antes de uso como en el cuerpo. Las nanopartículas magnéticas tienden a aglutinarse juntas en disolución debido a que se atraen entre sí. Si esto ocurriera en el cuerpo, obstaculizaría la circulación sanguínea y posiblemente sería peligroso; en disolución coloidal harían que el coloide fuera difícil de usar.

30 **[0006]** Previamente, las partículas de óxido de hierro comercialmente disponibles se han usado en clasificación y separación de células [3]. Las nanopartículas magnéticas monodispersas de Fe/Pt [4], Co y Co/Fe [5], Fe [6] y óxidos de hierro [7] se han sintetizado recientemente por química de disolución para aplicaciones en materiales [8]. También se han descrito nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con dextrano reticulado para evitar aglutinización, véase por ejemplo el documento WO 03/005029.

35 **[0007]** Idealmente, las nanopartículas magnéticas están fabricadas de metal magnético elemental en vez de óxido metálico ya que el metal elemental es un mejor potenciador de la obtención de imágenes magnéticas. Sin embargo, tales nanopartículas son frecuentemente químicamente inestables, ya que el metal puede oxidarse. Una posibilidad para aumentar la estabilidad química de las nanopartículas magnéticas es sintetizarlas a partir de un metal magnético con un metal pasivo para estabilizar el metal magnético.

40 **[0008]** El documento US 2002/0068187 desvela nanopartículas con núcleo-envoltura de oro-hierro protegidas con tensioactivo sintetizadas por medio de micelas inversas. Sin embargo, este procedimiento es complejo, requiriendo tres etapas de síntesis. La composición multicapa de las partículas resultantes también aumenta el límite de tamaño inferior para las partículas, que puede ser una desventaja si se requieren partículas muy pequeñas [14].

45 **[0009]** La patente de EE.UU. n°: 6.254.662 desvela el uso de nanopartículas de aleaciones de FePt y CoPt para formar finas películas nanocristalinas sobre una superficie sólida para uso en la fabricación de medios de grabación de densidad ultra-alta. Otros usos de las películas se mencionan en la patente, que incluyen el uso como películas de polarización magnética y puntas magnéticas para microscopía de fuerza magnética, pero no se prevén aplicaciones biomédicas.

50 **[0010]** Para muchas de las aplicaciones descritas anteriormente es necesario ligar las nanopartículas a moléculas biológicamente activas tales como ligandos que se unen a moléculas intracelulares o extracelulares. Tales ligandos pueden ser, por ejemplo, hidrato de carbono, ácido nucleico o proteína.

[0011] La patente de EE.UU. nº: 6.514.481 desvela nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con una envoltura de sílice en las que la envoltura está ligada a una molécula que elige diana tal como un péptido mediante una molécula espaciadora. Los documentos WO 02/098364 y WO 01/19405 desvelan nanopartículas magnéticas de óxido metálico recubiertas con dextrano y funcionalizadas con péptidos y oligonucleótidos.

- 5 Se han usado estrategias similares para preparar nanopartículas para el marcado intracelular [9] y como nanosensores [10]. Todos estos procedimientos son procedimientos de múltiples etapas que requieren mucho tiempo que requieren que las nanopartículas se recubran con dextrano o sílice, que las nanopartículas recubiertas se funcionalicen de forma que se unan al ligando, y finalmente que el ligando se una a las nanopartículas.

- [0012]** El documento WO 03/073444 desvela nanopartículas superparamagnéticas que tienen un núcleo formado de átomos de los metales Au y Fe en una relación de al menos 3:7. La solicitud dice que los ligandos pueden ligarse al núcleo mediante un grupo sulfuro y que las nanopartículas se usan para formar dispositivos nanoelectrónicos. Los núcleos de las nanopartículas tienen diámetros en el intervalo de 5 nm a 50 nm.

- [0013]** El documento WO 02/093140 desvela nanoalambres magnéticos que comprenden uno o más segmentos y grupos funcionales o ligandos asociados a al menos uno de dichos segmentos. Los nanoalambres tienen un diámetro en el intervalo de aproximadamente 10-300 nm y una longitud de 10 nm a decenas de micrómetros. Los segmentos de los nanoalambres pueden formarse a partir de materiales tales como oro, plata, platino, cobre, hierro y cobalto en forma pura o aleada y los grupos funcionales pueden ser átomos o grupos de átomos que pueden tener más reactividad química tal como reaccionar con un ligando para unir el ligando al alambre, o para unirse a una molécula diana.

- 20 Aunque se propone una variedad de posibles formas de asociar los ligandos y los nanoalambres, los ejemplos se basan en la interacción iónica entre ligandos que contienen grupos ácido carboxílico y el nanoalambre.

[0014] La patente de EE.UU. nº: 6.531.304 desvela un coloide a escala nanométrica formado a partir de aleaciones metálicas que se hace reaccionar y se une no covalentemente a un "modificador" de polisacárido o de azúcar.

- 25 **[0015]** El documento WO 02/32404 desvela nano-herramientas solubles en agua para estudiar interacciones mediadas por hidratos de carbono [11], [12]. Estas herramientas son gliconanopartículas de oro y gliconanopuntos de sulfuro de cadmio que incorporan antígenos de hidrato de carbono. Estos nanopuntos de oro y semiconductores solubles en agua son estables durante meses en disoluciones fisiológicas y presentan tamaños de núcleo excepcionalmente pequeños. Son resistentes a glicosidasas y no presentan citotoxicidad. También son plataformas útiles para estudios básicos de interacciones de hidratos de carbono [13] y son herramientas para aplicaciones biotecnológicas y biomédicas. Sin embargo, estas nanopartículas no son magnéticas.

[0016] El documento WO 99/61911 desvela nanopartículas en las que un núcleo de metal o aleación de metales tiene una monocapa adsorbida sobre él, incluyendo la monocapa el sustituyente reactivo para acoplar ligandos.

- 35 **[0017]** Teranishi y col. (Gold, 978-982, 2003) describen estudios de las propiedades ópticas y eléctricas de super-redes cristalinas de nanopartículas de oro.

[0018] Srikanth y col. (Materials Science and Engineering, 901-904, 2001) describen nanopartículas que se sintetizan como una "nano-cebolla" que comprende un núcleo de oro rodeado por una envoltura de hierro que está recubierta de oro para evitar la combustión pirofórica.

- 40 **[0019]** Por tanto, hay una necesidad continua en la materia de nanopartículas magnéticas estables que estén unidas a ligandos para hacerlas adecuadas para usos biomédicos que pueden sintetizarse a un tamaño deseado, y que pueden producirse mediante un procedimiento de síntesis fidedigno simple.

Resumen de la invención

- 45 **[0020]** En líneas generales, la presente invención proporciona materiales y procedimientos para producir nanopartículas magnéticas que son particularmente adecuadas para uso en aplicaciones biomédicas.

- En particular, la presente invención proporciona nanopartículas magnéticas que se emplean como sustrato para inmovilizar una pluralidad de ligandos, en las que los ligandos están covalentemente unidos al núcleo de la nanopartícula. Los ligandos pueden comprender grupos hidrato de carbono, péptidos, dominios de proteína, segmentos de ácido nucleicos o grupos fluorescentes. Entonces, estas nanopartículas pueden usarse para estudiar interacciones mediadas por ligando, por ejemplo, con otros hidratos de carbono, proteínas o ácidos nucleicos, y

como agentes terapéuticos y reactivos de diagnóstico. En algunas realizaciones, las partículas tienen la ventaja adicional de que son solubles, por ejemplo, en agua y una variedad de disolventes orgánicos y pueden usarse en una variedad de formatos de aplicación homogénea.

5 **[0021]** Los inventores han desarrollado ahora nanopartículas magnéticas con tamaño en la escala de nanómetros que forman disoluciones acuosas coloidales estables (ferrofluidos). Los procedimientos descritos en este documento constituyen una solución simple y versátil por la cual neoglicoconjugados de hidratos de carbono significativos se ligan covalentemente a agrupaciones de oro/hierro como procedimiento para confeccionar gliconanopartículas magnéticas estables solubles en agua con formas globulares y superficies de hidrato de carbono altamente polivalentes. La metodología también permite la unión de muchas otras moléculas directamente a la nanoagrupación.

15 **[0022]** Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una nanopartícula magnética que tiene un núcleo de átomos de metal que comprende átomos de metal pasivo y átomos de metal magnético en la que la relación de átomos de metal pasivo con respecto a átomos de metal magnético en el núcleo está entre 5:0,1 y 2:5, y los átomos de metal pasivo comprenden átomos de oro, platino, plata o cobre y los átomos de metal magnético comprenden átomos de hierro, cobalto o gadolinio, y en la que el núcleo está covalentemente ligado a una pluralidad de ligandos que comprenden grupos hidrato de carbono. Los ligandos pueden comprender adicionalmente grupos hidrato de carbono, péptidos, dominios de proteína, segmentos de ácidos nucleicos u otras macromoléculas biológicas. Los ligandos pueden comprender adicionalmente o alternativamente grupos fluorescentes.

20 **[0023]** Preferentemente, la relación de átomos de metal pasivo con respecto a átomos de metal magnético en el núcleo está entre 5:0,1 y 5:1.

[0024] Como se usa en este documento, el término “metal pasivo” se refiere a metales que no muestran propiedades magnéticas y son químicamente estables a la oxidación.

25 **[0025]** Los metales pasivos de la invención pueden ser diamagnéticos. “Diamagnético” se refiere a materiales con todos los electrones apareados que, por tanto, no tienen momento magnético neto permanente por átomo. Los materiales “magnéticos” tienen algunos electrones sin aparear y son positivamente susceptibles a campos magnéticos externos - es decir, el campo magnético externo induce a los electrones para que se alineen con el campo aplicado, de forma que los momentos magnéticos de los electrones están alineados.

30 **[0026]** Los materiales magnéticos pueden ser paramagnéticos, superparamagnéticos o ferromagnéticos. Los materiales paramagnéticos no son muy susceptibles a campos magnéticos externos y no conservan sus propiedades magnéticas cuando se quita el campo magnético externo. Los materiales ferromagnéticos son altamente susceptibles a campos magnéticos externos y contienen dominios magnéticos incluso cuando no está presente ningún campo magnético externo debido a que los átomos vecinos cooperan de forma que sus espines electrónicos sean paralelos. Los campos magnéticos externos alinean los momentos magnéticos de dominios vecinos, amplificando el efecto magnético. Partículas muy pequeñas de materiales que normalmente tienen propiedades ferromagnéticas no son ferromagnéticas, ya que el efecto de colaboración no se produce en partículas de 300 nm o menos, de forma que el material no tiene magnetismo permanente. Sin embargo, las partículas todavía son muy susceptibles a campos magnéticos externos y tienen fuertes propiedades paramagnéticas, y se conocen como superparamagnéticas. Preferentemente, las nanopartículas de la invención son superparamagnéticas.

40 **[0027]** En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones que comprenden poblaciones de una o más de las partículas anteriormente definidas. En algunas realizaciones, las poblaciones de nanopartículas pueden tener diferentes densidades de ligandos iguales o diferentes unidos al núcleo.

[0028] En otro aspecto, la presente invención proporciona las partículas anteriormente definidas para uso en terapia.

45 **[0029]** En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de las partículas anteriormente definidas para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección mejorada por la administración del ligando. A modo de ejemplo, esto puede producirse cuando el ligando bloquea una interacción mediada por hidrato de carbono que de otro modo tendería a conducir a una patología.

50 **[0030]** En esta realización, la presente invención tiene ventajas con respecto a las soluciones de la técnica anterior para tratar afecciones que implican interacciones mediadas por hidrato de carbono. Como se ha descrito anteriormente, normalmente las interacciones son polivalentes, mientras que el agente usado para tratar las interacciones sólo puede modular frecuentemente una o algunas de estas interacciones. Esto tiene como resultado que es difícil administrar un agente al sitio de la interacción que pueda modular de forma fidedigna la interacción

para el efecto terapéutico deseado. A diferencia de este problema, la presente invención proporciona agentes que tienen una pluralidad de ligandos para modular las interacciones mediadas por hidrato de carbono, venciendo posiblemente la dificultad para modular las interacciones polivalentes.

[0031] En realizaciones preferidas, el diámetro medio del núcleo, preferentemente el núcleo metálico, está entre 0,5 y 100 nm, más preferentemente entre 1 y 50 nm, más preferentemente entre 1 y 20 nm. Más preferentemente, el diámetro medio del núcleo es inferior a 5 nm, más preferentemente inferior a 2,5 nm, y todavía más preferentemente inferior a 2 nm. El diámetro medio puede medirse usando técnicas muy conocidas en la técnica tales como microscopía electrónica de transmisión.

[0032] El material del núcleo es un material compuesto o una aleación de un metal pasivo y un metal magnético, siendo los metales pasivos Au, Ag, Pt o Cu y siendo los metales magnéticos Fe, Co o Gd, siendo el material compuesto más preferido Au/Fe. También pueden usarse otros materiales compuestos o aleaciones. Los núcleos de nanopartículas también pueden formarse a partir de aleaciones que incluyen Au/Fe, Au/Gd, Au/Zn, Au/Fe/Cu, Au/Fe/Gd y Au/Fe/Cu/Gd, y puede usarse en la presente invención. Los núcleos de las nanopartículas comprenden preferentemente entre 100 y 500 átomos (por ejemplo, átomos de oro), más preferentemente entre 20 y 500 átomos, y todavía más preferentemente entre 50 y 500 átomos, para proporcionar diámetros de núcleo en el intervalo de nanómetros. Otro ejemplo preferido de nanopartículas de la presente invención tiene núcleos formados a partir de átomos de Au y Gd, por ejemplo, Gd III, por ejemplo, que tiene un diámetro medio inferior a 10 nm, más preferentemente inferior a 5 nm y lo más preferentemente 2,5 nm. Las partículas preferidas de este tipo comprenden entre el 1-20% de átomos de Gd y del 99 al 80% de átomos de Au, y más preferentemente entre el 1-10% de Gd y del 99 al 90% de Au, basado en la relación de la relación de átomos de metal respectivos presentes en el núcleo de la nanopartícula.

[0033] Para algunas aplicaciones, los materiales del núcleo están dopados o marcados con uno o más átomos que son activos para RMN, permitiendo que las nanopartículas se detecten usando RMN, tanto *in vitro* como *in vivo*. Ejemplos de átomos activos para RMN incluyen Mn^{+2} , Gd^{+3} , Eu^{+2} , Cu^{+2} , V^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Fe^{+2} , Fe^{+3} y lantánidos⁺³, o los puntos cuánticos descritos en otro sitio en la presente solicitud.

[0034] Pueden detectarse núcleos de nanopartículas que comprenden átomos semiconductores ya que los cristales semiconductores a escala nanométrica pueden hacer de puntos cuánticos, es decir, pueden absorber luz, excitando así electrones en los materiales a niveles de energía superior, liberando posteriormente fotones de luz a frecuencias características del material. Un ejemplo de un material del núcleo semiconductor es seleniuro de cadmio, sulfuro de cadmio, telurio de cadmio. También se incluyen compuestos de cinc tales como sulfuro de cinc.

[0035] En algunas realizaciones, la nanopartícula de la presente invención o ligando(s) puede comprender una marca detectable. La marca puede ser un elemento del núcleo de la nanopartícula o el ligando. La marca puede ser detectable debido a una propiedad intrínseca de ese elemento de la nanopartícula o por estar ligada, conjugada o asociada a otro resto que es detectable. Ejemplos preferidos de marcas incluyen una marca que es un grupo fluorescente, un radionúclido, una marca magnética o un colorante. Los grupos fluorescentes incluyen fluoresceína, rodamina o tetrametil-rodamina, Texas-Red, Cy3, Cy5, etc., y pueden detectarse por excitación de la marca fluorescente y detección de la luz emitida usando espectroscopía de dispersión Raman (Y.C. Cao, R. Jin, C. A. Mirkin, Science 2002, 297: 1536-1539).

[0036] En algunas realizaciones, las nanopartículas pueden comprender un radionúclido para uso en la detección de la nanopartícula usando la radiactividad emitida por el radionúclido, por ejemplo, usando PET o SPECT, o para terapia, es decir, para destruir células diana. Ejemplos de radionúclidos comúnmente usados en la materia que podrían adaptarse fácilmente para uso en la presente invención incluyen ^{99m}Tc , que existe en una variedad de estados de oxidación, aunque el más estable es TcO_4^- ; ^{32}P o ^{33}P ; ^{57}Co ; ^{59}Fe ; ^{67}Cu que se usa frecuentemente como sales de Cu^{2+} ; ^{67}Ga que se usa comúnmente como una sal de Ga^{3+} , por ejemplo, citrato de galio; ^{68}Ge ; ^{82}Sr ; ^{99}Mo ; ^{113}Pd ; ^{111}In que se usa generalmente como sales de In^{3+} ; ^{125}I o ^{131}I que se usa generalmente como yoduro de sodio; ^{137}Cs ; ^{153}Gd ; ^{153}Sm ; ^{158}Au ; ^{186}Re ; ^{201}Tl generalmente usado como una sal de Tl^+ tal como cloruro de talio; $^{39}Y^{3+}$; $^{71}Lu^{3+}$; y $^{24}Cr^{2+}$. El uso general de radionúclidos como marcas y trazadores es muy conocido en la técnica y podría ser fácilmente adaptado por el experto para uso en los aspectos de la presente invención. Los radionúclidos pueden emplearse de la manera más fácil dopando los núcleos de las nanopartículas o incluyéndolas como marcas presentes como parte de ligandos inmovilizados sobre las nanopartículas.

[0037] Las nanopartículas magnéticas previamente descritas para aplicaciones biológicas se fabrican casi siempre a partir de un óxido metálico magnético, normalmente óxido de hierro (magnetita). Se han fabricado nanopartículas que comprenden Fe y Au, como se ha descrito anteriormente, pero no se han usado para aplicaciones biológicas ni se han unido a moléculas biológicamente activas. Estas nanopartículas se sintetizan como una "nano-cebolla" que comprende un núcleo de oro rodeado por una envoltura de hierro que está recubierta de oro para evitar la oxidación. Las nanopartículas descritas en este documento, que tienen un núcleo heterogéneo que

comprende tanto átomos de oro como de hierro, son una mejora con respecto a las partículas previamente descritas debido a que pueden sintetizarse en una única simple etapa en vez de requerir múltiples etapas de síntesis para formar las diferentes envolturas de la nano-cebolla.

[0038]

Las nanopartículas y los resultados de sus interacciones pueden detectarse usando varias técnicas muy conocidas en la técnica. Éstas pueden oscilar desde la detección de la agregación que resulta cuando las nanopartículas se unen a otras especies, por ejemplo, mediante simple inspección visual, o usando dispersión de la luz (transmitancia de una disolución que contiene las nanopartículas), hasta usar sofisticadas técnicas tales como microscopía electrónica de transmisión (TEM) o microscopía de fuerza atómica (AFM) para visualizar las nanopartículas. Otro procedimiento de detección de partículas metálicas es emplear resonancia de plasmones, es decir, la excitación de electrones en la superficie de un metal, normalmente producido por radiación óptica. El fenómeno de la resonancia de plasmones superficiales (SPR) existe en la superficie de separación de un metal (tal como Ag o Au) y un material dieléctrico tal como aire o agua. Como se producen cambios en la SPR a medida que los analitos se unen al ligando inmovilizado sobre la superficie de una nanopartícula, cambia el índice de refracción de la superficie de separación. Otra ventaja de la SPR es que puede usarse para monitorizar interacciones en tiempo real. Como se menciona anteriormente, si las nanopartículas incluyen o están dopadas con átomos que son activos para RMN, entonces esta técnica puede usarse para detectar las partículas, tanto *in vitro* como *in vivo*, usando técnicas muy conocidas en la técnica. Las nanopartículas también pueden detectarse como se describe en [18] usando un sistema basado en la amplificación de señales cuantitativas usando la reducción promovida por nanopartículas de plata (I) y usando un escáner de sobremesa como lector. La espectroscopía de fluorescencia puede usarse si las nanopartículas incluyen ligandos que combinan grupos hidrato de carbono y sondas fluorescentes. Por tanto, puede usarse el marcado isotópico del hidrato de carbono para facilitar su detección.

[0039]

Al menos un ligando de la pluralidad de ligandos unidos al núcleo comprende uno o más grupos hidrato de carbono (sacárido), por ejemplo, que comprende un grupo polisacárido, oligosacárido o un único sacárido. El ligando también puede ser un glicanoconjugado tal como un glicolípido o una glicoproteína. Además del grupo hidrato de carbono, el ligando puede comprender adicionalmente uno o más de un grupo péptido, un dominio de proteína, una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un segmento de ADN, una molécula de ácido nucleico monocatenario o bicatenario, una molécula de ARN monocatenario o bicatenario, una molécula de ARN que tiene de 17 a 30 ribonucleótidos, por ejemplo, un ligando de ARNip o miARN) y/o una sonda fluorescente.

[0040]

Al menos un ligando de la pluralidad de ligandos unidos al núcleo puede ser un péptido o una proteína. Éstos pueden ser péptidos que se unen a receptores sobre una célula, o pueden ser anticuerpos, o proteínas terapéuticas.

[0041]

Al menos un ligando de la pluralidad de ligandos unidos al núcleo puede ser una molécula de ácido nucleico. El ácido nucleico puede ser una sonda de oligonucleótidos que se une a una secuencia dentro de la célula.

Alternativamente, el ácido nucleico puede comprender una secuencia de genes codificante para la administración a una célula.

[0042]

Las partículas pueden tener más de una especie de ligando inmovilizado sobre ellas, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 10, 20 ó 100 ligandos diferentes. Alternativamente o adicionalmente pueden emplearse juntos una pluralidad de diferentes tipos de partículas. Los ligandos con múltiples sitios de unión pueden ligarse a una pluralidad de núcleos de nanopartículas, por ejemplo 2, 3 ó 4 partículas. Un ejemplo de esto serían núcleos de nanopartículas unidos a los extremos de polipéptidos o moléculas de ácidos nucleicos.

[0043]

En realizaciones preferidas, el número medio de ligandos ligados a un núcleo metálico individual de la partícula es al menos 20 ligandos, más preferentemente al menos 50 ligandos, y lo más preferentemente 60 ligandos.

[0044]

Los ligandos están unidos covalentemente al núcleo de las partículas. Los protocolos para llevar a cabo esto se conocen en la técnica, aunque el trabajo descrito en este documento es el primer informe de las reacciones que se usan para unir covalentemente ligandos al núcleo de la partícula.

[0045]

Esto puede llevarse a cabo haciendo reaccionar ligandos con grupos terminales reductores con oro y hierro bajo condiciones reductoras. Un procedimiento preferido de producción de las partículas emplea restos de hidrato de carbono derivatizados con tiol para acoplar los ligandos a partículas. Por tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de preparación de las partículas anteriormente definidas, por ejemplo, que tiene un núcleo que comprende oro u oro y hierro, núcleo que está covalentemente ligado a una pluralidad de ligandos, comprendiendo el procedimiento:

(a) sintetizar un derivado de sulfuro del ligando; y

(b) hacer reaccionar el ligando derivatizado de sulfuro con HAuCl_4 (ácido tetracloroáurico), y opcionalmente con una sal férrica en la que están presentes átomos de hierro en el núcleo, en presencia de un agente reductor para producir las partículas. Una sal de hierro preferida es FeCl_3 .

[0046] En algunas realizaciones, el ligando se derivatiza con un ligador. Preferentemente, el ligador es un ligador de disulfuro, por ejemplo, un ligador de disulfuro mixto. El ligador puede comprender adicionalmente en la cadena grupos etileno, grupos péptido o aminoácido, grupos polinucleótido o nucleótido.

[0047] Un grupo ligador a modo de ejemplo se representa por la fórmula general $\text{HO}-(\text{CH}_2)_n\text{-S-S}-(\text{CH}_2)_m\text{-OH}$ en la que n y m son independientemente número enteros entre 1 y 5. El ligando puede ligarse convenientemente al espaciador mediante un grupo adecuado, y en el caso de los ligadores de disulfuro mixtos preferidos mediante uno de los ligadores de grupos hidroxilo terminales. Si se sintetizan las nanopartículas, el -S-S- del ligador se disocia para formar dos ligadores tio que pueden cada uno unirse covalentemente al núcleo de la nanopartícula mediante un grupo -S-. Por tanto, en una realización preferida, el ligando se derivatiza como un disulfuro protegido. Convenientemente, el ligando protegido de disulfuro en metanol o agua puede añadirse a una disolución acuosa de ácido tetracloroáurico. Un agente reductor preferido es borohidruro de sodio. Otras características preferidas del procedimiento se describen en los ejemplos más adelante.

[0048] La presente invención proporciona una forma de presentar una matriz esférica de ligandos que tiene ventajas con respecto a los otros tipos de matriz propuestos en la técnica anterior. En particular, las nanopartículas son solubles en la mayoría de los disolventes orgánicos y especialmente agua. Esto puede usarse en su purificación y, lo que es más importante, significa que pueden usarse en disolución para presentar el ligando inmovilizado sobre la superficie de la partícula. El hecho de que las nanopartículas sean solubles tiene la ventaja de presentar los ligandos en una conformación natural. Para aplicaciones terapéuticas, las nanopartículas son no tóxicas, solubles y estable bajo condiciones fisiológicas.

[0049] Las nanopartículas magnéticas en disolución forman coloides magnéticos conocidos como ferrofluidos. Los ferrofluidos tienen las propiedades fluidas de un líquido y las propiedades magnéticas de un sólido. Tienen una variedad de aplicaciones, como se describe más adelante. El principal problema encontrado con los ferrofluidos conocidos en la técnica es su falta de estabilidad: debido a que las partículas magnéticas se atraen entre sí, se aglomerarán después de un cierto tiempo. Los procedimientos previamente usados para prevenir la aglomeración incluyen recubrir las partículas con tensioactivos, reticular polímeros o polisacáridos. Si la nanopartícula va a unirse a un ligando o molécula que elige diana se requiere otra etapa de síntesis.

[0050] Las partículas de la presente invención son altamente solubles en agua y, por tanto, son ideales para preparar ferrofluidos. Además, los ferrofluidos resultantes son extremadamente estables y pueden guardarse durante muchos meses sin agregarse. Los ferrofluidos de la invención se han guardado durante un año sin signos de agregación. Los procedimientos de la presente invención permiten nanopartículas magnéticas que son estables y que ya están unidas a ligandos funcionales que van a sintetizarse en una única reacción en vez de requerir que las partículas se recubran primero y luego se unan a ligandos.

[0051] La estabilidad puede evaluarse a ojo - una disolución coloidal sigue siendo transparente en ausencia de aglomeración, pero se vuelve opaca una vez empieza a aglomerarse. Alternativamente, la presencia de floculación puede determinarse por micrografía electrónica de transmisión (TEM), o comparando los espectros de RMN de protones de las partículas en agua deuterada con aquellos de nanopartículas recientemente preparadas. Preferentemente, las partículas magnéticas no mostrarán signos de aglomeración durante al menos un año después de la preparación.

[0052] En el procedimiento descrito en este documento, la formación del núcleo y el enlace covalente del ligando es un procedimiento simultáneo, de manera que la presencia del neoglicoconjugado controla la forma y el tamaño de las nanoagrupaciones. Las gliconanopartículas preparadas de esta forma tienen un núcleo menos de 2 nm de diámetro, que es más pequeño que cualquiera de las nanopartículas magnéticas conocidas en la técnica. El comportamiento superparamagnético se muestra a todas las temperaturas y las mediciones con el dispositivo de interferencia de cuantos superconductores (SQUID) también indican la existencia de un componente ferromagnético a temperatura ambiente. Esta propiedad magnética anómala puede ser de importancia para obtener imágenes y separaciones de células.

[0053] Los siguientes ejemplos de aplicación para las nanopartículas magnéticas y los ferrofluidos se proporcionan a modo de ilustración y no de limitación para apoyar la amplia aplicabilidad de las tecnologías descritas en este documento.

[0054] En un aspecto de la invención, las propiedades magnéticas de las nanopartículas de la invención se explotan en técnicas de separación de células que eliminan la necesidad de columnas o centrifugación. Esto permite

que se obtenga rápida y fácilmente una población altamente pura de células. En una realización, las nanopartículas pueden ligarse a ligandos que se unen específicamente a un receptor sobre la célula de interés. Las nanopartículas pueden entonces añadirse a una suspensión de células y las células unidas a partículas separarse del resto de la suspensión mediante la aplicación de un campo magnético.

- 5 **[0055]** Esto es un procedimiento altamente sensible, además de eficiente, que puede usarse en muchas aplicaciones, por ejemplo, en el diagnóstico de tumores probando fluidos corporales para la presencia de células tumorales. La sensibilidad de la técnica es una gran ventaja a este respecto.

- [0056]** En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento *ex vivo* para determinar si se produce o no una interacción con un ligando, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una o más especies de nanopartículas unidas a ligando con un constituyente de unión candidato y determinar si tiene lugar la unión.

[0057] En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento *ex vivo* de cribado de sustancias que pueden unirse a un ligando, comprendiendo el procedimiento:

- 15 poner en contacto nanopartículas como se definen en este documento que tienen un núcleo que comprende un metal pasivo o metal pasivo y un metal magnético, cuyo núcleo está covalentemente ligado a una pluralidad de ligandos, con uno o más compuestos candidatos; y

detectar si los compuestos candidatos se unen al ligando.

[0058] Preferentemente, la relación de átomos de metal pasivo con respecto a átomos de metal magnético en el núcleo es entre 5:0,1 y 5:1.

- 20 **[0059]** En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de determinación de la presencia en una muestra de una sustancia que puede unirse a un ligando, comprendiendo el procedimiento poner en contacto la muestra con nanopartículas ligadas al ligando y determinar si tiene lugar la unión. El procedimiento puede usarse para determinar la presencia o la cantidad de uno o más analitos en una muestra, por ejemplo, para uso en ayudar en el diagnóstico de un estado de enfermedad asociado a la presencia del analito. La presencia de analitos puede
- 25 señalizarse mediante la formación de agregados de analito-nanopartícula cuya presencia puede detectarse midiendo las propiedades de relajación del fluido en la muestra. Un cambio en las propiedades de relajación indica la presencia de agregados y, por tanto, moléculas diana.

- [0060]** Si el ligando es un hidrato de carbono, en la técnica se conoce una variedad de diferentes interacciones mediadas por hidrato de carbono y podrían estudiarse o modularse usando las nanopartículas
- 30 desveladas en este documento. Éstas incluyen adhesión de leucocitos-células endoteliales, interacciones hidrato de carbono-anticuerpo, infección bacteriana y vírica por hidrato de carbono-proteína, reconocimiento inmunológico de células tumorales, células tumorales-células endoteliales (por ejemplo, para estudiar metástasis) y tejido extraño y reconocimiento de células.

- [0061]** En otro aspecto, las nanopartículas magnéticas y los ferrofluidos de la invención pueden usarse para
- 35 tratar cáncer. Las nanopartículas magnéticas pueden usarse para tratamiento hipertérmico de tumores, en el que las nanopartículas magnéticas se inyectan en tumores y se someten a un campo magnético de CA o CC de alta frecuencia. Alternativamente puede usarse luz de IR próximo. Por tanto, el calor generado por la energía magnética de relajación del material magnético destruye el tejido tumoral alrededor de las partículas. En una realización de la presente invención, las células tumorales pueden elegirse específicamente como diana incorporando antígenos
- 40 específicos de tumor en las nanopartículas. Esto permite que tumores no fácilmente alcanzados por la inyección sean elegidos como diana por las partículas terapéuticas, y se evita destruir células sanas normales.

- [0062]** Para una frecuencia de excitación dada existe un tamaño de nanopartícula óptimo que proporciona una tasa de absorción específica (SAR) máxima y, por tanto, el calentamiento más eficiente. Por tanto, esta técnica requiere nanopartículas magnéticas con una estrecha distribución de tamaño del núcleo para maximizar la eficiencia
- 45 de la terapia y minimizar la cantidad de ferrofluido que va a administrarse. Por tanto, las nanopartículas magnéticas de la invención son particularmente muy adecuadas para la presente aplicación ya que el procedimiento de síntesis permite que el tamaño de las nanopartículas se controle estrechamente.

- [0063]** En otra realización, las nanopartículas pueden ligarse a sustancias terapéuticamente activas tales como anticuerpos o fármacos destructores de tumores. Las propiedades magnéticas de las nanopartículas también
- 50 pueden usarse para elegir como diana tumores usando un campo magnético para guiar las nanopartículas a las células tumorales. Sin embargo, el uso de un campo magnético solo para dirigir nanopartículas a células tumorales no siempre es factible o preciso, por lo que la presente invención proporciona una ventaja permitiendo que las

nanopartículas sean específicamente dirigidas a células tumorales mediante ligandos específicos de tumor. Esto puede permitir que se use menos fármaco y reducir la posibilidad de efectos secundarios, ya que el fármaco sólo se dirige a las células en las que se necesita y no a células sanas.

5 **[0064]** En otro aspecto, las nanopartículas magnéticas de la invención pueden usarse para mejorar la calidad de la obtención de imágenes de resonancia magnética (MRI). La MRI no siempre proporciona suficiente contraste para permitir que se visualicen eficientemente estructuras tales como tumores, pero las imágenes obtenidas pueden potenciarse usando nanopartículas magnéticas como medios de contraste. La sensibilidad potenciada así obtenida permite que se detecten tumores mientras que todavía son muy pequeños y permite la detección de tumores en una fase muy precoz cuando hay más posibilidad de tratamiento satisfactorio.

10 **[0065]** La detección de células tumorales de esta forma también puede combinarse con hipertermia: una vez se identifican las células tumorales, luz láser o luz de IR próxima puede dirigirse al sitio tumoral para destruir las células.

15 **[0066]** Además, en este momento no pueden obtenerse imágenes de los pulmones por escaneo por MRI. La tomografía de emisión de positrones (PET) puede obtener imágenes de los pulmones, pero no puede usarse para pacientes que requieren escaneos regulares tales como pacientes con asma y enfisema debido a los riesgos de la exposición repetida a radiación. El trabajo reciente ha mostrado que la MRI por gas hiperpolarizado puede aplicarse a enfermedades tales como asma ya que la magnetización de estos gases es suficiente para una imagen de un pulmón completo que va a tomarse en los pocos segundos que tarda un paciente en inhalar, contener su respiración y exhalar. La capacidad de tomar imágenes cuando el paciente inhala y exhala también puede producir imágenes
20 dinámicas cuando el paciente inspira y expira usando MRI. Las gliconanopartículas magnetizadas, y en particular aquellas que contienen gadolinio, pueden producirse tan pequeñas como 0,8 nm. Estas pequeñas partículas pueden considerarse eficazmente "un gas magnetizado" y, por tanto, pueden utilizarse para la obtención de imágenes del pulmón en un entorno mucho más conveniente que el uso de gases hiperpolarizados.

25 **[0067]** Las partículas unidas a ligando de la presente invención pueden administrarse específicamente a células tumorales, por lo que incluso células tumorales que se han movido del sitio tumoral original pueden elegirse como diana para terapia.

30 **[0068]** Las realizaciones de la presente invención que tienen un núcleo que comprende metal magnético elemental son particularmente muy adecuadas para aplicaciones de obtención de imágenes ya que el metal elemental es un potenciador más eficiente de la obtención de imágenes que el óxido metálico. La presencia de un metal pasivo en el núcleo es ventajosa ya que inhibe la oxidación del metal magnético. El metal pasivo también aumenta la biocompatibilidad de las nanopartículas y permite que el núcleo se una a ligandos, que además de sus usos biológicos protege adicionalmente el metal magnético de la oxidación y reduce la probabilidad de aglomeración.

35 **[0069]** Otra ventaja de las nanopartículas de la presente invención es su tamaño excepcionalmente pequeño, que hace que sea más probable que sean captadas por células incluso cuando se ligan a moléculas que eligen diana o terapéuticas.

40 **[0070]** En otro aspecto, las nanopartículas magnéticas de la invención pueden usarse para sustituir materiales radiactivos usados como trazadores para la administración de fármacos. El uso de partículas magnéticas en lugar de materiales radiactivos permite que la administración de fármacos se evalúe midiendo variaciones magnéticas, eliminando el posible daño de la radiación.

45 **[0071]** En general, ha sido un problema difícil en la materia detectar o modular interacciones mediadas por hidrato de carbono ya que la unión de hidratos de carbono a otras especies tales como proteínas u otros hidratos de carbono es muy débil y tiende a ser polivalente. Por tanto, para la detección la unión es débil y para modular la interacción, agentes monovalentes sólo han tenido un éxito limitado en la interrupción de interacciones polivalentes basadas en hidrato de carbono.

50 **[0072]** En realizaciones de la invención referentes a interacciones hidrato de carbono-hidrato de carbono pueden identificarse dos tipos de interacción. En interacciones homofílicas, hidratos de carbono idénticos interactúan entre sí y podrían detectarse aumentando regularmente la concentración de partículas que tienen una única especie de ligandos inmovilizado sobre su superficie hasta que se produzca la agregación. Esto puede detectarse por dispersión de la luz o efectos electrónicos.

[0073] Las interacciones heterofílicas pueden detectarse mezclando juntas dos o más nanopartículas diferentes y determinando el estado de agregación de las partículas.

- [0074]** Por tanto, la presente invención proporciona una plataforma versátil para estudiar y modular las interacciones mediadas por hidrato de carbono. Por ejemplo, podrían usarse partículas para detectar anticuerpos dirigidos contra hidrato de carbono, detectar la unión de anticuerpo a los ligandos sobre la partícula mediante dispersión de la luz para detectar la agregación de las partículas, o efectos de campo eléctrico tales como resonancia de plasmones superficiales, que se modificaría cuando los átomos de metal se agruparan juntos en las partículas.
- [0075]** Por tanto, la invención proporciona un procedimiento para determinar si se produce o no una interacción mediada por hidrato de carbono, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una o más especies que se sospecha que interactúan mediante una interacción mediada por hidrato de carbono con las nanopartículas de la invención, y determinar si las nanopartículas modulan o no la interacción mediada por hidrato de carbono.
- [0076]** La invención también proporciona un procedimiento de interrupción de una interacción entre un hidrato de carbono y un componente de unión, comprendiendo el procedimiento poner en contacto el hidrato de carbono y el componente de unión con las nanopartículas de la invención, comprendiendo las nanopartículas un grupo hidrato de carbono que puede interrumpir la interacción del hidrato de carbono y el componente de unión.
- [0077]** En otro aspecto, nanopartículas en las que el ligando es un antígeno pueden administrarse como vacuna, por ejemplo, balísticamente, usando una pistola de administración para acelerar su paso transdérmico a través de la capa externa de la epidermis. Entonces, las nanopartículas pueden ser captadas, por ejemplo, por células dendríticas que maduran a medida que migran por el sistema linfático, produciendo la modulación de la respuesta inmunitaria y la vacunación contra el antígeno.
- [0078]** Las nanopartículas en las que el ligando es ácido nucleico que codifica un antígeno también pueden administrarse como vacuna. Las nanopartículas son particularmente muy adecuadas para tales aplicaciones debido a que las vacunas de ácido nucleico deben entrar en las células individuales para ser eficaces, por lo que es importante que partículas suficientemente pequeñas atraviesen la membrana celular sin dañar las células que se usan.
- [0079]** Las pistolas de administración de vacunas conocidas en la técnica liberan potencia mediante el uso de aire comprimido o gas, normalmente gas helio. Esto puede ser doloroso y produce ronchas en la piel. Las nanopartículas magnéticas de la invención podrían usarse en un sistema de administración alternativo por el que la potencia para administrar las partículas se proporciona mediante la aplicación de un campo magnético. La inversión del campo magnético produciría una rápida aceleración de las nanopartículas, suficiente para impulsarlas por la capa epidérmica externa. Esto reduciría el dolor y la formación de ronchas resultantes del uso de gas comprimido.
- [0080]** En otra aplicación se sabe que los hidratos de carbono de la superficie celular actúan de ligandos para los receptores víricos o bacterianos (llamados adhesinas) y que la unión de los hidratos de carbono a los receptores es un acontecimiento requerido durante la infección. Los hidratos de carbono sintéticos, por ejemplo glicoconjugados, que pueden modular estas interacciones pueden inmovilizarse en las nanopartículas de la invención y usarse como reactivos para estudiar estas interacciones y como agentes terapéuticos para prevenir la infección vírica o bacteriana.
- [0081]** En otra aplicación, la presente invención puede ser útil en la modulación de la respuesta inmunitaria, por ejemplo, tras el trasplante. Como el reconocimiento inmunológico de tejido empieza con interacciones mediadas por hidrato de carbono entre hidratos de carbono de la superficie presentes en tejido trasplantado y los componentes del sistema inmunitario del huésped tales como anticuerpos, entonces ésta puede elegirse como diana para mejorar las reacciones inmunitarias que resultan de esta interacción. A modo de ejemplo, el hidrato de carbono Gal α 1-3Gal β 1-4GlnAc (el epítipo "αGal") se ha implicado como epítipo antigénico importante que participa en el rechazo de tejido trasplantado. Por tanto, la modulación de la interacción del epítipo αGal y el sistema inmunitario puede ser una diana terapéutica para las nanopartículas descritas en este documento.
- [0082]** Una solución alternativa puede ser útil en el tratamiento de cáncer ya que muchos antígenos asociados a tumores o factores autocrinos de tumores se basan en hidratos de carbono. En este caso, las nanopartículas podrían proporcionarse como vacunas para cebar el sistema inmunitario para producir anticuerpos que pueden atacar células tumorales que presentan los hidratos de carbono sobre su superficie. A este respecto, se sabe que muchas células tumorales poseen patrones de glicosilación atípicos que pueden permitir que la respuesta inmunitaria sea estimulada por nanopartículas que van a dirigirse específicamente a células tumorales a diferencia de a células normales sanas. Las nanopartículas también pueden usarse para inhibir metástasis en cáncer, por ejemplo, mediante la migración de células tumorales a través de las células endoteliales.
- [0083]** La detección no invasiva de metástasis de los ganglios linfáticos clínicamente ocultas en cáncer de próstata ya se ha demostrado usando nanopartículas superparamagnéticas linfotrópicas conjuntamente con MRI. A

continuación se enumeran ejemplos de gliconanopartículas que pueden tener afinidad o especificidad aumentada por metástasis.

Le ^x -GNP	Le ^y -GNP	STn-GNP
Globo-H-GNP	Gg ³ -GNP	Gluco-GNP
Malto-GNP	Lacto-GNP	Man-GNP

- [0084]** Además de otros ligandos que pueden estar presentes tales como gliconanopartículas, hormonas tales como estrógeno, DHEA, etc., también pueden unirse a las nanopartículas y solubilizarse. Éstas pueden tener uso en la detección de cánceres tales como de mama. Los péptidos también pueden unirse a nanopartículas que se localizan en receptores específicos tales como receptores oncógenos codificados de la superficie celular. También pueden unirse lípidos, en particular aquellos que se unen a receptores toll. Ligandos químicos tales como azul de metileno pueden unirse a las gliconanopartículas que pueden ser útiles en la detección de metástasis de melanoma. Finalmente, pueden prepararse nanopartículas de ARNip que, después de la captación en la célula, podrían obtener imágenes de la expresión de ARNm de oncogenes o específico de virus.

[0085] En otro aspecto, las nanopartículas pueden usarse como vehículos para producir anticuerpos que pueden unirse específicamente al ligando. Esto es particularmente ventajoso cuando el ligando es un hidrato de carbono, ya que puede ser un problema desafiante en la materia producir anticuerpos contra restos que contienen hidratos de carbono ya que son frecuentemente pequeños y no producen fuertes respuestas inmunitarias.

- [0086]** En otro aspecto, los hidratos de carbono pueden unirse a nanocristales de seleniuro de cadmio para proporcionar puntos cuánticos que luego pueden guiarse a la estructura celular requerida por nanopartículas. Pueden usarse otros aniones tales como sulfuro, además de seleniuro. Los puntos cuánticos tienen posibles usos en la obtención de imágenes biológicas, en tanto dispositivos electrónicos como ópticos, ordenadores cuánticos y el cribado de fármacos candidatos.

- [0087]** En otro aspecto, la presente invención incluye el uso de las nanopartículas definidas en este documento para la evaluación de la recuperación miocárdica, es decir, la cantidad de tejido cardíaco que queda viable después de un infarto de miocardio. En este momento esto se monitoriza predominantemente por técnicas escintigráficas (por ejemplo, SPECT) usando compuestos tales como sestamibi o tetrofosmina, que pueden ser captados por las células, en conjugación con radionúclidos tales como tecnecio. La captación de los trazadores radiactivos es proporcional a la circulación sanguínea regional y, por tanto, da una indicación del grado de recuperación miocárdica – cuanto mayor sea la captación, mayor será la recuperación miocárdica.

- [0088]** Compuestos tales como sestamibi o tetrofosmina funcionan debido a que son complejos catiónicos lipófilos que difunden pasivamente a través de membranas celulares. Los ligando funcionalizados de tales complejos pueden incorporarse fácilmente como ligandos de superficie durante el autoensamblado de nanopartículas magnetizadas. Una amplia variedad de otros ligandos químicos novedosos puede unirse a las nanopartículas para hacerlas libremente difundibles.

- [0089]** Las nanopartículas descritas en este documento pueden autoensamblarse en presencia de derivados de sestamibi, tetrofosmina u otros compuestos que permiten la difusión en células. Entonces, las nanopartículas resultantes pueden usarse para permitir que se monitorice la recuperación miocárdica mediante obtención de imágenes magnéticas sin la necesidad de radioactividad. La obtención de imágenes de resonancia magnética puede usarse para detectar las nanopartículas; al igual que para trazadores radiactivos, la captación de nanopartículas será proporcional a la circulación sanguínea regional. Los trazadores escintigráficos más comúnmente usados en este momento son 99mTc-sestamibi y 99m-tetrofosmina (Recent Advances in 99Tc Radiopharmaceuticals - Annals of Nuclear Medicine 16:79-93 (2003); Contributions of Nuclear Cardiology to Diagnosis and Prognosis of Patients with Coronary Artery Disease – Circulation 2000: 101:1465-1478). En un aspecto preferido, las nanopartículas de la invención están conjugadas a sestamibi y se usan para la obtención de imágenes magnéticas. De esta forma, las nanopartículas pueden usarse para sustituir por 99mTc para monitorizar la recuperación miocárdica.

[0090] En otra aplicación, las nanopartículas magnéticas desveladas en este documento pueden usarse en la producción de medios de grabación magnética.

- [0091]** Las realizaciones de la presente invención se describirán ahora a modo de ejemplo con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de las figuras

[0092]

La Figura 1 muestra las curvas de enfriamiento de campo cero (ZFC, símbolos en negrita) y de enfriamiento de campo (FC, símbolos vacíos) para las gliconanopartículas *lacto*-AuFe (a) y las gliconanopartículas *malto*-AuFe (b).

5 La Figura 2 muestra micrografías electrónicas de transmisión (izquierda) e histogramas de la distribución del tamaño de núcleo (derecha) para las gliconanopartículas *lacto*-AuFe (A) y las gliconanopartículas *malto*-AuFe (B).

La Figura 3 representa esquemáticamente la síntesis de las gliconanopartículas magnéticas.

10 La Figura 4 muestra a) el neoglicoconjugado 1 usado para la preparación de las gliconanopartículas *malto*-Au y la micrografía y el histograma de TEM correspondientes; b) RMN ^1H en D_2O y DMSO-d_6 de las nanopartículas *malto*-Au.

La Figura 5 muestra HRTEM de gliconanopartículas *malto*-Au que muestran la estructura de fcc.

La Figura 6 muestra bucles de histéresis correspondientes a gliconanopartículas *malto*-Au protegidas con oro-tiol de 1,5 nm a 5K. La magnetización se facilita en uem por gramo de oro, es decir, no se asume contribución de la magnetización procedente del ligando.

15 La Figura 7 muestra cambios en los valores de T_1 (A) y T_2 (B) de gliconanopartículas *malto*-Au con concentración creciente de Gd (III).

La Figura 8 muestra cambios en los valores de r_1 (A) y r_2 (B) de gliconanopartículas *malto*-Au con concentración creciente de Gd (III).

Descripción detallada

20 Composiciones farmacéuticas

[0093] Las nanopartículas descritas en este documento o sus derivados pueden formularse en composiciones farmacéuticas y administrarse a pacientes en una variedad de formas. Por tanto, las nanopartículas pueden usarse como medicamento para elección de tumores como diana y terapias hipertérmicas, para el marcado de células y tejidos *in vivo*, o como medios potenciadores del contraste en obtención de imágenes de resonancia magnética.

[0094] Las composiciones farmacéuticas para administración por vía oral pueden ser un comprimido, cápsula, polvo o forma líquida. Un comprimido puede incluir un vehículo sólido tal como gelatina o un adyuvante o un diluyente inerte. Las composiciones farmacéuticas líquidas incluyen generalmente un vehículo líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Pueden incluirse solución salina fisiológica, o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Tales composiciones y preparaciones contienen generalmente al menos el 0,1% en peso del compuesto.

[0095] La administración parenteral incluye administración por las siguientes vías: intravenosa, cutánea o subcutánea, nasal, intramuscular, intraocular, transepitelial, intraperitoneal y tópica (incluyendo dérmica, ocular, rectal, nasal, inhalación y aerosol), y vías sistémicas rectales. Para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o inyección en el sitio de aflicción, el principio activo estará en forma de una disolución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógenos y tiene pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Aquellos expertos en la materia saben bien preparar disoluciones adecuadas usando, por ejemplo, disoluciones de los compuestos o un derivado de los mismos, por ejemplo, en solución salina fisiológica, una dispersión preparada con glicerol, polietilenglicol líquido o aceites.

40 [0096] Además de uno o más de los compuestos, opcionalmente en combinación con otro principio activo, las composiciones pueden comprender uno o más de un excipiente, vehículo, tampón, estabilizador, agente isotonzante, conservante o antioxidante farmacéuticamente aceptables u otros materiales muy conocidos para aquellos expertos en la materia. Tales materiales no deberán ser tóxicos y no deberán interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material puede depender de la vía de administración, por ejemplo, por vía oral o parenteralmente.

50 [0097] Las composiciones farmacéuticas líquidas se formulan normalmente para tener un pH entre aproximadamente 3,0 y 9,0, más preferentemente entre aproximadamente 4,5 y 8,5, y todavía más preferentemente entre aproximadamente 5,0 y 8,0. El pH de una composición puede mantenerse mediante el uso de un tampón tal como acetato, citrato, fosfato, succinato, Tris o histidina, normalmente empleado en el intervalo de aproximadamente 1 mM a 50 mM. El pH de las composiciones puede ajustarse de otro modo usando ácidos o bases fisiológicamente aceptables.

[0098] Los conservantes se incluyen generalmente en composiciones farmacéuticas para retardar el crecimiento microbiano, prolongando la estabilidad en almacén de las composiciones y permitiendo envases de múltiples usos. Ejemplos de conservantes incluyen fenol, meta-cresol, alcohol bencílico, ácido para-hidroxibenzoico y sus ésteres, metilparabeno, propilparabeno, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio. Los conservantes se emplean normalmente en el intervalo de aproximadamente el 0,1 al 1,0% (peso/volumen).

[0099] Preferentemente, las composiciones farmacéuticas se administran a un individuo en una "cantidad profilácticamente eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" (según corresponda, aunque la profilaxis puede considerarse terapia), siendo esto suficiente para mostrar beneficio al individuo. Normalmente, esto será para producir una actividad terapéuticamente útil que proporciona beneficio al individuo. La cantidad real de los compuestos administrados, y la tasa y el transcurso de tiempo de administración, dependerán de la naturaleza y la gravedad de la afección que está tratándose. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre la dosificación, etc., estará dentro de la responsabilidad de los médicos generales y otros doctores médicos, y normalmente tiene en cuenta el trastorno que va a tratarse, la afección del paciente individual, el sitio de administración, el procedimiento de administración y otros factores conocidos para los médicos. Ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente pueden encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania, 19ª edición, 1995, Handbook of Pharmaceutical Additives, 2ª edición (eds. M. Ash y I. Ash), 2001 (Synapse Information Resources, Inc., Endicott, Nueva York, EE.UU.), y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2ª edición, 1994. A modo de ejemplo, y las composiciones se administran preferentemente a pacientes en dosificaciones de entre aproximadamente 0,01 y 100 mg de compuesto activo por kg de peso corporal, y más preferentemente entre aproximadamente 0,5 y 10 mg/kg de peso corporal.

Anticuerpos

[0100] Las nanopartículas pueden usarse como vehículos para fomentar respuestas de anticuerpos frente a los ligandos unidos a las partículas del núcleo. Estos anticuerpos pueden modificarse usando técnicas que son convencionales en la materia. También pueden producirse anticuerpos similares a aquellos ejemplificados por primera vez aquí usando la enseñanza en este documento conjuntamente con procedimientos conocidos. Estos procedimientos de producción de anticuerpos incluyen inmunizar un mamífero (por ejemplo, ratón, rata, conejo, caballo, cabra, oveja o mono) con la(s) nanopartícula(s). Los anticuerpos pueden obtenerse a partir de animales inmunizados usando cualquiera de una variedad de técnicas conocidas en la técnica, y cribarse, preferentemente usando la unión de anticuerpo a antígeno de interés. El aislamiento de anticuerpos y/o células productoras de anticuerpos a partir de un animal puede ir acompañado de una etapa de sacrificio del animal.

[0101] Como alternativa o complemento a inmunizar un mamífero con una nanopartícula, un anticuerpo específico para el ligando y/o nanopartícula puede obtenerse a partir de una biblioteca recombinantemente producida de dominios variables de inmunoglobulinas expresadas, por ejemplo, usando el bacteriófago lambda o el bacteriófago filamentosos que muestra dominios de unión a inmunoglobulina funcionales en sus superficies; por ejemplo, véase el documento WO92/01047. La biblioteca puede ser sin tratamiento previo, que se construye a partir de secuencias obtenidas a partir de un organismo que no ha sido inmunizado con ninguna de las nanopartículas, o puede ser una construida usando secuencias obtenidas a partir de un organismo que ha sido expuesto al antígeno de interés.

[0102] El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en menores cantidades. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse mediante el procedimiento descrito por primer vez por Kohler y Milstein, Nature, 256:495, 1975, o pueden prepararse por procedimientos recombinantes, véase Cabilly y col., patente de EE.UU. nº. 4.816.567, o Mage y Lamoyi en Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, páginas 79-97, Marcel Dekker Inc, Nueva York, 1987.

[0103] En el procedimiento de hibridomas, un ratón u otro animal huésped apropiado se inmuniza con el antígeno por las vías subcutánea, intraperitoneal o intramuscular para provocar que los linfocitos produzcan o puedan producir anticuerpos que se unirán específicamente a las nanopartículas usadas para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Entonces, los linfocitos se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado tal como polietilenglicol para formar una célula de hibridoma, véase Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pág. 59-103 (Academic Press, 1986).

[0104] Las células de hibridoma así preparadas pueden sembrarse y hacerse crecer en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma sin fusionar parentales. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que evitan el crecimiento de células deficientes

en HGPRT.

[0105] Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan expresión de alto nivel estable de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como medio HAT.

5 **[0106]** El medio de cultivo en el que están creciendo las células de hibridoma se ensaya para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra las nanopartículas/ligandos. Preferentemente, la especificidad de unión se determina por ensayo de inmunoabsorbancia ligado a enzimas (ELISA). Los anticuerpos monoclonales de la invención son aquellos que se unen específicamente a las nanopartículas/ligandos.

10 **[0107]** En una realización preferida de la invención, el anticuerpo monoclonal tendrá una afinidad que es superior a micromolar o una afinidad mayor (es decir, una afinidad superior a 10^{-6} mol) como se determina, por ejemplo, por análisis de Scatchard, véase Munson & Pollard, Anal. Biochem., 107:220, 1980.

15 **[0108]** Después de identificar que las células de hibridoma producen anticuerpos neutralizantes de la especificidad y afinidad deseadas, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y hacerse crecer por procedimientos convencionales. Medios de cultivo adecuados para este fin incluyen medio Eagle modificado por Dulbecco o medio RPM1-1640. Además, las células de hibridoma pueden hacerse crecer *in vivo* como tumores de ascitis en un animal.

20 **[0109]** Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido ascítico o suero por procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía en hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

25 **[0110]** El ácido nucleico que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención puede aislarse fácilmente y secuenciarse usando procedimientos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos. Las células de hibridoma de la invención son una fuente preferida de ácido nucleico que codifica los anticuerpos o fragmentos de los mismos. Una vez aislado, el ácido nucleico se liga a vectores de expresión o de clonación, que luego se transfectan en células huésped, que pueden cultivarse de manera que los anticuerpos monoclonales se produzcan en el cultivo de células huésped recombinantes.

30 **[0111]** Los hibridomas que pueden producir anticuerpo con características de unión deseadas están dentro del alcance de la presente invención ya que son células huésped que contienen anticuerpos que codifican ácidos nucleicos (incluyendo fragmentos de anticuerpos) y que son capaces de su expresión. La invención también proporciona procedimientos de producción de los anticuerpos que incluyen hacer crecer una célula que puede producir el anticuerpo en condiciones en las que el anticuerpo se produce, y preferentemente se secreta.

35 **[0112]** Los anticuerpos según la presente invención pueden modificarse en varias formas. De hecho, el término "anticuerpo" debería interpretarse como que cubre cualquier sustancia de unión que tiene un dominio de unión con la especificidad requerida. Por tanto, la invención cubre fragmentos de anticuerpos, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos que incluyen moléculas sintéticas y moléculas cuya forma imita a la de un anticuerpo permitiendo que se una a un antígeno o epítipo, aquí un ligando de hidrato de carbono como se define en este documento.

40 **[0113]** Ejemplos de fragmentos de anticuerpos que pueden unirse a un antígeno u otro componente de unión son el fragmento Fab que está constituido por los dominios VL, VH, Cl y CH1; el fragmento Fd que está constituido por los dominios VH y CH1; el fragmento Fv que está constituido por los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo; el fragmento dAb que está constituido por un dominio VH; regiones CDR aisladas y fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab ligados por un puente disulfuro en la región bisagra. También están incluidos fragmentos Fv monocatenarios.

45 **[0114]** Un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal según la presente invención puede someterse a mutación genética u otros cambios. Se entenderá adicionalmente por aquellos expertos en la materia que un anticuerpo monoclonal puede someterse a las técnicas de tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos, anticuerpos humanizados o moléculas quiméricas que conservan la especificidad del anticuerpo original. Tales técnicas pueden implicar introducir ADN que codifica la región variable de inmunoglobulina, o las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), de un anticuerpo con las regiones constantes, o regiones constantes más regiones estructurales, de una inmunoglobulina diferente. Véanse, por ejemplo, los documentos EP 0 184 187 A, GB 2 188 638 A o EP 0 239 400 A. La clonación y la expresión de anticuerpos quiméricos se describen en los documentos EP 0 120 694 A y EP 0 125 023 A.

Sección experimental

Ejemplo 1 - Nanopartículas de Au-Fe

[0115] Se creó un procedimiento de síntesis de gliconanopartículas magnéticas covalentemente unidas a ligandos. A modo de ejemplo, se prepararon neoglicoconjugados 1 y 2 derivatizados con tiol de dos oligosacáridos significativos, el disacárido no antigénico maltosa ($\text{Glc}\alpha(1\rightarrow4)\text{Glc}\beta(1\text{-OR})$) y la lactosa antigénica ($\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{Gal}\beta(1\text{-OR})$), para funcionalizar *in situ* nanopartículas magnéticas (Figura 3, esquema 1). La síntesis de los disulfuros 1 y 2 se llevó a cabo por glicosidación de los derivados de maltosa y lactosa convenientemente protegidos con 11-acetiltio-undecanol y 11-acetiltio-3,6,9-trioxa-undecanol, respectivamente [12]. Ambos ligadores se han usado para probar la influencia de su naturaleza hidrófoba o hidrófila en las propiedades del material completo. Los compuestos 1 y 2 se aislaron como formas de disulfuro y se usaron en esta forma para la preparación de gliconanopartículas protegidas de oro-hierro. Las gliconanopartículas solubles en agua **1-AuFe** (*malto*-AuFe) y **2-AuFe** (*lacto*-AuFe) se obtuvieron en mezclas de metanol/agua usando síntesis de una etapa. FeCl_3 y HAuCl_4 en una relación 1:4 se redujeron con NaBH_4 en presencia de los disulfuros **1** ó **2**. La protección del núcleo de metal con las monocapas de neoglicoconjugado produce nanoagrupaciones altamente estables y biofuncionales. Se han purificado por medio de filtración centrífuga y se han caracterizado por RMN ^1H , UV-vis, ICP, TEM, EDX y SQUID.

[0116] Los análisis de hierro de la partícula, llevados a cabo por medio de espectrometría de emisión atómica por plasma inductivamente acoplado (ICP), indicaron el 0,27% y el 2,81% de contenido de hierro para **1-AuFe** y para **2-AuFe**, respectivamente. Estos datos se corresponden con una relación promedio de Au:Fe de 5:0,1 y 5:1 respectivamente. La Figura 1 muestra las curvas de magnetización de enfriamiento de campo cero y de enfriamiento de campo obtenidas a partir de las nanopartículas *lacto*-AuFe (A) y *malto*-AuFe (B) por medio del dispositivo de interferencia de cuántos superconductores (SQUID) entre 5k y 300k en un campo de 500Oe. A partir de las mediciones magnéticas se deduce que está presente tanto un comportamiento superparamagnético como ferromagnético entre 5k y 300k. Las mediciones con SQUID confirman el carácter superparamagnético de las gliconanopartículas que tienen una temperatura de bloqueo (T_b) inferior a 5K (Fig. 1), que sería de esperar para una nanopartícula magnética de 2 nm de diámetro. El componente superparamagnético se observa claramente a partir de a) el ajuste parcial de la dependencia térmica experimental de la magnetización a la ley de Curie-Weiss; b) la dependencia parcial del bucle de histéresis de la relación entre el campo aplicado y la temperatura (H/T); y c) la diferencia entre las curvas de ZFC y FC.

[0117] La Figura 2 muestra micrografías electrónicas de transmisión (izquierda) e histogramas de la distribución de tamaño del núcleo (derecha) para las nanopartículas *lacto*-AuFe (A) y *malto*-AuFe (B). Cada punto negro se corresponde con una única partícula. Los puntos están regularmente separados por los ligandos (neoglicoconjugado) unidos al núcleo y forman monocapas ordenadas. La TEM se registró a una energía del haz de electrones de 200 kV en un microscopio Philips CM200.

[0118] En el caso de la muestra **2-AuFe** (*lacto*-AuFe), las gliconanopartículas están dispersas, son esféricas y homogéneas. Se evaluó que el diámetro medio de la agrupación de oro/hierro era 2 nm. Se han encontrado unas pocas partículas aisladas con un tamaño de aproximadamente 10 nm en algunas regiones de la red, pero estas partículas no se han incluido en el histograma. En el caso de la muestra **1-AuFe** (*malto*-AuFe), la gliconanopartícula presenta una distribución bimodal del tamaño de partícula, como se indica por el histograma correspondiente (Fig. 2B). Se han encontrado partículas con un diámetro medio de la agrupación de oro/hierro de aproximadamente 2,5 nm e inferior a 1,5 nm. Es digno de mención la formación espontánea de cadenas alineadas en regiones extendidas de la red, que indica una fuerza magnetostática adicional (Fig. 2B). Este comportamiento podría atribuirse a fuerzas magnéticas dipolo-dipolo o a tunelaje cuántico entre las nanopartículas. La disposición alineada no se observó en las micrografías obtenidas a partir de los nanopuntos de **2-AuFe**, aunque se observa una monocapa altamente ordenada.

45 Preparación

[0119] **MaltoC₁₁SauFe**: Se añadió una disolución de FeCl_3 (2 mg; 0,013 mmol; 0,25 equiv) en agua (0,5 ml) a una disolución de disulfuro 1 (80 mg; 0,075 mmol; 3 equiv) en MeOH (11,5 ml) seguido de la adición de una disolución de HAuCl_4 (17 mg; 0,05 mmol; 1 equiv) en agua (2 ml). Entonces se añadió NaBH_4 1 M (52 mg; 1,38 mmol; 27,5 equiv) en pequeñas porciones con agitación rápida. La suspensión negra formada se agitó durante 2 h adicionales y el disolvente se eliminó a vacío. Las gliconanopartículas son insolubles en MeOH, pero solubles en agua.

LactoEG₄SauFe: Se añadió una disolución de FeCl_3 (1 mg; 0,0065 mmol; 0,25 equiv) en agua (0,25 ml) a una disolución de disulfuro 2 (70 mg; 0,07 mmol; 5,5 equiv) en MeOH (12 ml) seguido de la adición de una disolución de HAuCl_4 (8 mg; 0,025 mmol; 1 equiv) en agua (1 ml). Entonces se añadió NaBH_4 1 M (26 mg; 0,69 mmol; 27,5 equiv) en pequeñas porciones con agitación rápida. La suspensión negra formada se agitó durante 2 h adicionales y el disolvente se eliminó a vacío. Las gliconanopartículas son insolubles en MeOH, pero solubles en agua.

[0120] Purificación: La purificación se realizó por filtración centrífuga. El producto bruto se disolvió en agua (~15 ml) NANOpure y la disolución se cargó en un dispositivo de filtro centrífugo (CENTRIPLUS YM30, MICROCON, MWCO= 30000) y se sometió a centrifugación (3000 x g, 40 min). El residuo de gliconanopartículas oscuro se lavó con MeOH y agua y el procedimiento se repitió varias veces hasta que el material de partida ya no pudo detectarse por cromatografía en capa fina (CCF). El residuo se disolvió en agua y se centrifugó varias veces para eliminar materiales insolubles. La disolución transparente se liofilizó y los productos obtenidos estuvieron libres de sales y de material de partida (ausencia de señales de disulfuro e iones Na^+ en espectroscopia de RMN ^1H y ^{23}Na).

[0121] Caracterización: El examen de TEM de las muestras se llevó a cabo a 200 KV (microscopio Philips CM200). Una única gota (20 μl) de las disoluciones acuosas de las gliconanopartículas de Au/Fe se colocó sobre una rejilla de cobre recubierta de una película de carbono. La rejilla se dejó secar al aire durante varias horas a temperatura ambiente. Las distribuciones del tamaño de partícula de las agrupaciones de Au/Fe se evaluaron a partir de varias micrografías usando un analizador de obtención de imágenes automático. El análisis de EDX se realizó con un equipo Philips DX4 unido al microscopio. El análisis de ICP se realizó por Agriquem S.L. siguiendo el protocolo de PEC-009. Se obtuvieron espectros de UV mediante un espectrofotómetro de UV/vis Perkin Elmer Lambda 12. Los espectros de RMN ^1H se adquirieron en espectrómetros Bruker DRX-500 y los desplazamientos químicos se facilitan en ppm (δ) con respecto a D_2O .

[0122] 1-AuFe: TEM: diámetro promedio del núcleo metálico, 1,5 y 2,5 nm.

ICP: 0,27% de Fe

UV (H_2O): $\lambda = 500$ nm, resonancia de plasmones superficiales RMN ^1H (500 MHz, D_2O) δ : 5,32 (s, 1H, H-1'), 4,37 (s, 1H, H-1), 4,00-3,30 (m, 13H), 2,70 (s, 2H, CH_2S), 1,85-1,20 (m, 17H)

[0123] 2-AuFe: TEM: diámetro promedio del núcleo metálico, 2 nm.

ICP: 2,81% de Fe

UV (H_2O): $\lambda = 500$ nm, resonancia de plasmones superficiales RMN ^1H (500 MHz, D_2O) δ : 4,49 (da, 1H, H-1'), 4,40 (sa, 1H, H-1), 4,10-3,30 (m, 23H), 2,92 (m, 0,5H).

25 Ejemplo comparativo (Ejemplo 2) - Nanopartículas de Au magnéticas

[0124] Se prepararon gliconanopartículas de oro (GNP) solubles en agua estabilizadas con monocapas autoensambladas (SAM) de diferentes moléculas de hidrato de carbono mediante la reducción química de un precursor de sal metálica en disolución acuosa en presencia de un exceso de neoglicoconjugados derivatizados con tiol. El procedimiento de preparación de muestras usó como punto de partida el Penadés y col. [11] [19] que produce GNP de oro en las que la agrupación metálica se ha protegido y funcionalizado al mismo tiempo con la molécula orgánica. La formación de enlaces covalentes Au-S aísla la agrupación metálica, previniendo su crecimiento (diámetro del núcleo ≈ 2 nm) y confiere a las nanoagrupaciones estabilidad excepcional en disolución.

[0125] En este ejemplo, los inventores informan de la observación experimental de histéresis magnética hasta temperatura ambiente en gliconanopartículas de oro con diámetros promedio de 1,4 y 1,5 nm. Aumentando la relación de tiol:oro en el procedimiento de Penadés pueden obtenerse muestras de GNP con diámetro inferior a 1,5 nm. Esto se ilustra por la preparación y las propiedades magnéticas de Au-GNP obtenidas usando el neoglicoconjugado de maltosa 1 como especie ligadora de tiol (Figura 4).

Preparación de gliconanopartículas de oro **malto-Au**:

[0126] Una disolución acuosa de ácido tetracloroáurico (HAuCl_4 , 0,018 mmol) y un exceso de neoglicoconjugado de disulfuro 1 (0,2 mmol) se redujo con borohidruro de sodio (NaBH_4 , 22 equiv) a temperatura ambiente. Inmediatamente se formó una suspensión marrón. La suspensión se agitó durante aproximadamente dos horas, luego el disolvente se eliminó y las gliconanopartículas (GNP) se purificaron lavando con agua y filtración centrífuga (CENTRIPLUS, Mr 30000, 1 h, 3000xg). El residuo en el filtro se disolvió en agua y se liofilizó. Las GNP se caracterizaron por microscopía electrónica de transmisión (TEM), y espectroscopia de RMN ^1H y UV-visible, plasma de acoplamiento inducido (ICP) y análisis elemental. TEM: diámetro promedio y; número de átomos de Au, 1,5 nm y 79, respectivamente. UV-VIS (H_2O): $\lambda = 520$ nm. ICP: 28% de Au. Análisis elemental calculado para $(\text{C}_{23}\text{H}_{43}\text{O}_{11}\text{S})_n\text{Au}_n$ ($n = 79$): C 38,18; H 5,98; S 4,40; Au 27,18. Hallado: C 39,5; H 6,07; Au 28,0.

[0127] La Figura 4 muestra en a) el esquema de síntesis para las GNP **malto-Au** y las micrografías de TEM correspondientes para las GNP **malto-Au** y los histogramas de distribución del tamaño de partícula correspondientes para las muestras; y en b) también se muestran los espectros de RMN ^1H en D_2O y en DMSO-d_6 . Las GNP **malto-Au** presentan en todos los casos una estrecha distribución del tamaño de partícula con un tamaño

promedio de 1,5 nm o menos. En la Figura 5 se muestra la micrografía electrónica de alta resolución (HRTEM) que indica la estructura fcc de las GNP **malto-Au** protegidas con tiol.

[0128] La magnetometría con el dispositivo de interferencia de cuántos superconductores (SQUID) indicó comportamiento ferromagnético incluso hasta temperatura ambiente. El bucle de histéresis medido a 5K presenta un campo coercitivo de 120 Oe. Se encontró que la temperatura de bloqueo, obtenida a partir de la dependencia térmica de la coercividad, era 395K, que se corresponde con una constante de anisotropía eficaz de 10 meV/átomo que es similar a la observada en un único átomo de Co sobre superficie de platino (III) [20]. La magnetización no cumplió la ley de Curie-Weiss, pero mostró una dependencia de la T mucho más lenta. Se derivó un momento magnético atómico de aproximadamente 0,003 μ_B por átomo de Au de mediciones magnéticas a baja T.

[0129] La Figura 6 muestra los bucles de histéresis medidos a 5K para GNP de oro **malto-Au** protegidas con tiol. De la Figura 5 es evidente que el procedimiento de magnetización de gliconanopartículas protegidas con tiol presenta comportamiento similar ya que los materiales ferromagnéticos típicos describen bucles de histéresis incluso a temperatura ambiente. Además, se observó que las muestras no se saturan a ninguna temperatura. Se miden valores de remanencia de aproximadamente la mitad del valor de magnetización a 1T, que implica que los átomos, además de las GNP, mantienen un momento magnético permanente y que el sistema de GNP de oro está constituido por un ensamblaje de momentos magnéticos de orientación aleatoriamente distribuida.

[0130] Podría argumentarse si el comportamiento observado es debido o no a la presencia de impurezas ferromagnéticas. El análisis de plasma inductivo acoplado (ICP) indicó que la cantidad de impurezas de Fe (0,007% en peso) en **malto-Au** es muy bajo para explicar los valores de magnetización obtenidos. A pesar de ese análisis se han preparado muestras de GNP de Fe **malto-Au** que contienen el 0,2% en peso de hierro para caracterizar la influencia del Fe sobre el comportamiento magnético. La Figura 6 muestra los bucles de histéresis medidos a 5K para ambos conjuntos de GNP. Es evidente que la presencia de cantidades elevadas de hierro (impurezas ferromagnéticas) en las nanopartículas **malto-AuFe** reduce el comportamiento ferromagnético a esta temperatura, mientras que el bucle de histéresis todavía sigue para muestras de **malto-Au**. Como las GNP están dispersas, las interacciones entre partículas sólo pueden ser de naturaleza magnetostática. La distancia promedio entre núcleos de oro se determina por la longitud de dos moléculas consecutivas del neoglicoconjugado de maltosa 1 (6 nm). Como el momento magnético permanente de cada partícula es muy bajo, el campo magnético que actúa sobre una GNP por una única GNP vecina es inferior a 10 Oe. Por tanto, puede omitirse la influencia de los campos de dispersión.

[0131] Como el Au en masa es diamagnético, el comportamiento ferromagnético puede ser debido a la combinación de tanto el tamaño como los efectos de unión [21]. La discreta estructura de energía electrónica [22], la presencia de defectos de apilamiento [23], además del porcentaje extremadamente alto ($\geq 80\%$) de átomos de la superficie [24] unidos covalentemente a S, pueden ser la posible causa de la aparición de ferromagnetismo.

[0132] En conclusión, se ha mostrado (Figura 6) que gliconanopartículas de oro muy pequeñas protegidas con tiol presentan un magnetismo permanente localizado a diferencia de la característica de diamagnetismo metálica de otras nanopartículas de oro no protegidas con tiol u oro en masa. Esta observación señala que la unión tiol-oro induce en gliconanopartículas de oro momentos magnéticos permanentes probablemente asociados a los orificios d adicionales localizados próximos a los enlaces de Au. Esto sugiere la aplicación tecnológica de las nanopartículas de la presente invención para la grabación magnética. Además, la solubilidad en agua y la marca biológica de estas GNP amplifican enormemente su aplicación en el campo biológico.

40 **Ejemplo 3 - Nanopartículas de Au-Gd (III)**

[0133] La gliconanopartícula (GNP) de oro puede complejarse con Gd (III) y otros lantánidos para dar un nuevo agente de contraste. Los ligandos neoglicoconjugados presentes en las GNP (60 a 100 moléculas) son el resto quelante.

[0134] Preparación de gliconanopartículas lactoEG₄-Au(Gd): A una disolución de la gliconanopartícula de oro (20,0 mg) correspondiente en agua (1 ml) se añadió una disolución de GdCl₃ (0,5 M, 1,08 ml). La mezcla se agitó en ausencia de luz durante 20 h. La disolución se filtró por centrifugación (MICROCON YM30, 13000 rpm, 8 min). El residuo se lavó (8 x 0,5 ml, metanol/agua, 1/3). Las nanopartículas se disolvieron en agua y se liofilizaron para dar 17,5 mg de nanopartículas violetas oscuras. TEM: diámetro promedio 2,5 nm. EDX: Gd 6,8%; Au 33,2% atómico.

[0135] Determinación de relaxividades: Los tiempos de relajación de RMN ¹H T₁ y T₂ (37°C, pH 7,2) de los protones del agua en disolución acuosa se midieron a 1,5 Tesla en un espectrómetro de RMN Bruker Minispec. Los valores de T₁ se determinaron por el procedimiento de recuperación de la inversión y los valores de T₂ se determinaron por la secuencia de Carr-Purcell-Maiboom-Gill. Se prepararon disoluciones de las nanopartículas **lacto-Au(Gd)** a cinco concentraciones diferentes (0,01, 0,1, 1, 10, 100 μ g/ml) en tampón Hepes con 150 mM de NaCl. Las relaxividades se calcularon a partir de las diferencias en las tasas de relajación longitudinal y transversal

($1/T_{1(2)}$) de los protones del agua en presencia y ausencia de las gliconanopartículas, y la concentración de Gd(III) se expresó en mM. Las Figuras 7 y 8 muestran los resultados.

[0136] En conclusión, en los ejemplos mostrados en este documento los inventores han desarrollado una metodología simple para preparar nanopartículas superparamagnéticas solubles en agua covalentemente ligadas a oligosacáridos antigénicos. La metodología puede extenderse a la preparación de nanopartículas híbridas que incorporan hidratos de carbono y otras moléculas. Las interacciones hidrato de carbono-receptor pueden dirigir las gliconanopartículas magnéticas a células diana y tejidos permitiendo su marcado selectivo. Esto demuestra que este tipo de gliconanopartículas magnéticas polivalentes complementa las nanopartículas magnéticas bioactivas apenas disponibles [9] [10] [17]. En consecuencia, la fácil preparación y purificación, el pequeño tamaño del núcleo y su estabilidad y solubilidad en condiciones fisiológicas de nanopartículas de la presente invención convierten estas herramientas en posibles candidatos para aplicaciones de diagnóstico, de elección de tumores como diana [15], de hipertermia [16] y de obtención de imágenes de resonancia magnética [17].

[1] Niemeyer, C.M. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 4128-4158.

[2] Bergemann, C.; Muller-Schulte, D.; Oster, J.; Brassard, L.; Lübke, A.S. *J. Magn. Magn. Mater.* 1999, 194, 45.

[3] Whitesides, G.M.; Kazlauskas R.J.; Josephson L. *Trends Biotechnol.* 1983, 1, 144-148.

[4] Sun, S.; Murray, C.B.; Weller, D.; Folks, L.; Moser, A. *Science* 2000, 287, 1989.

[5] a) Shafi, K.V.P.M.; Gedanken, A.; Prozorov, R. *Adv. Matter*, 1998, 10, 590-593. b) Fried, T.; Shemer, G.; Markovich, G. *Adv. Mater.* 2001, 13, 1158-1161. c) Moumen, N.; Veillet, P.; Pileni, M.P.. *J. Magn. Magn. Mater.* 1995, 149, 67-71.

[6] Park, S.-J.; Kim, S.; Lee, S.; Khim, Z.G.; Char, K.; Hyeon, T. *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 8581-8282.

[7] a) Suslick, K.S.; Fang, M.; Hyeon, T. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 11960-11961. b) Sun, S.; Zeng H. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 8204-8205. c) Guo, Q.; Teng, X.; Rahman, S.; Yang, H. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 630-631.

[8] Sun, S.; Anders, S.; Hamann H.F.; Thiele, J.-U.; Baglin, J.E.E.; Thomson, T.; Fullerton, E.E.; Murray, C.B.; Terris, B.D. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 2884-2885.

[9] a) Josephson, L.; Tung, C.-H.; Moore, A.; Weissleder, R. *Bioconjugate Chem.* 1999, 10, 186-191. b) Lewin, M.; Carlesso, N.; Tung, C.-H.; Tang, X.-W.; Cory, D.; Scadden, D.T.; Weissleder, R. *Nat. Biotechnol.* 2000, 18, 410-414.

[10] Josephson, L.; Pérez, J.M.; Weissleder, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 3204-3206.

[11] de la Fuente, J.M.; Barrientos, A.G.; Rojas, T.C.; Rojo, J.; Cañada, J.; Fernández, A.; Penadés, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 2257-2261.

[12] Barrientos, A.G.; de la Fuente, J.M.; Rojas, T.C.; Fernández, A.; Penadés, S. *Chem. Eur. J.* 2002, 9, 1909-2001.

[13] Hernáiz, M.J.; de la Fuente, J.M.; Barrientos, A.G.; Penadés, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, 41, 1554-1557.

[14] Zhou, W.L.; Carpenter, E.E.; Lin, J.; Kumbhar, A.; Sims, J.; O'Connor, C.J. *Eur. Phys. J. D.* 2001, 16, 289-292.

[15] Mykhaylyk O.; Cherchenko A.; Ilkin A.; Dudchenko N.; Ruditsa V.; Novoseletz M.; Zozulya Y. *J. Magn. Magn. Mater.* 2001, 225, 241-247.

[16] Jordan, A.; Scholz, R.; Wust, P.; Fähling, H.; Felix, R. *J. Magn. Magn. Mater.* 1999, 201, 413-419.

[17] Josephson, L.; Kircher M.F.; Mahmood, U.; Tang, Y.; Weissleder R. *Bioconjugate Chem.* 2002, 13, 554-560.

[18] Taton y col, *Science* 2000 289:1757-1760.

[19] Barrientos A.G. y col., *Chem. Eur. J.* 9, 2003, 1909-1921.

[20] Gambardela, P. y col, Giant Magnetic Anisotropy of Single Cobalt Atoms and Nanoparticles, *Science*,

2003, 300, 1130-1133.

[21] Di Felice, R., Selloni, A., Molinari, E., J. Phys. Chem. B., 2003, 107, 1151-1156.

[22] D. Davidovic and M. Tinkham, Phys. Rev. Lett., 1999, 83 (8), 1644-1647.

[23] Vitos, L., Johansson, B., Phys. Rev. B., 2000, 62 (18), R11957.

5

[24] Villás, I.M.L., Chàtelain, A., de Heer, W.A., Science, 1994, 265, 1682- 1684.

REIVINDICACIONES

1. Una nanopartícula magnética que tiene un núcleo que es un material compuesto que comprende átomos de metal pasivo y átomos de metal magnético, en la que la relación de átomos de metal pasivo con respecto a átomos de metal magnético en el núcleo está entre 5:0,1 y 2:5 y los átomos de metal pasivo son átomos de oro, platino, plata o cobre y los átomos de metal magnético son átomos de hierro, cobalto o gadolinio, y en la que el núcleo está covalentemente ligado a una pluralidad de ligandos, al menos uno de los cuales comprende un grupo hidrato de carbono.
2. La nanopartícula magnética de la reivindicación 1, en la que el núcleo de la nanopartícula tiene un diámetro medio inferior a 5 nm.
3. La nanopartícula magnética de una cualquiera de la reivindicación precedente 1 o la reivindicación 2, en la que el núcleo está formado a partir átomos de Au/Fe, Au/Gd, Au/Fe/Cu, Au/Fe/Gd o Au/Fe/Cu/Gd.
4. La nanopartícula magnética de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la relación de átomos de metal pasivo con respecto a átomos de metal magnético en el núcleo está entre 5:0,1 y 5:1.
5. La nanopartícula magnética de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el metal pasivo es oro y el metal magnético es hierro.
6. La nanopartícula magnética de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que al menos uno de los ligandos incorpora un lantánido.
7. La nanopartícula magnética de la reivindicación 6, en la que el lantánido es gadolinio.
8. La nanopartícula magnética de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la nanopartícula comprende un átomo activo para RMN.
9. La nanopartícula magnética de la reivindicación 8, en la que los átomos activos para RMN son Mn^{+2} , Gd^{+3} , Eu^{+2} , Cu^{+2} , V^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Fe^{+2} , Fe^{+3} o un lantánido⁺³.
10. La nanopartícula magnética de la reivindicación 1, en la que el grupo hidrato de carbono comprende un grupo polisacárido, oligosacárido o monosacárido.
11. La nanopartícula magnética de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que al menos uno de los ligandos comprende un glicanoconjugado.
12. La nanopartícula magnética de la reivindicación 11, en la que el glicanoconjugado es un glicolípido o una glicoproteína.
13. La nanopartícula magnética de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que al menos uno de los ligandos está ligado al núcleo mediante un grupo sulfuro.
14. La nanopartícula magnética de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la nanopartícula comprende una marca.
15. La nanopartícula magnética de la reivindicación 14, en la que la marca es un grupo fluorescente o un isótopo radiactivo o un átomo activo para RMN.
16. La nanopartícula magnética de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que al menos uno de los ligandos comprende un péptido o una proteína.
17. La nanopartícula magnética de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que al menos uno de los ligandos comprende una molécula de ácido nucleico.
18. La nanopartícula magnética de la reivindicación 17, en la que la molécula de ácido nucleico es una molécula de ADN o de ARN, o un ligando de ARNip o de miARN.
19. La nanopartícula magnética de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la nanopartícula comprende un componente farmacéuticamente activo.
20. La nanopartícula magnética de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el núcleo está ligado a al menos 20 ligandos.
21. La nanopartícula magnética de la reivindicación 20, en la que el núcleo está ligado a al menos 50 ligandos.

22. La nanopartícula magnética de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, la nanopartícula es soluble en agua.
23. La nanopartícula magnética de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende una pluralidad de especies de grupo de ligandos.
- 5 24. La nanopartícula magnética de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que los ligandos están covalentemente unidos al núcleo por un grupo ligador.
25. La nanopartícula magnética de la reivindicación 24, en la que el grupo ligador comprende un grupo disulfuro.
- 10 26. Una composición que comprende una población de una o más de las nanopartículas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25.
27. La composición de la reivindicación 26 que comprende una pluralidad de nanopartículas que tienen diferentes grupos de ligandos.
28. Una composición que comprende una población de una o más de las nanopartículas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 para uso en terapia.
- 15 29. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28, cuya composición es un coloide.
30. El coloide de la reivindicación 29, en el que las nanopartículas tienen un diámetro medio inferior a 2 nm; y/o en el que el coloide es estable durante al menos aproximadamente 1 año.
31. Una nanopartícula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 o una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 30 para uso en un procedimiento para vacunar un paciente con un antígeno, en la que el ligando unido al núcleo de la nanopartícula comprende el antígeno.
- 20 32. La nanopartícula o composición para uso en un procedimiento según la reivindicación 31, en la que la vacuna se administra por aplicación de un campo magnético.
33. Una nanopartícula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 o una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 31 para uso en un procedimiento para vacunar un paciente con ácido nucleico que codifica un antígeno, en la que el ligando unido al núcleo de la nanopartícula comprende el ácido nucleico.
- 25 34. Uso de una nanopartícula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 o una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 30 como agente de contraste para la obtención de imágenes de resonancia magnética.
- 30 35. El uso de la reivindicación 34, en el que el reactivo es para uso en la obtención de imágenes de los pulmones de un paciente.
36. El uso de la reivindicación 35, en el que el reactivo de obtención de imágenes es para uso en el diagnóstico o el tratamiento de asma y enfisema.
37. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 34 a 36, en el que las nanopartículas comprenden gadolinio y tienen un diámetro de núcleo inferior a 1,0 nm.
- 35 38. Una nanopartícula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 o una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 30 para uso en un procedimiento para tratar cáncer.
39. La nanopartícula o composición para uso en un procedimiento de la reivindicación 38, en la que el cáncer es un tumor.
- 40 40. La nanopartícula o composición para uso en un procedimiento de la reivindicación 39, en la que el tumor se expone a un campo magnético de alta frecuencia o el tumor se expone a luz infrarroja para calentar las nanopartículas y destruir tejido tumoral.
41. La nanopartícula o composición para uso en un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 38 a 40, en la que la nanopartícula comprende un ligando que es un antígeno asociado a tumor o factor autocrino tumoral.
- 45 42. La nanopartícula o composición para uso en un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 38 a 41, en la que el ligando es un hidrato de carbono.

43. La nanopartícula o composición para uso en un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 38 a 42, en la que el tratamiento de cáncer es la inhibición de metástasis.
44. La nanopartícula o composición para uso en un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 38 a 43, en la que los ligandos comprenden un hidrato de carbono con especificidad o afinidad por metástasis, una hormona, DHEA, un péptido que puede unirse a un receptor específico de célula, un lípido para unirse a un receptor toll o azul de metileno para unirse a células de melanoma metastatizantes.
45. Una nanopartícula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 o una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 30 para uso en un procedimiento para la recuperación miocárdica.
46. Un procedimiento de preparación de nanopartículas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, en el que las nanopartículas comprenden un núcleo que comprende átomos de oro y opcionalmente átomos de hierro, núcleo que está covalentemente ligado a una pluralidad de ligandos, comprendiendo el procedimiento:
- (a) sintetizar un derivado de sulfuro del ligando; y
 - (b) hacer reaccionar el ligando derivatizado de sulfuro con HAuCl_4 (ácido tetracloroáurico), y opcionalmente con una sal férrica en la que los átomos de hierro están presentes en el núcleo, en presencia de un agente reductor para producir las partículas.
47. El procedimiento de la reivindicación 46, en el que la etapa (b) comprende derivatizar el ligando con un ligador.
48. El procedimiento de la reivindicación 47, en el que el ligador es un ligador de disulfuro.
49. El procedimiento de la reivindicación 48, en el que el grupo de ligador de disulfuro está representado por la fórmula general $\text{HO}-(\text{CH}_2)_n-\text{S}-\text{S}-(\text{CH}_2)_m-\text{OH}$ en la que n y m son independientemente números enteros entre 1 y 5.
50. El procedimiento de la reivindicación 48, en el que el ligando está derivatizado como un disulfuro protegido.
51. Un procedimiento *ex vivo* de interrumpir una interacción entre un hidrato de carbono y un componente de unión, comprendiendo el procedimiento poner en contacto el hidrato de carbono y el componente de unión con nanopartículas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, en el que los ligandos unidos a las nanopartículas comprenden un grupo hidrato de carbono que puede interrumpir la interacción del hidrato de carbono y el componente de unión.
52. Un procedimiento *ex vivo* de cribado de sustancias que pueden unirse a un ligando, comprendiendo el procedimiento (a) poner en contacto las nanopartículas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 con uno o más compuestos candidatos y (b) determinar si los compuestos candidatos se unen al ligando.
53. Un procedimiento de determinación de la presencia en una muestra de una sustancia que puede unirse a un ligando, comprendiendo el procedimiento (a) poner en contacto la muestra con las nanopartículas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 de manera que la sustancia se una al ligando de las nanopartículas y (b) determinar si la unión tiene lugar.
54. El procedimiento de la reivindicación 53 que comprende además la etapa de establecer una correlación de la presencia o ausencia de unión con el diagnóstico de un estado de enfermedad asociado a la presencia de la sustancia.
55. El procedimiento de la reivindicación 53 o la reivindicación 54, en el que la sustancia es un anticuerpo que puede unirse al ligando.
56. Un procedimiento *ex vivo* de determinación de si se produce o no una interacción mediada por hidrato de carbono, comprendiendo el procedimiento (a) poner en contacto una o más especies que se sospecha interactúan mediante una interacción mediada por hidrato de carbono con las nanopartículas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 y (b) determinar si las nanopartículas modulan o no la interacción mediada por hidrato de carbono.
57. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 51 a 56, en el que las nanopartículas se detectan por resonancia magnética nuclear (RMN), agregación, microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía de fuerza atómica (AFM), resonancia de plasmones superficiales (SPR) o con nanopartículas que comprenden átomos de plata, amplificación de señales usando la reducción de plata (I) promovida por nanopartículas.

Figura 1

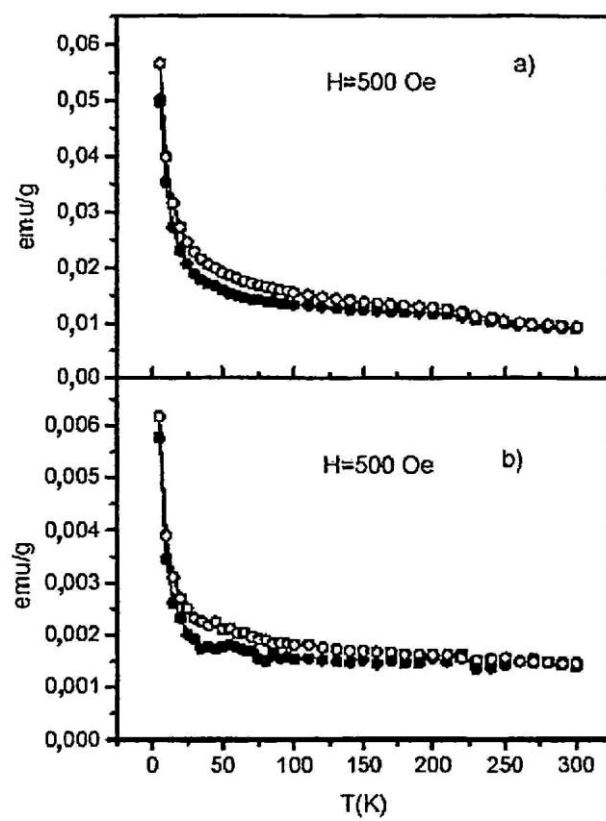


Figura 2A

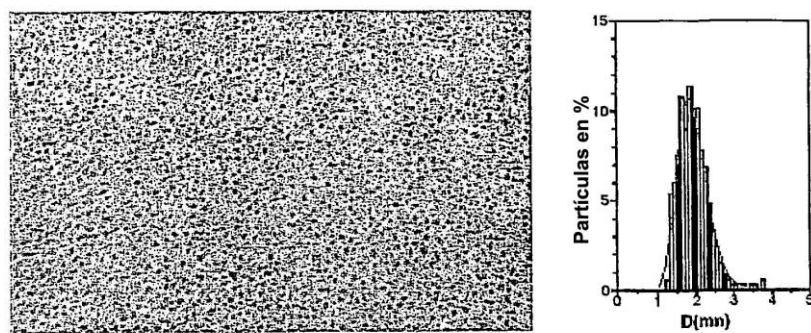


Figura 2B

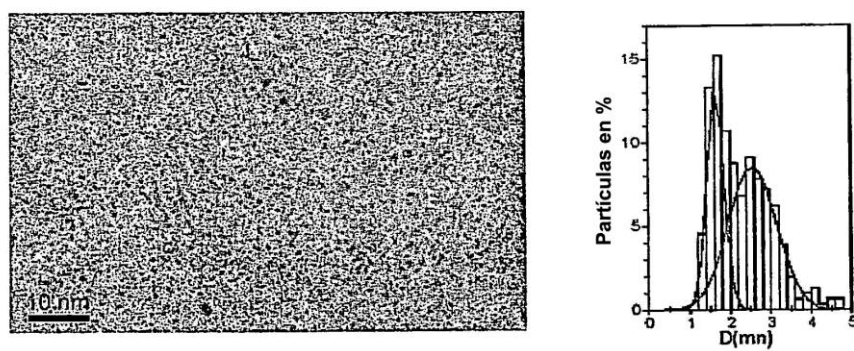


Figura 4A

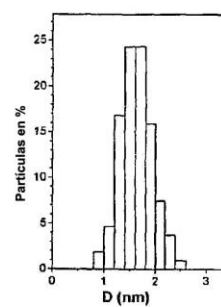
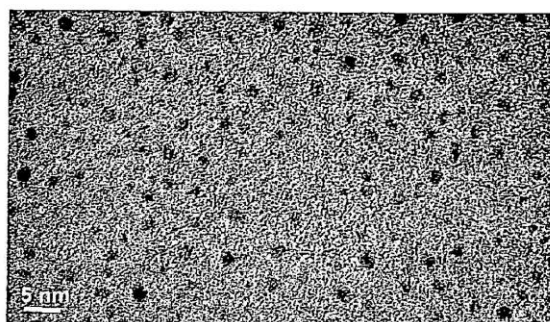
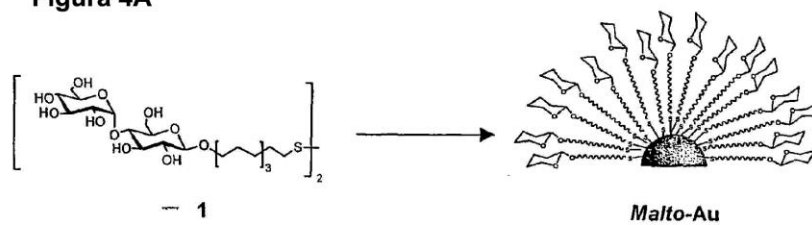


Figura 4B

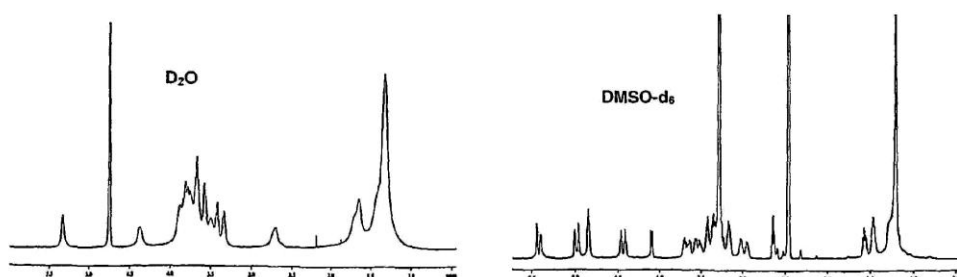


Figura 5

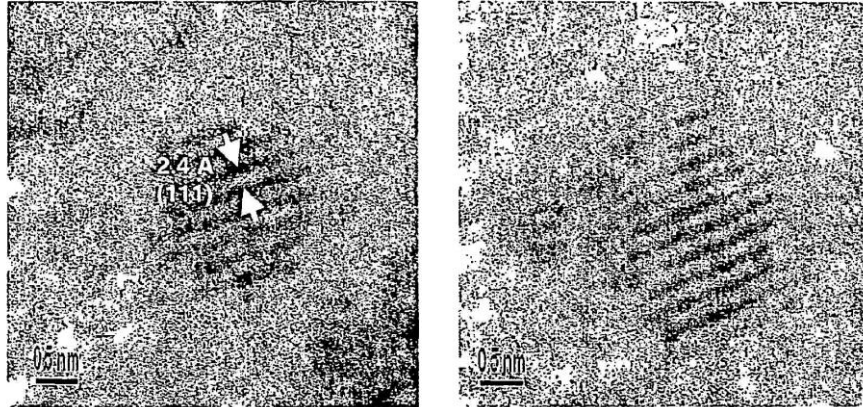


Figura 6

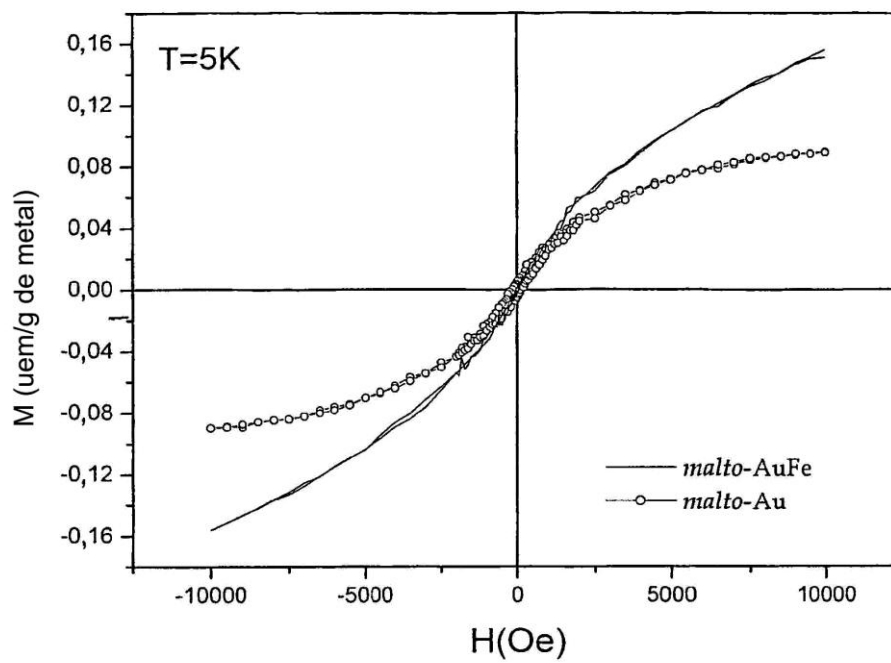


Figura 7A

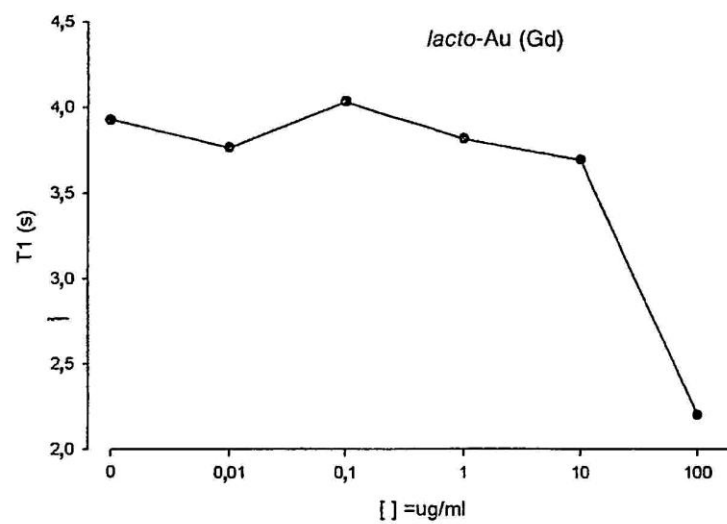


Figura 7B

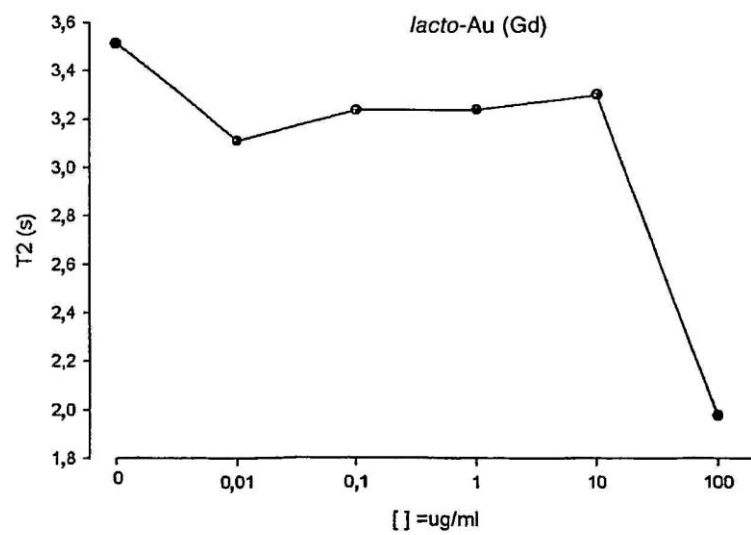
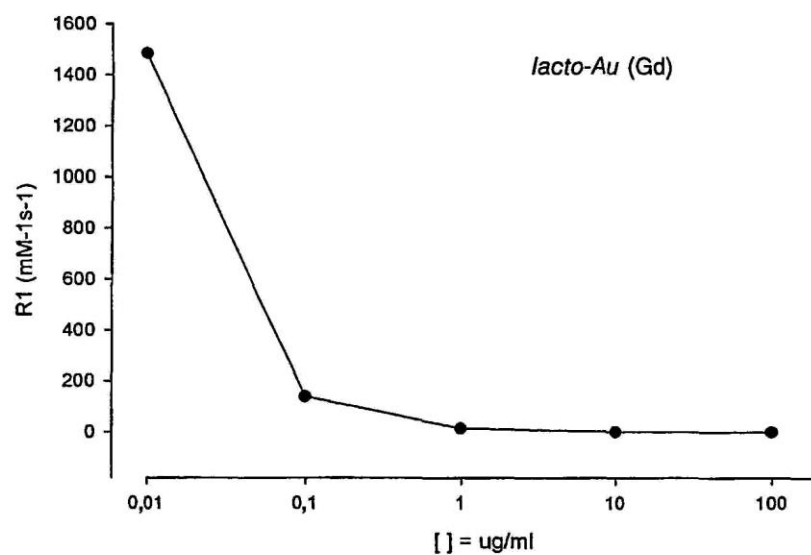
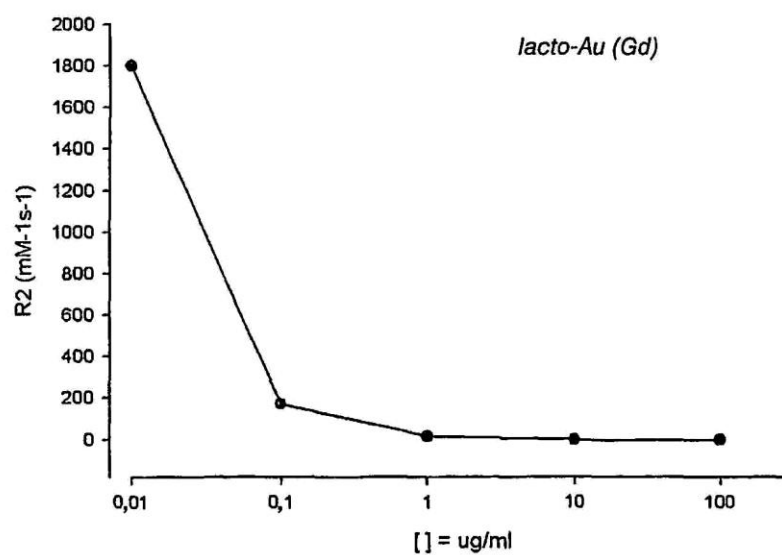


Figura 8A**Figura 8B**

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 03005029 A [0006]
- US 20020068187 A [0008]
- US 6254662 B [0009]
- US 6514481 B [0011]
- WO 02098364 A [0011]
- WO 0119405 A [0011]
- WO 03073444 A [0012]
- WO 02093140 A [0013]
- US 6531304 B [0014]
- WO 0232404 A [0015]
- WO 9961911 A [0016]
- WO 9201047 A [0101]
- US 4816567 A, Cabilly [0102]
- EP 0184187 A [0114]
- GB 2188638 A [0114]
- EP 0239400 A [0114]
- EP 0120694 A [0114]
- EP 0125023 A [0114]

10 Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción

- Teranishi et al. Gold, 2003, 978-982 [0017]
- Srikanth et al. Materials Science and Engineering, 2001, 901-904 [0018]
- YCC.ao ; R. Jin ; C. A. Mirkin. Science, 2002, vol. 297, 1536-1539 [0035]
- Recent Advances in ⁹⁹Tc Radiopharmaceutiocal. Annals of Nuclear Medicine. 2003, vol. 16, [0089]
- Contributions of Nuclear Cardiology to Diagnosis and Prognosis of Patients with Coronary Artery Disease. Circulation, 2000, vol. 101, 1465-1478 [0089]
- Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Company, 1995 [0099]
- Handbook of Pharmaceutical Additives. Synapse In-formation Resources, Inc, 2001 [0099]
- Handbook of Pharmaceutical Excipients. 1994 [0099]
- Kohler ; Milstein. Nature, 1975, vol. 256, 495 [0102]
- Mage ; Lamoyi. Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications. Marcel Dekker Inc, 1987, 79-97 [0102]
- Goding. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Academic Press, 1986, 59-103 [0103]
- Munson ; Pollard. Anal. Biochem., 1980, vol. 107, 220 [0107]
- Niemeyer, C.M. Angew. Chem. Int. Ed., 2001, vol. 40, 4128-4158 [0136]
- Bergemann, C. ; Muller-Schulte, D. ; Oster, J ; Brassard, L. ; Lübke, A.S. J. Magn. Magn. Mater., 1999, vol. 194, 45 [0136]
- Whitesides, G.M. ; Kazlauskas R.J. ; Josephson L. Trends Biotechnol., 1983, vol. 1, 144-148 [0136]
- Sun, S. ; Murray, C.B. ; Weller, D. ; Folks, L. ; Moser, A. Science, 2000, vol. 287, 1989 [0136]
- Shafi, K.V.P.M. ; Gedanken, A. ; Prozorov, R. Adv. Matter, 1998, vol. 10, 590-593 [0136]
- Shemer, G. ; Markovich, G. Adv. Mater., 2001, vol. 13, 1158-1161 [0136]
- Moumen, N. ; Veillet, P. ; Pileni, M.P. J. Magn. Magn. Mater., 1995, vol. 149, 67-71 [0136]
- Park, S.-J. ; Kim, S. ; Lee, S. ; Khim, Z.G. ; Char, K. ; Hyeon, T. J. Am. Chem. Soc, 2000, vol. 122, 8581-8282 [0136]
- Suslick, K.S. ; Fang, M. ; Hyeon, T. J. Am. Chem. Soc., 1996, vol. 118, 11960-11961 [0136]
- Sun, S. ; Zeng H. J. Am. Chem. Soc, 2002, vol. 124, 8204-8205 [0136]
- Guo, Q. ; Teng, X. ; Rahman, S. ; Yang, H. J. Am. Chem. Soc., 2003, vol. 125, 630-631 [0136]
- Sun, S. ; Anders, S. ; Hamann H.F. ; Thiele, J.-U. ; Fullerton, E.E. ; Murray, C.B. ; Terris, B.D. J. Am. Chem. Soc., 2002, vol. 124, 2884-2885 [0136]
- Josephson, L. ; Tung, C.-H. ; Moore, A. ; Weissleder, R. Bioconjugate Chem., 1999, vol. 10, 186-191 [0136]
- Barrientos A.G. et al. Chem. Eur. J., 2003, vol. 9, 1909-1921 [0136]
- Gambardela, P. et al. Giant Magnetic Anisotropy of Science, 2003, vol. 300, 1130-1133 [0136]
- Di Felice, R. ; Selloni, A. ; Molinari, E. J. Phys. Chem. B., 2003, vol. 107, 1151-1156 [0136]
- D. Davidovic ; M. Tinkham. Phys. Rev. Lett., 1999, vol. 83 (8), 1644-1647 [0136]
- Vitos, L. ; Johansson, B. Phys. Rev. B., 2000, vol. 62 (18), 11957 [0136]

- Lewin, M. ; Carlesso, N. ; Tung, C.-H. ; Tang, X.-W ; Cory, D. ; Scadden, D.T. ; Weissleder, R. Nat. Biotechnol., 2000, vol. 18, 410-414 [0136]
- Josephson, L. ; Pérez, J.M. ; Weissleder, R. Angew. Chem. Int. Ed., 2001, vol. 40, 3204-3206 [0136]
- de la Fuente, J.M. ; Barrientos, A.G. ; Rojas, T.C. ; Rojo, J. ; Cañada, J. ; Fernández, A. ; Penadés, S. Angew. Chem. Int. Ed., 2001, vol. 40, 2257-2261 [0136]
- Barrientos, A.G. ; de la Fuente, J.M. ; Rojas, T.C. ; Fernández, A. ; Penadés, S. Chem. Eur. J., 2002, vol. 9, 1909-2001 [0136]
- Hernáiz, M.J. ; de la Fuente, J.M. ; Barrientos, A.G. ; Penadés, S. Angew. Chem. Int. Ed., 2002, vol. 41, 1554-1557 [0136]
- Zhou, W.L. ; Carpenter, E.E. ; Lin, J. ; Kumbhar, A. ; Sims, J. ; O'Connor, C.J. Eur. Phys. J. D., 2001, vol. 16, 289-292 [0136]
- Mykhaylyk O. ; Cherchenko A. ; Ilkin A. ; Dudchenko N. ; Ruditsa V. ; Novoseletz M. ; Zozulya Y. J. Magn. Magn. Mater., 2001, vol. 225, 241-247 [0136]
- Jordan, A. ; Scholz, R. ; Wust, P. ; Föhling, H. ; Felix, R. J. Magn. Magn. Mater., 1999, vol. 201, 413-419 [0136]
- Josephson, L. ; Kircher M.F. ; Mahmood, U. ; Bioconjugate Chem., 2002, vol. 13, 554-560 [0136]
- Taton et al. Science, 2000, vol. 289, [0136]
- Villás, I.M.L. ; Châtelain, A. ; de Heer, W.A. Science, 1994, vol. 265, 1682-1684 [0136]