

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 900 239**

51 Int. Cl.:

C09K 11/02 (2006.01)

C09K 11/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.05.2018 PCT/EP2018/063196**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2018 WO18211109**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2018 E 18724572 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.09.2021 EP 3625308**

54 Título: **Partículas luminiscentes a base de tierras raras y su uso como agente de diagnóstico**

30 Prioridad:

18.05.2017 FR 1754416

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

16.03.2022

73 Titular/es:

ECOLE POLYTECHNIQUE (50.0%)

Route de Saclay

91120 Palaiseau, FR y

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE (50.0%)

72 Inventor/es:

GACOIN, THIERRY;

RICHLY, MAXIMILIAN;

PREIRA, PASCAL;

ALEXANDROU, ANTIGONI;

BOUZIGUES, CÉDRIC y

MOHAMMEDI, RABEI

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 900 239 T3

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

DESCRIPCIÓN

Partículas luminiscentes a base de tierras raras y su uso como agente de diagnóstico

- 5 La presente invención se refiere al campo de las sondas para la detección y/o cuantificación de sustancias de interés en muestras biológicas. Tiene más particularmente por objeto nuevas partículas inorgánicas luminiscentes, su procedimiento de preparación y su uso para detectar y/o evaluar la presencia de proteínas, anticuerpos, ADN, ARN y otros compuestos en una muestra biológica.
- 10 La detección y/o cuantificación de las concentraciones de biomarcadores, anticuerpos o ADN y ARN en muestras biológicas (sangre, suero, saliva, orina, líquido cefalorraquídeo, etc.) son indispensables para el diagnóstico médico.
- En el campo del diagnóstico *in vitro* o *ex vivo*, del análisis médico y del bioanálisis, se han propuesto un cierto número de métodos para detectar y/o evaluar la presencia de sustancias específicas.
- 15 Estos métodos se basan, de manera general, en el uso de una sonda utilizada para detectar y/o cuantificar una concentración en disolución. Estas sondas se acoplan a moléculas, ADN o proteínas que, directamente o vía una serie de reacciones, se fijarán a la especie molecular a analizar. Después, las sondas que han reaccionado pueden ser detectadas mediante uno o más métodos basados, por ejemplo, en su luminiscencia, su absorbancia, su reactividad química, su radiactividad, etc.
- 20 Los ensayos bioquímicos más habitualmente utilizados son los ensayos de inmunoabsorción enzimática (en inglés "Enzyme-Linked Immuno Ensayo" o ELISA), que se basan generalmente en el uso de la peroxidasa de rábano picante como enzima para inducir una reacción con un sustrato y cuantificar la reacción química que tiene lugar por medida de la absorbancia del producto de reacción en la disolución. La elección del compuesto molecular al que se acopla la sonda es determinante para la eficacia de estas sondas. Más precisamente, la eficacia de estos métodos depende de la afinidad específica del compuesto con la sustancia diana. A modo de ejemplos, las publicaciones referenciadas [1] y [2] detallan las características de estos mecanismos.
- 25 Las sondas luminiscentes conducen generalmente a una detección más sensible que las sondas detectadas por su absorbancia debido a que, en el primer caso, las medidas de la intensidad luminosa se realizan sobre un fondo negro, mientras que, en el segundo, se trata de medir una variación de la intensidad luminosa (medidas sobre un fondo claro). Las sondas luminiscentes actualmente disponibles presentan varios inconvenientes que no permiten explotar todo su potencial como sondas de diagnóstico. Entre estos inconvenientes, se puede citar por ejemplo el fenómeno de fotoblanqueamiento en el caso de fluoróforos orgánicos que, tras modificaciones estructurales irreversibles, se traduce en una desaparición de fluorescencia, o también el fenómeno de parpadeo de la emisión de los nanocristales semiconductores, o "quantum dots", las sondas dejan entonces de emitir periódicamente y, por lo tanto, son inadaptadas para producir una señal constante. Otros inconvenientes resultan, por ejemplo, de la amplitud del espectro de emisión de las sondas luminiscentes. De hecho, un espectro de emisión demasiado amplio dificulta el filtrado de la señal de fondo eventualmente presente, y tiene un efecto sobre la calidad de la señal y, en particular, sobre la relación señal con ruido. Conviene además tomar en cuenta, además de los factores ópticos que contribuyen a la eficacia de la sonda en un ensayo biológico, el carácter práctico y la facilidad de uso de la sonda. Así, ciertas partículas, como es el caso de los nanocristales de semiconductores, pierden sus características de luminiscencia tras la congelación, lo que representa un inconveniente para el almacenamiento de agentes bio-conjugados. La facilidad de acoplar las sondas al compuesto molecular que permite apuntar a las moléculas deseadas es también un aspecto a tener en cuenta para la elección de la sonda adecuada. Por lo tanto, un cierto número de partículas, de las cuales los nanocristales de semi-conductores, se sintetizan en disolventes orgánicos. De ello se desprende que el uso para aplicaciones biológicas necesita etapas suplementarias de preparación de la superficie para realizar una dispersión en agua de estas partículas, un proceso que puede ser complejo de llevar a cabo y poco estable en el tiempo.
- 30 35 40 45 50
- Por otro lado, las propiedades coloidales de las partículas/sondas son decisivas para la realización de ensayos biológicos. De hecho, disoluciones de buena estabilidad coloidal son capaces de proporcionar medios para los ensayos de buena homogeneidad y, por lo tanto, una mejor reproducibilidad a nivel de los resultados de estos ensayos.
- 55 Finalmente, la complejidad y el coste son aspectos importantes en la elección de las sondas para el diagnóstico. Por ejemplo, unas nanopartículas de oro, y sus propiedades en términos de resonancia plasmónica de superficie se han propuesto como sondas de diagnóstico, pero no se han abierto camino como sondas para el diagnóstico *in vitro*, posiblemente debido a la complejidad del método de detección [3], o eventualmente debido a un alto coste. En cuanto a los cristales de semi-conductores, éstos se sintetizan en disolventes orgánicos y requieren procedimientos de dispersión en medio acuoso, lo que hace que su síntesis sea compleja y, por tanto, cara. Su funcionalización con grupos químicos que permiten el acoplamiento a compuestos moleculares de reconocimiento de moléculas dianas se basa también en enlaces químicos débiles, lo que limita por lo tanto su estabilidad, lo que es perjudicial para la reproducibilidad de los ensayos de detección.
- 60 65
- Por lo tanto, las nanopartículas dopadas con iones de tierras raras, tales como nanopartículas de tipo YVO₄:Eu, resultan particularmente ventajosas para su uso como sondas para la detección/cuantificación de biomoléculas.

Unas nanopartículas a base de vanadato de itrio dopado con tierras raras se han descrito por ejemplo de manera detallada por Riwotzki *et al.* [4] y Huignard *et al.* [5].

5 Estas nanopartículas son particularmente ventajosas en lo que respecta a su excelente fotoestabilidad, que autoriza la adquisición de una señal constante y prolongada, y una ausencia del fenómeno de parpadeo de la emisión. Además, presentan un espectro de emisión estrecho y un gran desplazamiento de Stokes de la emisión. Estas dos características permiten filtrar eficazmente la señal de emisión de las nanopartículas librándose de las señales parásitas para obtener excelentes relaciones señal con ruido. Estas nanopartículas contienen también varias decenas
10 de miles de iones que pueden ser excitados y responsables de la luminiscencia. El aumento de la intensidad de excitación induce así un aumento lineal de la luminosidad de las partículas, alcanzándose la saturación de la emisión solamente para intensidades impracticables.

Finalmente, estas nanopartículas no pierden su luminiscencia después de la congelación.

15 La síntesis en un medio disolvente orgánico de nanopartículas luminiscentes dopadas con iones de tierras raras se ha propuesto, por ejemplo, en el documento EP 1 232 226 o en publicaciones [6], [7] y [8].

También se ha propuesto ya la síntesis de estas nanopartículas luminiscentes en medio acuoso, por ejemplo, mediante la adición gota a gota de disoluciones de nitratos de itrio y europio a una disolución de ortovanadato (Na_3VO_4) ([9], [10], [11], [12] y [13]).

Además, las publicaciones [14]-[19] proponen métodos de síntesis por vía hidrotermal de nanopartículas de YVO_4 dopadas con iones de tierras raras que utilizan metavanato de amonio u ortovanadato como precursor.

25 También se puede citar el documento US 8 337 804 que propone un método para la preparación de nanopartículas a base de iones ortovanadato VO_4^{3-} , por ejemplo de $\text{YVO}_4:\text{Eu}$, usando un medio de reacción que contiene agua y al menos un poliol.

30 En cuanto al documento EP 1 282 824, éste describe el uso de nanopartículas luminiscentes inorgánicas, modificadas en superficie, como sondas para detectar una sustancia biológica u otra sustancia orgánica.

La publicación Giaume *et al.*, Mater. Res. Soc. Symp. Proc. Vol. 942, 2006, describe la síntesis de una disolución coloidal de nanopartículas de tipo $\text{Y}_{1-x}\text{Eu}_x\text{VO}_4$ ($0 < x < 1$) mediante la adición de una disolución acuosa que comprende nitratos de itrio y de europio, a una disolución acuosa de ortovanadato de sodio. El pH de la disolución de ortovanadato de sodio se ajusta a un valor comprendido entre 12,5 y 13 por adición de hidróxido de tetrametilamonio, de manera a obtener un pH final de aproximadamente 9. A fin de mejorar la estabilidad coloidal, Giaume *et al.* proponen la realización de una etapa de tratamiento de superficie de las nanopartículas, que se realiza al final de su síntesis, mediante adsorción de iones silicato cargados negativamente a nivel de las nanopartículas.

40 Asimismo, el documento WO 2016/079069 describe un procedimiento para la preparación por vía sol-gel de una disolución coloidal de nanopartículas de tipo $\text{YxEu}_{1-x}\text{VO}_4$, usando la adición de disoluciones de nitrato de europio e de itrio a una disolución de ortovanadato de sodio, y ajuste del pH por adición de una base orgánica o inorgánica tal como hidróxido de tetrametilamonio.

45 Las nanopartículas luminiscentes, obtenidas por las vías de síntesis conocidas anteriormente mencionadas, y usadas en un medio acuoso, están sin embargo sujetas a fenómenos de floculación, y no permiten conducir a suspensiones coloidales estables. En consecuencia, la cantidad de nanopartículas en suspensión es inestable en el tiempo y no se puede determinar de manera precisa.

50 Esta incertidumbre a nivel del contenido en partículas luminiscentes en las suspensiones coloidales utilizadas es altamente perjudicial durante su uso como sondas en métodos de diagnóstico, ya que impacta la reproducibilidad de los resultados obtenidos, por ejemplo, durante la detección/cuantificación de las concentraciones de biomoléculas de la muestra analizada.

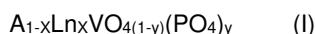
55 En consecuencia, las partículas luminiscentes dopadas con iones de tierras raras obtenidas por los métodos del estado de la técnica no permiten dar total satisfacción para su uso como sondas de diagnóstico.

60 La presente invención tiene precisamente como objetivo proporcionar nuevas partículas luminiscentes y una nueva vía para su síntesis, que permita superar los inconvenientes antes mencionados.

En particular, la invención proporciona un medio para acceder a nanopartículas luminiscentes que presentan una estabilidad coloidal mejorada en un medio acuoso, y ventajosamente con una mejor reproducibilidad de su síntesis y de las etapas posteriores de funcionalización y acoplamiento a un agente molecular de direccionamiento.

65

Así, la invención se refiere, según un primero de sus aspectos, a una partícula luminiscente que comprende una nanopartícula de fórmula:



5 en la que:

- A se escoge de itrio (Y), gadolinio (Gd), lantano (La), y sus mezclas;
- 10 • Ln se escoge de europio (Eu), disprosio (Dy), samario (Sm), neodimio (Nd), erbio (Er), iterbio (Yb), y sus mezclas;
- $0 < x < 1$, en particular $0,2 \leq x \leq 0,6$, y más particularmente x vale 0,4; y
- $0 \leq y < 1$;

15 caracterizada por que la nanopartícula presenta en superficie cationes de tetraalquilamonio en una cantidad tal que dicha nanopartícula presenta un potencial zeta, anotado ζ , menor o igual a -28 mV, en un medio acuoso de pH ≥ 5 , en particular de pH $\geq 5,5$, y con una conductividad iónica estrictamente menor que $100 \mu S \cdot cm^{-1}$.

20 Según otro de sus aspectos, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de tales partículas, usando una reacción de co-precipitación, en medios acuosos, a partir de precursores de los elementos A y Ln, y en presencia de iones de ortovanadato (VO_4^{3-}), y eventualmente fosfato (PO_4^{3-}); siendo dicha reacción llevada a cabo en presencia de una cantidad eficaz de cationes de tetraalquilamonio tal que dicha nanopartícula presenta un potencial zeta, anotado ζ , menor o igual a -28 mV, en un medio acuoso de pH ≥ 5 , en particular de pH $\geq 5,5$, y con una conductividad iónica estrictamente menor que $100 \mu S \cdot cm^{-1}$.

25 Preferiblemente, dicha nanopartícula tiene un potencial zeta ζ , en medio acuoso a pH $\geq 6,5$, en particular a pH ≥ 7 , y en particular a pH ≥ 8 , menor o igual a -30 mV.

30 Las partículas luminiscentes según la invención, y su ruta de síntesis, resultan ventajosas en varios aspectos.

Esta nueva vía sintética se basa en el uso de contraiones voluminosos del tipo tetraalquilamonio.

35 Los inventores han descubierto así que el uso de estos contraiones voluminosos en la síntesis de nanopartículas a base de iones de tierras raras asegura una estabilidad coloidal mejorada de las partículas en disolución, y evita en particular los fenómenos de floculación de las partículas.

40 Como se mencionó anteriormente, la estabilidad de las partículas en disolución es particularmente determinante para cumplir las exigencias en términos de reproducibilidad para el uso de estas partículas como sondas para el diagnóstico *in vitro* o *ex vivo*.

45 Sin estar ligado por la teoría, esta mejora en términos de estabilización, que resultan del uso de contraiones de tetraalquilamonio, en comparación por ejemplo con el uso de iones de sodio, está relacionada a la diferencia en el potencial zeta de las partículas.

50 El "potencial zeta", anotado ζ , se puede definir como la diferencia de potencial que existe entre el interior de la disolución y el plano de cizallamiento de la partícula. Es representativo de la estabilidad de una suspensión. El plano de cizallamiento (o radio hidrodinámico) corresponde a una esfera imaginaria alrededor de la partícula en la que el disolvente se mueve con la partícula cuando las partículas se desplazan en la disolución. El potencial zeta se puede determinar mediante métodos conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo mediante el desplazamiento de la partícula con su capa de solubilización en un campo eléctrico, como se detalla a continuación en el texto.

55 De hecho, como se ilustra en los ejemplos a continuación, el uso de contraiones de tetraalquilamonio induce un potencial zeta negativo de la partícula de valor absoluto aumentado, en comparación, por ejemplo, con el caso del uso de contraiones de sodio. Este potencial zeta negativo de las nanopartículas, menor o igual a -28 mV, en particular menor o igual a -30 mV, en un medio acuoso a pH ≥ 5 , en particular a pH $\geq 6,5$, aumenta los fenómenos de repulsión electrostática de las nanopartículas en disolución acuosa las unas con respecto a las otras, lo que permite así suprimir los fenómenos de floculación. En efecto, es conocido empíricamente por el experto en la técnica que un potencial zeta de alto valor absoluto, en particular mayor que 28 mV, permite generalmente eliminar los efectos de floculación en medios con baja fuerza iónica.

60 Así, como se detalla a continuación en el texto, las nanopartículas de la invención, que presentan en superficie unos cationes de tetraalquilamonio, poseen un potencial zeta, anotado ζ , en un medio acuoso a pH ≥ 5 , menor o igual a -28 mV. En particular, las nanopartículas de la invención, que presentan en superficie cationes de tetraalquilamonio, poseen, en medio acuoso a pH $\geq 6,5$, un potencial zeta menor o igual a -30 mV.

65

Se entiende que las medidas del potencial zeta se llevan a cabo después de la purificación de la suspensión acuosa de las partículas y, por tanto, para una suspensión acuosa que presenta una conductividad iónica estrictamente menor que $100 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

5 La conductividad iónica de la suspensión, que permite una apreciación del porcentaje de iones presentes en dicha suspensión, se puede medir, a temperatura ambiente (25°C), mediante cualquier conductímetro conocido.

10 La invención se refiere así, según otro de sus aspectos, a una suspensión acuosa coloidal que comprende partículas luminiscentes según la invención.

Una suspensión según la invención presenta así excelentes propiedades de estabilidad coloidal.

15 Por otro lado, en términos de síntesis, las partículas de la invención se sintetizan directamente en un medio acuoso, y el protocolo de síntesis solo requiere una reacción de coprecipitación. La preparación de las nanopartículas de la invención permite así prescindir ventajosamente de las etapas de eliminación de disolventes orgánicos y de transferencia de las nanopartículas en otros disolventes. Además, la síntesis de las nanopartículas según la invención puede llevarse a cabo ventajosamente a temperatura ambiente.

20 Asimismo, como se detalla a continuación en el texto, los iones ortovanadato (VO_4^{3-}) usados en la reacción de coprecipitación para formar las nanopartículas de la invención se puede generar ventajosamente *in situ* a partir de una sal de metavanadato, por ejemplo, metavanadato de amonio (NH_4VO_3) o de sodio (NaVO_3), con adición de dos equivalentes de base fuerte, ventajosamente hidróxidos de tetraalquilamonio.

25 El uso de metavanadato como precursor permite ventajosamente introducir contraiones voluminosos del tipo tetraalquilamonio como contraiones de la base fuerte utilizada. Así, el método de síntesis de las partículas según la invención presenta una estabilidad coloidal muy buena.

30 Finalmente, como se detalla a continuación, las partículas de la invención se pueden acoplar fácilmente a agentes de direccionamiento con fines de diagnóstico, *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*, vía diversas reacciones de funcionalización/acoplamiento. Las nanopartículas sintetizadas según la invención encuentran así una aplicación especialmente ventajosa como sondas que permiten la detección y/o cuantificación, *ex vivo* o *in vitro*, en muestras biológicas, con excelente reproducibilidad.

35 La invención se refiere así, según otro de sus aspectos, a la utilización de partículas según la invención, en particular acopladas a al menos un agente de direccionamiento, como agente de diagnóstico, en particular como agente de diagnóstico *in vitro* o *ex vivo*.

40 Según también otro de sus aspectos, se refiere a un kit de diagnóstico, en particular *in vitro* o *ex vivo*, en otras palabras un kit de detección y/o cuantificación *in vitro* o *ex vivo* de una sustancia de interés biológico o químico en una muestra, que comprende al menos partículas luminiscentes según la invención, en particular en forma de una suspensión acuosa coloidal.

45 A continuación, en el texto, se designará más simplemente bajo la denominación “nanopartícula según la invención” la nanopartícula que responde a la fórmula (I) antes citada, en cuya superficie están localizados los cationes de tetraalquilamonio.

50 Por otro lado, se usa la expresión “nanopartícula funcionalizada” para designar la nanopartícula según la invención funcionalizada además en superficie con uno o más grupos tales como, por ejemplo, con citrato, ácido poli(acrílico) (PAA), funciones aldehído, funciones ácido carboxílico (COOH), funciones amina, etc.

55 Finalmente, la expresión “nanopartícula acoplada” se utiliza para designar la nanopartícula de la invención al final de su acoplamiento, después de la funcionalización de la superficie, con uno o más agentes de direccionamiento, tales como proteínas, anticuerpos, ADN, ARN, aptámero, etc., como se detalla a continuación en el texto.

Otras características, variantes y ventajas de las partículas según la invención, de su procedimiento de síntesis y de su uso como sondas para el diagnóstico destacarán mejor a la lectura de la descripción, de los ejemplos y de las figuras a continuación, dados a modo de ilustración y no limitativos de la invención.

60 A continuación, en el texto, las expresiones “comprendido entre ... y ...”, “que van de ... a ...” y “que oscila de ... a ...” son equivalentes, y significan que los límites están incluidos, salvo que se mencione lo contrario.

65 Salvo que se mencione lo contrario, la expresión “que comprende un(a)” debe entenderse como “que comprende al menos uno(una)”.

PARTÍCULAS LUMINISCENTES

Como se ha especificado anteriormente, las partículas luminiscentes de la invención comprenden, o incluso están formadas, de una nanopartícula de fórmula $A_{1-x}Ln_xVO_{4(1-y)}(PO_4)_y$ (I), en la que A, x, Ln e y son como se definen anteriormente, a la superficie de la cual están presentes cationes de tipo tetraalquilamonio.

La inmovilización de los cationes de tipo tetraalquilamonio en la superficie de las nanopartículas de la invención resulta más particularmente de interacciones electrostáticas entre los iones de superficie de la nanopartícula de fórmula (I) cargadas negativamente (O^{2-}) y los contraiones de tipo tetraalquilamonio cargados positivamente.

Así, los cationes de tetraalquilamonio se asocian directamente con la nanopartícula vía interacciones electrostáticas con los iones de superficie cargados negativamente de la nanopartícula. En particular, la inmovilización de los cationes de tetraalquilamonio en la superficie de la nanopartícula no utiliza ningún grupo “espaciador”.

Por cationes “tetraalquilamonio”, se entiende más particularmente designar cationes tetraalquil(C_1-C_6)amonio, es decir, cationes de fórmula NR_4^+ con R, idéntico o diferente, que representa un grupo alquilo de C_1-C_6 , en particular alquilo de C_1-C_4 .

Preferiblemente, los cationes “tetraalquilamonio” son cationes tetraalquil(C_1-C_3)amonio, es decir, cationes de fórmula NR_4^+ con R, idéntico o diferente, que representa un grupo alquilo de C_1-C_3 .

Por “alquilo de C_1-C_6 ”, se entiende un grupo alifático saturado, lineal o ramificado, que comprende de 1 a 6 átomos de carbono. A modo de ejemplos, se pueden citar los grupos metilo, etilo, propilo, butilo, isopropilo, isobutilo, tercbutilo, etc.

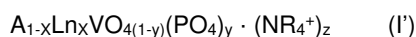
Los cationes de tetraalquilamonio se escogen preferiblemente de los cationes tetrametilamonio, tetraetilamonio, tetrapropilamonio, tetrabutilamonio, y sus mezclas.

Según una realización particular, los cationes presentes a la superficie de las nanopartículas de la invención son cationes de tetrametilamonio.

Como se indicó anteriormente, los cationes de tetraalquilamonio están presentes en la superficie de las nanopartículas de la invención en una cantidad suficiente para proporcionar el resultado deseado en términos de estabilidad coloidal de la suspensión acuosa de dichas partículas sintetizadas, en otras palabras, el valor potencial zeta deseado.

Los cationes de tetraalquilamonio, presentes en la superficie de las nanopartículas de la invención, pueden estar presentes en una cantidad de 100 a 10000 cationes de tetraalquilamonio por nanopartícula.

Las nanopartículas de la invención responden así más particularmente a la siguiente fórmula (I’):



en la que:

- A se escoge de Y, Gd, La, y sus mezclas, preferiblemente A representa Y;
- Ln se escoge de Eu, Dy, Sm, Nd, Er, Yb, y sus mezclas, preferiblemente Ln representa Eu;
- $0 < x < 1$, en particular $0,2 \leq x \leq 0,6$, y más particularmente x vale 0,4;
- $0 \leq y < 1$;
- R, idénticos o diferentes, son como se definen anteriormente, preferiblemente representan un grupo alquilo de C_1-C_3 , en particular metilo; y
- z representa el número de cationes de tetraalquilamonio NR_4^+ localizados en la superficie de dicha nanopartícula, en particular z está comprendido entre 100 y 10000.

Según una realización particular, la nanopartícula responde a la fórmula (I) o (I’) antes mencionada, en la que y vale 0.

En otras palabras, la nanopartícula de la invención es de fórmula $A_{1-x}Ln_xVO_4$ (II), en la superficie de la cual se encuentran localizados los cationes de tetraalquilamonio.

Así, una nanopartícula de la invención puede responder más particularmente a la fórmula $A_{1-x}Ln_xVO_4 \cdot (NR_4^+)_z$ (II’), en el que A, x, Ln, R y z son como se definen anteriormente.

Según una realización particular, A en la fórmula (I), (I'), (II) o (II') anterior representa el itrio (Y).

Según otra realización particular, Ln en la fórmula (I), (I'), (II) o (II') anterior representa Eu.

5 Así, según una variante de realización particular, las partículas de la invención están formadas total o parcialmente a partir de una nanopartícula de fórmula $Y_{1-x}Eu_xVO_4$ (III), con $0 < x < 1$, presentando dicha nanopartícula en superficie unos cationes de tetraalquilamonio.

10 Más particularmente, una nanopartícula de la invención puede responder más particularmente a la fórmula $Y_{1-x}Eu_xVO_4 \cdot (NR_4^+)_z$ (III'), en la que x, R y z son como se definen anteriormente.

Según una realización particular, el producto entre el porcentaje de dopaje, x, en iones Ln, en particular en europio (Eu), y el rendimiento cuántico de la emisión por la nanopartícula está maximizado.

15 En particular, esto es útil cuando se prevé una excitación óptica de los iones Ln por excitación directa, es decir, en resonancia con los estados electrónicos de estos iones, y no por excitación de la matriz $AVO_{4(1-y)} \cdot (PO_4)_y$, y la transferencia de energía ulterior hacia estos iones.

20 Esta optimización del producto entre el porcentaje de dopaje x en iones Ln y el rendimiento cuántico puede llevarse a cabo usando un fuerte dopaje en iones Ln, por ejemplo, entre 0,2 y 0,6, y en particular de 0,4, sin, no obstante, disminuir el rendimiento cuántico, en particular limitando los procesos de transferencia entre iones de dopaje que conducen a una extinción de la concentración. En particular, para mantener un alto rendimiento cuántico, es necesario que la cristalinidad de la partícula no sea perfecta. En efecto, una excelente cristalinidad favorece los procesos de transferencia entre los iones de dopaje, en particular cuando éstos están en proximidad inmediata entre sí, como es el caso para dopajes altos y, en consecuencia, favorece los procesos de desexcitación de los iones por procesos no radiantes relacionados al solvente. En particular, un procedimiento de síntesis a temperatura ambiente, o al menos a una temperatura que no supere los 600°C, es favorable para la cristalinidad imperfecta requerida para estas nanopartículas.

30 La cristalinidad de las nanopartículas se considera como siendo "imperfecta" cuando la longitud de coherencia determinada por el difractograma de rayos X en al menos una dirección cristalográfica dado es inferior al 80% del tamaño de partícula en esa dirección, tal como se mide a partir de imágenes de microscopía electrónica de transmisión. Se pueden considerar diferentes tipos de cristalinidad imperfecta: policristalinidad, defectos o porosidad.

35 A modo de ejemplo, la nanopartícula puede ser de fórmula $Y_{0,6}Eu_{0,4}VO_4$, en la superficie se localizan cationes de tetraalquilamonio. En particular, puede responder a la fórmula $Y_{0,6}Eu_{0,4}VO_4 (NR_4^+)_z$, representando z el número de cationes de tetraalquilamonio.

40 Se entiende que se pueden combinar las diversas realizaciones mencionadas anteriormente, en particular en lo que respecta a la naturaleza de la nanopartícula fotoluminiscente y de los cationes de tetraalquilamonio de superficie.

45 A modo de ejemplo, una partícula fotoluminiscente según la invención se puede formar de una nanopartícula de fórmula $Y_{0,6}Eu_{0,4}VO_4$ en la superficie de la cual están inmovilizados los cationes de tetrametilamonio.

Las nanopartículas de la invención son más particularmente de forma globalmente elipsoidal alargada ("prolate" en inglés).

50 El tamaño se puede medir por microscopía electrónica de transmisión. Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión permiten determinar la forma de las nanopartículas (elipsoide alargado) y deducir las dimensiones medias de los dos ejes del elipsoide. Se supone generalmente que el tercer eje del elipsoide, no visible en las imágenes de transmisión que son proyecciones 2D, es de longitud igual al eje de menor tamaño.

55 Las nanopartículas de la invención, de forma elipsoide alargado, pueden presentar una longitud del eje mayor, anotado a, comprendida entre 20 y 60 nm; y una longitud del eje menor, anotado b, comprendida entre 10 y 30 nm. En particular, las nanopartículas de la invención pueden presentar un valor medio de la longitud del eje mayor, a, de 40 nm, y un valor medio de la longitud del eje menor, b, de 20 nm.

60 Como se mencionó anteriormente, las partículas luminiscentes según la invención permiten acceder a suspensiones acuosas que presentan una estabilidad coloidal muy buena. Cabe señalar que esta estabilidad es importante incluso en medios de alta fuerza iónica como es el caso en el medio de síntesis incluso antes de la purificación (fuerza iónica mayor que 0,1 M). En particular, una suspensión acuosa de partículas según la invención presenta poco, incluso ningún, fenómeno de floculación.

En particular, las partículas según la invención en la superficie de las cuales están presentes cationes de tetraalquilamonio presentan un potencial zeta, anotado ζ , menor o igual a -28 mV, en un medio acuoso de pH ≥ 5 , en particular de pH $\geq 5,5$, y que presenta una conductividad iónica estrictamente menor que $100 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

5 En otras palabras, el valor absoluto del potencial zeta, anotado $|\zeta|$, de las partículas de la invención, en un medio acuoso a pH ≥ 5 , en particular a pH $\geq 5,5$, es mayor que 28 mV.

10 El "potencial zeta" es uno de los elementos representativos de la estabilidad de una suspensión. Puede medirse, por ejemplo, usando directamente un equipo de tipo Zetasizer Nano ZS de la compañía Malvern. Este equipo mide, mediante dispositivos ópticos, las velocidades de desplazamiento de las partículas en función del campo eléctrico que se les aplica.

15 Las nanopartículas de la invención poseen más particularmente un potencial zeta menor o igual a -28 mV, preferiblemente menor o igual a -30 mV, en un medio acuoso de pH ≥ 6 , en particular de pH $\geq 6,5$, y de conductividad iónica estrictamente menor que $100 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

En particular, las nanopartículas de la invención poseen un potencial zeta menor o igual a -30 mV, en un medio acuoso de pH $\geq 6,5$, en particular de pH ≥ 7 , en particular de pH ≥ 8 , y de conductividad iónica estrictamente menor que $100 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

20 Las nanopartículas según la invención son de manera mayoritaria de naturaleza cristalina y policristalina, en particular de tamaño medio de cristalitas, deducido por difracción de rayos X, como se detalla en los ejemplos siguientes, comprendida entre 3 y 40 nm.

25 Según una realización particular de la invención, las nanopartículas según la invención están acopladas (o injertadas) a al menos un agente de direccionamiento, en particular con vistas a su uso como sondas en métodos de diagnóstico, en particular métodos de diagnóstico *in vitro* o *ex vivo*, para la detección y/o cuantificación de especies biológicas en una muestra biológica.

30 Dicho de otra manera, las partículas de la invención pueden comprender al menos un agente de direccionamiento inmovilizado en la superficie de la nanopartícula.

Los agentes de direccionamiento pueden ser de naturaleza variada como se detalla a continuación en el texto, dependiendo de la aplicación deseada para las partículas luminiscentes de la invención.

35 PREPARACIÓN DE PARTÍCULAS

Como se mencionó anteriormente, la invención se refiere también, según otro de sus aspectos, a un procedimiento de preparación de partículas luminiscentes que comprenden una nanopartícula de fórmula:

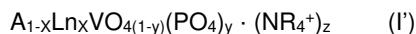


en la que:

- 45 • A se escoge de itrio (Y), gadolinio (Gd), lantano (La), y sus mezclas, preferiblemente A representa Y;
- Ln se selecciona de europio (Eu), disprosio (Dy), samario (Sm), neodimio (Nd), erbio (Er), iterbio (Yb), y sus mezclas, preferiblemente Ln representa Eu;
- 50 • $0 < x < 1$; y
- $0 \leq y < 1$

55 por reacción de coprecipitación, en medio acuoso, a partir de precursores de dichos elementos A y Ln, y en presencia de iones ortovanadato (VO_4^{3-}), y eventualmente iones fosfato (PO_4^{3-}); llevándose a cabo dicha reacción en presencia de una cantidad eficaz de cationes de tetraalquilamonio tal que dicha nanopartícula presenta un potencial zeta, anotado ζ , menor o igual a -28 mV, en un medio acuoso de pH ≥ 5 , en particular de pH $\geq 5,5$, y con una conductividad iónica estrictamente menor que $100 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

60 En particular, la invención se refiere a un procedimiento de preparación de partículas luminiscentes que comprenden una nanopartícula de fórmula (I')



en la que:

65

- A representa Y, Gd, La, o sus mezclas, preferiblemente A representa Y;
- Ln se escoge de Eu, Dy, Sm, Nd, Er, Yb, y sus mezclas, preferiblemente Ln representa Eu;
- 5 • $0 < x < 1$;
- $0 \leq y < 1$;
- 10 • R, idénticos o diferentes, son como se definen anteriormente, preferiblemente representan un grupo alquilo de C₁-C₃; y
- z representa el número de cationes de tetraalquilamonio NR₄⁺ localizados en la superficie de dicha nanopartícula.

15 Más particularmente, la invención se refiere a un procedimiento para preparar partículas luminiscentes que comprenden una nanopartícula de fórmula (II), (II'), (III) o (III') tal como se define anteriormente.

20 Los precursores de los elementos A y Ln pueden presentarse, de manera clásica, en forma de sales de dichos elementos, por ejemplo, de nitratos, cloruros, percloratos o acetatos, en particular de nitratos. Los precursores de los elementos A y Ln, y sus cantidades, se escogen por supuesto de manera adecuada con respecto a la naturaleza de la nanopartícula deseada.

Por ejemplo, la síntesis de nanopartículas de fórmula Y_{1-x}Eu_xVO₄ (III) puede utilizar, como compuestos precursores del itrio y del europio, los nitratos de itrio (Y(NO₃)₃) y de europio (Eu(NO₃)₃).

25 Según una característica esencial del procedimiento de la invención, la reacción de coprecipitación se lleva a cabo en presencia de una cantidad eficaz de cationes de tetraalquilamonio.

30 Los cationes de tetraalquilamonio son más particularmente tales como se definen anteriormente. Preferiblemente, se escogen de los cationes de tetrametilamonio, tetraetilamonio, tetrapropilamonio, tetrabutilamonio, y sus mezclas. Se trata preferiblemente de cationes de tetrametilamonio.

35 Por "cantidad eficaz", se entiende más particularmente significar que los cationes se utilizan en una cantidad suficiente para proporcionar el resultado deseado en términos de estabilidad coloidal de la suspensión acuosa de dichas partículas sintetizadas. Los cationes de tetraalquilamonio se utilizan en una cantidad tal que las nanopartículas obtenidas al final del procedimiento de la invención presenten un potencial zeta tal como se indica anteriormente. Como se ilustra en el ejemplo 1 a continuación, los cationes de tetraalquilamonio, en la reacción de coprecipitación según la invención, son contraiones de los iones ortovanadato (VO₄³⁻) y eventualmente fosfato (PO₄³⁻) (en el caso en el que y ≠ 0).

40 Según una realización particularmente preferida, los iones ortovanadato (VO₄³⁻) son generadas *in situ* a partir de una sal de metavanadato, preferiblemente metavanadato de amonio (NH₄VO₃).

45 Los iones ortovanadato se pueden formar más particularmente *in situ* por reacción de dicha sal de metavanadato con una base (más precisamente con dos equivalentes de una base fuerte).

En particular, la base utilizada para la formación *in situ* de los iones ortovanadato a partir de la sal de metavanadato es una fuente de cationes de tetraalquilamonio. Puede tratarse, por ejemplo, de un hidróxido de tetraalquilamonio, por ejemplo, hidróxido de tetrametilamonio.

50 El uso de una sal de metavanadato tal como, por ejemplo, metavanadato de amonio para la síntesis de nanopartículas según la invención demuestra ser particularmente ventajoso, en comparación con el uso de ortovanadato de sodio, debido a que permite librarse de los problemas de reproducibilidad relacionados con las variaciones en el contenido de carbonato del ortovanadato de sodio.

55 A modo de ejemplo, la reacción de síntesis a partir de metavanadato de amonio y de hidróxido de tetrametilamonio se representa en el ejemplo 1.

También se puede considerar el uso de metavanadato de alquilamonio (no disponible comercialmente) y otra base fuerte, tal como el hidróxido de amonio.

60 Ventajosamente, la presencia de iones de tipo tetraalquilamonio en la superficie de las nanopartículas no sólo permite una gran estabilidad coloidal al final de la síntesis, sino también una estabilidad de las partículas formadas a lo largo de la síntesis, y por lo tanto una mejor reproducibilidad del procedimiento de síntesis en sí.

El procedimiento de preparación de las partículas según la invención puede usar, más particularmente, al menos las siguientes etapas, que consisten en:

5 (i) disponer de una disolución acuosa, anotada disolución (1), que comprende iones ortovanadato (VO_4^{3-}), y eventualmente iones fosfato (PO_4^{3-}), y cationes de tetraalquilamonio;

10 (ii) añadir a la disolución acuosa (1), una disolución acuosa, denominada disolución (2), que comprende dichos precursores de los elementos A y Ln, en particular en forma de sales, en particular de nitratos, en condiciones favorables para la formación por co-precipitación de las nanopartículas de fórmula (I); y

(iii) recuperar dichas nanopartículas de fórmula (I) en la superficie de las cuales se localizan los cationes de tetraalquilamonio, formados al final de la etapa (ii).

15 La disolución acuosa (1), se puede preparar más particularmente por mezcla de al menos una sal de metavanadato, en particular metavanato de amonio y al menos una base, fuente de cationes de tetraalquilamonio, por ejemplo, de un hidróxido de tetraalquilamonio.

En el caso de los iones fosfato, se añade una sal de fosfato, tal como fosfato de sodio o fosfato de amonio.

20 Así, según una variante de realización particularmente ventajosa, el procedimiento de la invención comprende al menos las etapas que consisten en:

25 (i) preparar una disolución acuosa (1) por mezclamiento, en medio acuoso, de una sal de metavanadato, en particular metavanadato de amonio (NH_4VO_3), y eventualmente una sal de fosfato, y una base, fuente de cationes de tetraalquilamonio, en particular un hidróxido de tetraalquilamonio;

30 (ii) añadir a la disolución acuosa (1), una disolución acuosa (2) que comprende dichos precursores de los elementos A y Ln, en particular en forma de sales, en particular nitratos; en condiciones favorables para la formación por coprecipitación de dichas nanopartículas de fórmula (I); y

(iii) recuperar las nanopartículas de fórmula (I) a la superficie de las cuales se localizan los cationes de tetraalquilamonio, formados al final de la etapa (ii).

35 Según una realización particular, la adición en la etapa (ii) de la disolución (2) a la disolución (1) se lleva a cabo gota a gota.

Según otra variante de realización, la disolución (2) se puede añadir a la disolución (1) de una sola vez, y no gota a gota.

40 El medio acuoso de las disoluciones (1) y (2) está formado más particularmente por agua.

En una realización particular, la disolución acuosa (2) que contiene los precursores de los elementos A y Ln puede comprender también unos agentes complejantes de estos elementos, tal como citrato, por ejemplo, citrato de tetraalquilamonio.

45 Pertenece al experto en la materia ajustar adecuadamente las cantidades de los distintos reactivos, en particular de los precursores de iones ortovanadato, opcionalmente fosfato, y de dichos elementos A y Ln, con respecto a la naturaleza deseada para la nanopartícula de fórmula (I) según la invención.

50 En particular, las proporciones estequiométricas de los distintos reactivos según las fórmulas (I), (I'), (II), (II'), (III) y (III') deben ser respetadas. Cuando se prevé una excitación óptica de los iones Ln por excitación directa, es decir, en resonancia con los estados electrónicos de estos iones, y no por excitación de la matriz $\text{AVO}_{4(1-y)}(\text{PO}_4)_y$, y posterior transferencia de energía a estos iones, como se menciona anteriormente, es preferible disponer de un valor alto de x, preferiblemente entre 0,2 y 0,6, y preferiblemente 0,4.

55 Ventajosamente, el procedimiento de preparación de las partículas de la invención no requiere ningún calentamiento de la disolución, a diferencia en particular de los métodos hidrotermales propuestos en las publicaciones [13]-[18]. En particular, el conjunto de las etapas (i) a (iii) para la síntesis de las partículas según la invención se pueden llevar a cabo ventajosamente a temperatura ambiente (20-25°C).

60 Sin embargo, los procedimientos de preparación a temperatura más altas, por ejemplo, del tipo hidrotermal, pueden producir nanopartículas de cristalinidad similares, con la condición de que la temperatura no exceda 600°C, lo que permite así acceder a nanopartículas que presentan una cristalinidad imperfecta como se menciona anteriormente, y así obtener un alto rendimiento cuántico.

65

La etapa (iii) consiste más particularmente en purificar la disolución de partículas obtenidas, en particular para eliminar el exceso de contraiones.

5 Las etapas de purificación pueden comprender más particularmente etapas de diálisis o centrifugación y redispersión de las partículas en un medio acuoso, por ejemplo, por sonicación.

Las partículas se pueden redispersar en un medio acuoso, en particular en agua. Como se menciona anteriormente, la suspensión coloidal acuosa de las partículas de la invención presenta muy buena estabilidad, incluso después de un almacenamiento durante varios meses.

10 Según otro de sus aspectos, la invención se refiere también a las partículas obtenidas al final del procedimiento tal como se describe anteriormente.

15 Según una variante de realización particular, la invención se refiere a un procedimiento de preparación de partículas formadas total o parcialmente a partir de una nanopartícula de fórmula $Y_{1-x}Eu_xVO_4$ (III), con $0 < x < 1$, que comprende al menos las etapas que consisten en:

20 (i) disponer de una disolución acuosa (1), que comprende iones ortovanadato y cationes de tetraalquilamonio, siendo dicha disolución acuosa (1) obtenida preferiblemente del mezclado, en medio acuoso, de metavanadato de amonio (NH_4VO_3) y de un hidróxido de tetraalquilamonio;

25 (ii) añadir a la disolución acuosa (1), una disolución acuosa, denominada disolución (2), que comprende precursores de Y y UE, en particular nitratos de itrio y de europio, en condiciones favorables a la formación por coprecipitación de las nanopartículas de fórmula (III); y

30 (iii) recuperar dichas nanopartículas de fórmula (III) a la superficie de las cuales se localizan los cationes de tetraalquilamonio, formados al final de la etapa (ii).

Según una realización particular, el procedimiento puede comprender además una o más etapas de acoplamiento (injerto) de las partículas obtenidas con uno o más agentes de direccionamiento, en particular con vistas a su uso para un método de diagnóstico *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo*.

35 Pertenece al experto en la materia llevar a cabo los métodos de acoplamiento/injerto adaptados para preparar adecuadamente las partículas con vistas a su uso como sonda de diagnóstico. La cantidad de agente o agentes de direccionamiento utilizado se ajusta con respecto a la cantidad de partículas.

El agente de direccionamiento puede ser injertado directamente, o vía un espaciador (también designado bajo los términos "enlazador" o "espaciador"), a la nanopartícula.

40 Los métodos de acoplamiento (también denominado injerto) de las partículas a biomoléculas son bien conocidos por el experto en la técnica. Se trata generalmente de un acoplamiento por enlace covalente, por complejación de superficie, por interacciones electrostáticas, por encapsulación, o por adsorción. En ciertos casos, incluyendo el caso de un acoplamiento por enlace covalente, las partículas se pueden funcionalizar previamente por uno o más grupos químicos capaces de reaccionar después con otro grupo químico portado por el agente de direccionamiento para formar un enlace covalente.

Como ejemplos de grupos químicos que pueden estar presentes en la superficie de nanopartículas, se pueden citar los grupos carboxilo, amino, tiol, aldehído y epoxi.

50 Por ejemplo, las nanopartículas de la invención se pueden funcionalizar en superficie con citrato, como se ilustra en el Ejemplo 4 a continuación.

Según otra realización particular, las nanopartículas de la invención se pueden funcionalizar en superficie por ácido poli(acrílico) (PAA). En el caso de una funcionalización con PAA, el número de enlaces de coordinación (enlaces dativos) formados por cada molécula de PAA es tanto más importante que el PAA es largo. El PAA puede presentar, por ejemplo, un grado de polimerización que oscila de 3 a 10000.

60 Ventajosamente, la funcionalización de las nanopartículas con PAA conduce a nanopartículas funcionalizadas, y a nanopartículas que resultan del acoplamiento de estas nanopartículas funcionalizadas con uno o más agentes de direccionamiento, que presentan excelentes propiedades en términos de estabilidad en el tiempo.

Los grupos amino pueden ser proporcionados por moléculas tales como los organosilanos aminados, tal como el aminotrietoxisilano (APTES). La ventaja de APTES se basa en el hecho de que forma vía enlaces covalentes una cápsula alrededor de la nanopartícula. Las aminas proporcionadas por APTES son así muy estables en el tiempo. Los grupos amino se pueden transformar en grupos carboxilo por reacción con anhídrido succínico.

Se pueden proporcionar unos grupos carboxilo por moléculas tales como el ácido cítrico o un ácido poli(acrílico) (PAA).

Los grupos carboxilo se pueden activar según cualquier técnica conocida para el experto en la técnica, en particular por reacción con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS), para reaccionar después con las funciones aminas en la superficie de un polipéptido, y forma un enlace amida covalente, cuando el agente de direccionamiento es una proteína o un anticuerpo.

La funcionalización de las nanopartículas por APTES se puede llevar a cabo ventajosamente después del recubrimiento de las nanopartículas con una capa de sílice.

APLICACIONES

Como se ha especificado anteriormente, las partículas sintetizadas según la invención, en particular acopladas a al menos un agente de direccionamiento, encuentran una aplicación particularmente ventajosa como sondas o biomarcadores en muestras biológicas.

La presente invención se refiere, según otro de sus aspectos, al uso de las partículas descritas anteriormente u obtenidas según el procedimiento descrito anteriormente, en particular acopladas a al menos un agente de direccionamiento, o de una suspensión acuosa coloidal de estas partículas, para como agente de diagnóstico, es decir para la detección y/o cuantificación de una sustancia de interés biológico o químico.

Las nanopartículas se pueden utilizar en particular como agente de diagnóstico *in vitro* o *ex vivo*, es decir, para la detección y/o cuantificación de una sustancia de interés biológico o químico en una muestra, en particular una muestra biológica.

Las partículas de la invención se pueden acoplar con varios agentes de direccionamiento.

Por "agente de direccionamiento" se entiende un compuesto que permite un enlace con una sustancia de interés biológico o químico, y cuya identificación está buscada.

Las sondas según la invención se adaptan perfectamente a una amplia diversidad de direccionamientos biológicos, dependiendo las especificidades de la naturaleza del agente o de los agentes de direccionamiento injertados en la superficie de la nanopartícula.

El agente de direccionamiento puede ser más particularmente un anticuerpo policlonal o monoclonal, un fragmento de anticuerpo, un oligonucleido, un péptido, una hormona, un ligando, una citoquina, un peptidomimético, una proteína, un carbohidrato, una proteína modificada químicamente, un ácido nucleico modificado químicamente, un carbohidrato modificado químicamente que tiene como diana una proteína de superficie celular conocida, un aptámero, un ensamblaje de proteína y de ADN/ARN o un cloroalcano utilizado por las etiquetas de tipo HaloTag.

Según una realización particular, se trata de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

Fragmentos de anticuerpos adecuados incluyen al menos un dominio variable de una inmunoglobulina, tales como dominios variables simples Fv, scFv, Fab, (Fab)², y otros fragmentos proteolíticos o "nanocuerpo" (anticuerpos de dominio único tales como los fragmentos V_HH obtenido a partir de anticuerpos de camélidos, o V_{NAR} obtenidos a partir de anticuerpos de peces cartilaginosos).

El término "anticuerpo" según la invención incluye anticuerpos quiméricos; anticuerpos humanos o humanizados, anticuerpos recombinantes y modificados, anticuerpos conjugados, y sus fragmentos.

Según una realización particular, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos usados según la invención tienen como diana marcadores específicos de células cancerosas.

El agente de direccionamiento también puede derivarse de una molécula conocida por enlazarse a un receptor de superficie celular. Por ejemplo, el fragmento de direccionamiento puede derivar de lipoproteínas de baja densidad, transferrina, EGF, insulina, PDGF, enzimas fibrinolíticas, anti-HER2, anti-HER3, anti-HER4, anexinas, interleucinas, interferones, eritropoyetinas, o factores estimulantes de colonias.

Las partículas acopladas a un agente de direccionamiento según la invención se pueden usar en métodos de diagnóstico *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo*, implicando un reconocimiento de una pareja ligando/anti-ligando, por ejemplo biotina o compuestos biotinilados/avidina o estreptavidina, hapteno/anticuerpo, antígeno/anticuerpo, péptido/anticuerpo, azúcar/lectina, polinucleótido/complemento polinucleotídico, etc. entendiéndose que uno de los elementos de estas parejas constituye la molécula de interés biológico, o también puede estar acoplado a la molécula de interés biológico.

Un ejemplo de acoplamiento de partículas según la invención de tipo $Y_{0,6}Eu_{0,4}VO_4$ a una proteína, la estreptavidina, y a un anticuerpo, se da en el Ejemplo 4 a continuación.

5 Las partículas según la invención permiten determinar, por ejemplo, en una muestra biológica, la presencia de la molécula de interés que se asociará con el agente de direccionamiento, estando la revelación de la asociación llevada a cabo gracias a las propiedades de luminiscencia de las partículas de la invención, en particular después de la eliminación de los agentes de direccionamiento que no se enlazarán a la molécula de interés.

10 Las partículas de la invención pueden así ser usadas para la detección y/o la cuantificación de concentraciones de biomarcadores, anticuerpos, ADN, ARN, etc. en muestras biológicas.

Las muestras biológicas se pueden escoger, por ejemplo, de la lista que comprende sangre, suero, plasma, saliva, orina, líquido cefalorraquídeo, etc.

15 Los métodos de diagnóstico *in vitro* o *ex vivo*, que pueden usar las partículas de la invención son ampliamente conocidos por el experto en la materia. A modo de ejemplos, pueden comprender las siguientes técnicas: inmunoensayo, inmunomarcado, inmunohistoquímica, inmuno-citoquímica, inmunomarcado, técnica de transferencia Western, técnica denominada "dot blot", citometría de flujo, método denominado "FACS" para "fluorescence-activated cell sorting", y más generalmente cualquier tipo de detección de biomoléculas en la superficie de células vivas o fijadas, 20 o en cortes de tejidos criogénicos o no, ELISA, ELOSA, ELISPOT, análisis multiplex/multideteción, hibridación *in situ* en fluorescencia o "FISH" (para "Fluorescence *in situ* hybridization"), etc.

Las partículas de la invención pueden también usarse en un método de detección de ADN por hibridación o de detección de ARN por RT-PCR seguida de hibridación.

25 Los soportes para el análisis *in vitro* o *ex vivo* pueden ser de diversas naturalezas. Puede tratarse de portaobjetos, multipozos, microplacas, geles, membranas, tiras, microcanales, etc.

30 La detección puede llevarse a cabo por cualquier dispositivo usual, que comprende, de manera general, una fuente de radiación para la excitación de las partículas, por ejemplo un dispositivo de iluminación láser, en particular monocromática, y un medio de detección de la intensidad luminosa emitida por las partículas, por ejemplo en forma de una cámara tal como una cámara CCD, CCD de multiplicación de electrones (EM-CCD), o un único fotodetector, en particular del tipo fotomultiplicador o fotodiodo.

35 Las enfermedades que pueden diagnosticarse con las partículas de la invención no están limitadas, e incluyen cualquier enfermedad revelada por la presencia de uno o más marcadores específicos de la enfermedad, del tipo de molécula de interés biológico, para el cual existe una pareja de enlace específica.

40 A modo de ejemplos, se pueden citar las enfermedades infecciosas (bacterianas, parasitarias, o víricas, tales como SIDA), las enfermedades inflamatorias y autoinmunes, las enfermedades cardiológicas, neurológicas, u oncológicas (por ejemplo, los cánceres sólidos tales como el cáncer de mama o de próstata).

La invención también se refiere, según otro de sus aspectos, a un kit de diagnóstico, *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, que comprende al menos unas partículas según la invención o una suspensión coloidal acuosa de estas partículas.

45 En particular, se refiere a un kit de detección y/o cuantificación *in vitro* o *ex vivo* de una sustancia de interés biológico o químico en una muestra, que comprende al menos partículas según la invención o una suspensión acuosa coloidal de estas partículas.

50 El kit de detección puede comprender más particularmente:

- un soporte en la superficie del cual está inmovilizado un agente de direccionamiento del analito a detectar/cuantificar, por ejemplo, un primer anticuerpo, denominado "anticuerpo de captura", específico para la sustancia de interés biológico o químico a detectar/cuantificar; y
- 55 - uno o más recipientes que comprenden al menos unas nanopartículas según la invención, y al menos un agente de direccionamiento en forma acoplada o no a las nanopartículas.

60 El soporte puede ser de cualquier tipo, en particular de vidrio o de plástico, tal como una placa, una columna, un gel, unas bolas magnéticas, etc., como se menciona anteriormente. Ventajosamente, se trata de una placa multipocillos. La inmovilización se lleva a cabo típicamente mediante adsorción o mediante enlace covalente en la superficie de los pocillos.

65 Según una primera alternativa, el kit puede comprender nanopartículas según la invención ya enlazadas a un agente de direccionamiento, en particular a anticuerpos, denominados "anticuerpos de revelación" para distinguirlos de los anticuerpos de captura inmovilizados a nivel del soporte.

Las nanopartículas enlazadas a los anticuerpos, utilizados en un kit según la invención, se pueden obtener, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 4, y esquematizado en la Figura 6, mediante el acoplamiento de las nanopartículas acopladas con estreptavidina, con anticuerpos biotinizados, o bien directamente por acoplamiento de los anticuerpos a las nanopartículas funcionalizadas con citrato o ácido poli(acrílico).

Alternativamente, el kit puede comprender varios recipientes que comprenden, de forma aislada, las nanopartículas según la invención y el agente de direccionamiento, y a partir de los cuales el especialista puede preparar nanopartículas según la invención acopladas al agente de direccionamiento.

Por ejemplo, el kit puede comprender un primer recipiente que comprende las nanopartículas de la invención funcionalizadas con citrato o ácido poli(acrílico), y un segundo recipiente que comprende los anticuerpos biotinizados, implicando la preparación de las nanopartículas acopladas a los anticuerpos la activación de las funciones carboxílicas contenidas en el primer recipiente como se describe en el Ejemplo 4, seguida del mezclado del contenido del primer y segundo recipientes.

Por supuesto, un kit de detección según la invención que comprende partículas según la invención no se limita a las variantes de los kits descritos anteriormente.

Las partículas de la invención se pueden usar también, según otra realización, como un agente de diagnóstico destinado a la formación de imágenes ópticas *in vivo*, o como agente amplificador de tratamientos *in vivo* por irradiación.

El presente texto describe así partículas luminiscentes según la invención, acopladas o no a al menos un agente de direccionamiento, para su uso *in vivo* como agente de diagnóstico destinado a la formación de imágenes ópticas o a la formación de imágenes por resonancia magnética cuando las partículas contienen gadolinio, o a la formación de imágenes por rayos X. En particular, se pueden usar como un agente de contraste de IRM.

Las nanopartículas de la invención también se pueden usar en radioterapia debido a su poder sensibilizante.

El presente texto describe así partículas luminiscentes según la invención, acopladas o no a al menos un agente de direccionamiento para su uso *in vivo* como agente amplificador *in vivo* en el tratamiento de cánceres mediante irradiación ionizante (electrones, protones, fotones X o γ , etc.).

Las nanopartículas se utilizan así para reforzar la potencia destructora de la radioterapia en las células tumorales, disminuyendo al mismo tiempo la toxicidad para los tejidos sanos.

Los ejemplos y figuras que se presentan a continuación se dan únicamente a modo ilustrativo, y no limitativo de la invención.

Figuras

Figura 1: Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (MET) de las nanopartículas obtenidas según el Ejemplo 1 (barra de escala: 60 nm (Figura 1a) y 5 nm (Figura 1b), respectivamente);

Figura 2: Histograma de tamaño de las nanopartículas determinado a partir de imágenes MET para un conjunto de aproximadamente 300 nanopartículas según el Ejemplo 1;

Figura 3: Difractogramas de rayos X obtenidos para las nanopartículas sintetizadas según el Ejemplo 1 (línea negra) y 3 (línea gris);

Figura 4: Representación esquemática de las nanopartículas de la invención funcionalizadas con citrato (Figura 4a) o con ácido poli(acrílico) (PAA) (Figura 4b). Para mayor claridad, se muestra una sola molécula de citrato o PAA. Se entiende que cada nanopartícula puede comprender en su superficie numerosas moléculas de citrato o de PAA.

Figura 5: Representación esquemática de las reacciones para el acoplamiento de una nanopartícula según la invención con estreptavidina, según el Ejemplo 4;

Figura 6: representación esquemática del acoplamiento de nanopartículas acopladas con estreptavidina, con un anticuerpo biotinizado.

Se entiende que las Figuras 4 a 6 son esquemas de principio, en particular en lo que se refiere a la estructura de las moléculas de superficie que pueden tener varias configuraciones distintas a las mostradas en estas figuras.

EJEMPLOS**EJEMPLO 1**

5 Síntesis de nanopartículas de $Y_{0,6}Eu_{0,4}VO_4$ según la invención

Como fuente de iones de metavanadatos VO_3^- , se utiliza metavanadato de amonio NH_4VO_3 , siendo el ortovanadato VO_4^{3-} obtenido *in situ* después de una reacción con una base, aquí hidróxido de tetrametilamonio, $N(CH_3)_4OH$. Se utilizaron nitratos de itrio y de europio como fuentes de iones Y^{3+} y Eu^{3+} .

10 Una disolución acuosa de 10 ml de NH_4VO_3 a 0,1 M y 0,2 M de $N(CH_3)_4OH$ (disolución 1) está recientemente preparada.

15 Un volumen de 10 ml de otra disolución de $Y(NO_3)_3$ y $Eu(NO_3)_3$ a 0,1 M en iones ($Y^{3+} + Eu^{3+}$) se añade gota a gota usando una bomba de jeringa en la disolución 1 a un caudal de 1 ml/min.

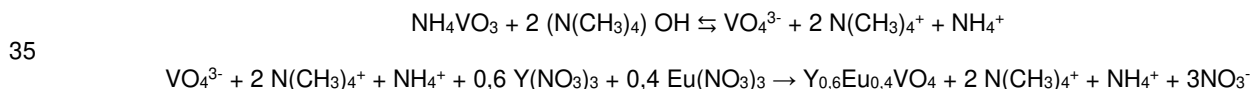
La relación de concentración molar entre $Y(NO_3)_3$ y $Eu(NO_3)_3$ se escoge en función de la relación entre iones Y^{3+} y Eu^{3+} deseada en la nanopartícula, típicamente la relación molar $Y^{3+}:Eu^{3+}$ es 0,6:0,4.

20 Directamente después de la adición de la disolución $Y(NO_3)_2/Eu(NO_3)_3$, la disolución se vuelve difusa, y aparece blanca/lechosa sin formación de precipitado. La síntesis se prosigue hasta la adición total de la disolución $Y(NO_3)_2/Eu(NO_3)_3$.

25 La disolución final de 20 ml se purifica para eliminar el exceso de contraiones. Para ello, se usan centrifugaciones (típicamente tres) a 11000 g (Sigma 3K10, Bioblock Scientific) durante 80 minutos seguidas cada una de una redispersión por sonicación (Branson Sonifier 450 que trabaja al 50% a una potencia de 400 W) hasta alcanzar una conductividad estrictamente menor que $100 \mu S \cdot cm^{-1}$.

30 La conductividad se mide con un conductímetro de química.

La síntesis de nanopartículas de $Y_{0,6}Eu_{0,4}VO_4$ en la superficie de las cuales están inmovilizados los cationes de tetrametilamonio se puede esquematizar de la siguiente manera:



Se lleva a cabo dos ensayos de síntesis ("síntesis 1" y "síntesis 2").

40 Resultados

La observación visual de la disolución de nanopartículas según la invención, después de dejarla reposar durante 16 horas en un matraz, muestra una disolución de difusión uniforme.

45 La disolución final permanece muy estable en agua, incluso después de varios meses en el pH final de la síntesis (aproximadamente pH 7-9). La disolución permanece estable incluso en el medio de síntesis (antes de la eliminación del exceso de contraiones), que tiene sin embargo una alta fuerza iónica ($>0,1 M$).

50 El potencial zeta de las nanopartículas se determina con un dispositivo DLS-Zeta Potential (Zetasizer Nano ZS90, Malvern). Los resultados de los potenciales zeta medidos para las nanopartículas de las dos síntesis se dan en la tabla 1 a continuación.

55 Para las observaciones por microscopía electrónica de transmisión (MET), se depositan unas disoluciones diluidas de nanopartículas en una rejilla de carbono. Las observaciones se llevan a cabo usando un microscopio Philips CM30 que funciona a 300 kV con una resolución de 0,235 nm.

60 La observación de las nanopartículas por MET (Figura 1) muestra que las nanopartículas son de forma elipsoide alargada. Las dimensiones de las nanopartículas se determinan a partir de imágenes de MET para un conjunto de aproximadamente 300 nanopartículas (Figura 2). Las nanopartículas de la invención presentan una longitud del eje mayor, anotada *a*, comprendida entre 20 y 60 nm, con un valor promedio de aproximadamente 40 nm, y una longitud del eje menor, anotada *b*, comprendida entre 10 y 30 nm, con un valor promedio de aproximadamente 20 nm.

65 Las imágenes de MET (Figura 1) no permiten distinguir los planos cristalinos, lo que se debe probablemente al hecho de que la nanopartícula está constituida de varios cristallitos de menor tamaño que el tamaño de la nanopartícula. La naturaleza predominantemente cristalina y policristalina de las nanopartículas se confirma mediante experimentos de difracción de rayos X.

El difractograma de rayos X obtenido con un difractómetro Philips X-pert con la línea $K_{\alpha 1}$ del cobre ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), se representa en la Figura 3. La intensidad difractada se registra usando un detector X'Celerator area detector (PANalytical).

La longitud de coherencia en una dirección cristalográfica, y por tanto el tamaño medio de los cristalitas que constituyen la nanopartícula en esta dirección cristalográfica, se puede estimar a partir de la anchura de los picos en el difractograma RX por aplicación de la fórmula de Scherrer. Los valores de longitud de coherencia obtenidos para las diferentes direcciones cristalográficas están comprendidos entre 3 y 40 nm. La longitud de coherencia en al menos una dirección cristalográfica es menor que la dimensión de la nanopartícula en esta dirección, se puede deducir que las nanopartículas son de cristalinidad imperfecta (policristalinidad, defectos o porosidad). En la dirección (200) (Fig. 3, pico a $2\theta \cong 25^\circ$), la longitud de coherencia es de 10,2 nm, ligeramente inferior a la longitud de coherencia para las nanopartículas del Ejemplo 3 (11,1 nm).

15 EJEMPLO 2 (fuera de la invención)

Síntesis de nanopartículas $Y_{0,6}Eu_{0,4}VO_4$ a partir de metavanadato de sodio, sin contraiones voluminosos

Para la síntesis por coprecipitación de sales metálicas, se utilizaron nitratos de itrio y de europio como fuentes de iones Y^{3+} y Eu^{3+} . Como fuente de iones metavanadatos VO_3^- , se utiliza metavanadato de sodio $NaVO_3$, ortovanadato VO_4^{3-} , que se obtiene *in situ* después de una reacción con una base, aquí el hidróxido de sodio, NaOH.

Se prepara recientemente una disolución acuosa de 10 ml de $NaVO_3$ a 0,1 M y de 0,2 M de NaOH (disolución 1).

Un volumen de 10 ml de otra disolución de $Y(NO_3)_3$ y $Eu(NO_3)_3$ a 0,1 M en iones ($Y^{3+} + Eu^{3+}$) se añade gota a gota usando una bomba de jeringa en la disolución 1 a un caudal de 1 ml/min.

La relación de concentración molar entre $Y(NO_3)_3$ y $Eu(NO_3)_3$ se escoge en función de la relación entre iones Y^{3+} y Eu^{3+} deseada en la nanopartícula, típicamente la relación molar $Y^{3+}:Eu^{3+}$ es 0,6:0,4.

Directamente después de la adición de la disolución $Y(NO_3)_2/Eu(NO_3)_3$, aparece un precipitado lechoso. La síntesis se prosigue hasta la adición total de la disolución $Y(NO_3)_2/Eu(NO_3)_3$.

La disolución final de 20 ml debe ser purificada ahora para eliminar el exceso de contraiones. Para ello, se usan centrifugaciones (típicamente tres) a 11000 g (Sigma 3K10, Bioblock Scientific) durante 80 minutos, seguidas cada una de una redispersión por sonicación (Branson Sonifier 450 que funciona al 50% con una potencia de 400 W) hasta alcanzar una conductividad estrictamente menor que $100 \mu S \cdot cm^{-1}$.

40 Resultados

Una comparación de la disolución obtenida con la disolución de nanopartículas según la invención obtenido en el Ejemplo 1 (para una misma concentración final de iones de vanadato), después de 16 horas en reposo, muestra que, a diferencia de la disolución del Ejemplo 1, la disolución difunde menos (menos blanca); se forma un ligero depósito en el fondo del matraz.

El potencial zeta de las nanopartículas, determinado como se describe en el Ejemplo 1, se presenta en la Tabla 1 a continuación.

50 EJEMPLO 3 (fuera de la invención)

Síntesis de nanopartículas de $Y_{0,6}Eu_{0,4}VO_4$ de ortovanadato de sodio, sin contraiones voluminosos

Para la síntesis por coprecipitación de sales metálicas, se utilizan nitratos de itrio y de europio como fuentes de iones Y^{3+} y Eu^{3+} . Como fuente de iones de ortovanadatos, VO_4^{3-} , se usa ortovanadato de sodio Na_3VO_4 .

Se prepara recientemente una disolución acuosa de 10 ml de Na_3VO_4 0,1 M (disolución 1). El pH se mide y se ajusta si es necesario para alcanzar un valor comprendido entre 12,6 y 13.

Un volumen de 10 ml de otra disolución de $Y(NO_3)_3$ y $Eu(NO_3)_3$ a 0,1 M en iones ($Y^{3+} + Eu^{3+}$) se añade gota a gota utilizando una bomba de jeringa en la disolución 1 a un caudal de 1 ml/min.

La relación de concentración molar entre $Y(NO_3)_3$ y $Eu(NO_3)_3$ se escoge en función de la relación entre iones Y^{3+} y Eu^{3+} deseada en la nanopartícula, típicamente la relación molar $Y^{3+}:Eu^{3+}$ es 0,6:0,4.

Directamente después de la adición de la disolución $Y(NO_3)_2/Eu(NO_3)_3$, aparece un precipitado lechoso. La síntesis se prosigue hasta la adición total de la disolución $Y(NO_3)_2/Eu(NO_3)_3$.

La disolución final de 20 ml debe ser purificada ahora para eliminar el exceso de contraiones. Para ello, se usan centrifugaciones (típicamente tres) a 11000 g (Sigma 3K10, Bioblock Scientific) durante 80 minutos, seguidas cada una de una redispersión por sonicación (Branson Sonifier 450 que funciona al 50% a una potencia de 400 W) hasta alcanzar una conductividad estrictamente inferior a 100 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Resultados

Una comparación de la disolución obtenida con la disolución de nanopartículas según la invención obtenida en el Ejemplo 1 (para la misma concentración final en iones de vanadato), después de 16 horas en reposo, muestra que, a diferencia de la disolución del Ejemplo 1, la mayoría de las nanopartículas se depositan en el fondo del matraz; la parte superior de la disolución es casi transparente, lo que indica una ausencia de difusión, y por lo tanto de nanopartículas en disolución.

El potencial zeta de las nanopartículas, determinado como se describe en el Ejemplo 1, se presenta en la Tabla 1 a continuación.

El difractograma de rayos X obtenido con un difractor Philips X-pert se representa en la Figura 3.

Al igual que para el ejemplo 1, el tamaño medio de los cristalitas que constituyen la nanopartícula en la dirección cristalográfica (200) se puede estimar mediante la aplicación de la fórmula de Scherrer, y da un valor comprendido entre 3 y 40 nm. El tamaño de los cristalitas es generalmente menor que las dimensiones de la nanopartícula, por lo tanto, se puede deducir que las nanopartículas sintetizadas según el Ejemplo 3 también son policristalinas.

Ejemplos	Ejemplo 1 (según la invención)		Ejemplo 2 (fuera la invención)	Ejemplo 3 (fuera de la invención)
	Síntesis 1	Síntesis 2		
Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	93	80	53	66
pH	4,8	5,0	5,4	9,6
Potencial Zeta ζ^*	-33,3	-34,6	-2,30	-18,00
* medidas del potencial zeta realizadas después de la purificación para tener una conductividad $<100 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, y después de la dilución en agua Milli-Q® ácida.				

TABLA 1: Comparación del potencial zeta ζ de las nanopartículas obtenidas según el ejemplo 1 según la invención (síntesis a base de metavanadato de amonio con contraiones voluminosos), y según los Ejemplos 2 y 3 no conformes a la invención (síntesis a base de metavanadato de sodio sin contraiones voluminosos y síntesis a base de ortovanadato sin contraiones voluminosos).

La comparación de los potenciales zeta de las nanopartículas obtenidas según los Ejemplos 1 a 3 confirma que las nanopartículas según la invención (Ejemplo 1) presentan una estabilidad coloidal mejorada con $|\zeta| > 30$ mV en comparación con las nanopartículas obtenidas sin cationes de tetraalquilamonio (Ejemplos 2 y 3).

Se realizó una síntesis alternativa de nanopartículas de $\text{Y}_{0,6}\text{Eu}_{0,4}\text{VO}_4$ según la invención según el mismo protocolo que la síntesis del Ejemplo 1, con la única diferencia de que la disolución de 10 ml de $\text{Y}(\text{NO}_3)_3$ y $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ a 0,1 M en iones ($\text{Y}^{3+} + \text{Eu}^{3+}$) no se añade a la disolución 1 gota a gota, sino de una vez.

Al final de la síntesis, después de la purificación, el potencial zeta es de -35 mV a un pH de 7,8.

EJEMPLO 4

Acoplamiento de nanopartículas con la proteína estreptavidina

i. Injerto del citrato a la superficie de las nanopartículas

Al final de la síntesis de las nanopartículas según el ejemplo 1, se centrifuga la disolución de nanopartículas a 17000 g durante 3 minutos, para precipitar los eventuales agregados de nanopartículas, y se recupera el sobrenadante.

Se extraen aproximadamente 250 μl de partículas $\text{Y}_{0,6}\text{Eu}_{0,4}\text{VO}_4$ con una concentración de 5 mM en iones vanadato, y se dispersan en 1 ml de una disolución de agua destilada que contiene el ión citrato (concentración 0,2 M).

La disolución se sonifica después durante 5 minutos, y después se centrifuga a 17000 g durante 3 minutos. Esta etapa se repite 3 veces.

Al final de este injerto, las partículas se dispersan en agua destilada, disolvente en el que son estables.

La funcionalización de las nanopartículas con citrato se puede sustituir por una funcionalización con PAA (por ejemplo, con un grado de polimerización comprendido entre 3 y 10000), usando una sal de PAA, tal como, por ejemplo, una sal de sodio o de amonio.

5 En la Figura 4, se representan esquemáticamente las nanopartículas de la invención funcionalizadas con (a) citrato y (b) ácido poli(acrílico).

ii. Acoplamiento de nanopartículas con estreptavidina

10 Se centrifugan las nanopartículas (NPs) injertadas con los iones citrato a 16000 g durante 1 hora, después se recupera el pelete.

15 El acoplamiento de las nanopartículas injertadas en superficie por citrato con estreptavidina se lleva a cabo según el siguiente protocolo:

1. Preparar recientemente una disolución mixta de EDC ¹/Sulfo-NHS ² (concentración 30 y 30 mg/ml, respectivamente) en un amortiguador MES ³ (pH 5-6).

20 2. Dispersar por sonicación (baño de ultrasonidos) el pelete de las NPs en 250 µl de la disolución preparada en la etapa paso 1. Las pérdidas durante las centrifugaciones son bajas, por lo tanto la concentración de iones de vanadato sigue siendo del orden de 5 mM, lo que da una concentración en nanopartículas de 48 nM. (La concentración de vanadato de las disoluciones de nanopartículas se determinó por disolución de las partículas en un medio ácido seguida de una determinación colorimétrica de la concentración de iones vanadato, tal como se describe en la referencia Abdesselem et al., ACS Nano 8, 11126-11137 (2014). La concentración molar en nanopartículas se determinó a partir de la concentración de iones vanadato, tal como se describe en la referencia Casanova et al., Appl. Phys. Lett 89, 253103 (2006)).

30 3. Preparar una disolución de estreptavidina (SA) 100 nM en un amortiguador fosfato pH 7,4 con NaCl 10 mM. Diluir la disolución de estreptavidina hasta alcanzar una concentración determinada por el número de proteínas injertadas por nanopartículas deseado (para una relación estreptavidina:NPs de 1:1, 5:1 y 10:1, seleccionar, respectivamente, las concentraciones de 4,8 nM, 24 nM y 48 nM). Añadir 250 µl de esta disolución a la disolución de nanopartículas.

35 4. Dejar incubar entre 2 y 4 horas a temperatura ambiente.

5. añadir 1 ml de PBST ⁴ y agitar en un mezclador de vórtice.

40 6. Realizar una centrifugación de 6500 g durante 30 min y recoger el pelete para eliminar las proteínas no acopladas a las NPs. Eliminar completamente el sobrenadante. Redispersar las NP acopladas con las proteínas en 1 ml de PBST, y sonicar en un baño de ultrasonidos. Repetir esta etapa dos veces.

7. Recuperar las NPs acopladas con las proteínas en 250 µl de PBS ⁵ con 1% de BSA ⁶.

45 8. Almacenar a 4°C para uso inmediato, o alícuotar y almacenar a -80°C.

El acoplamiento de nanopartículas con estreptavidina se representa esquemáticamente en la Figura 5.

Material usado para el ensayo de funcionalización:

50 ¹ Hidrocloruro de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC) (sigma, cat# E1769).

² Sal sódica de *N*-hidroxisulfosuccinimida (Sulfo-NHS) (sigma, cat# 56485).

55 ³ Ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico (MES) (10 mM, pH 5-6).

⁴ Amortiguador fosfato salino pH 7,4 (10 mM NaCl) + 0,05% Tween 20 (PBST).

⁵ Albúmina de suero bovino (BSA) (sigma, cat# A3059).

60 ⁶ Amortiguador fosfato salino (PBS) (pH 7,4, 10 mM NaCl).

Se determina el número de moléculas de estreptavidina (SA) por nanopartícula (NP), anotado R, caracterizado al final del protocolo de acoplamiento vía la evaluación de la estreptavidina mediante el método denominado de BCA, según el protocolo detallado anteriormente.

Protocolo de caracterización de la relación estreptavidina:nanopartículas (SA:NPs)

I. Evaluación de SA por el método denominado de BCA

5 Principio

En un medio alcalino, las proteínas reducen el Cu^{2+} en Cu . La sal del ácido biconónico (BCA) forma un complejo coloreado con iones Cu^{2+} . Este complejo es cuantificable gracias a su absorción a 562 nm.

10 Modo de realización

Kit de ensayo de BCA de ThermoFisher (Pierce™ BCA Protein Assay Kit Cat. Num 23225)

- Preparación del reactivo del ensayo Cu^{2+} /BCA según el protocolo del kit de ThermoFisher.
- Preparación de la SA para la curva de calibración. Para la curva de calibración, el ensayo se realiza tres veces.

TABLA 2: concentración en estreptavidina de las disoluciones de calibración

Tubos	Concentración final en SA ($\mu\text{g/ml}$)
A	2000
B	1500
C	1000
D	750
E	500
F	250
G	125
H	25
I	0 = blanco

20 El modo de realización es el siguiente:

- Coger una placa de 96 pocillos. Colocar 25 μL de cada tubo de patrón A a I (de concentración conocida en SA) o de proteínas conjugadas a las nanopartículas a evaluar en los pocillos correspondientes.
- Añadir 200 μl del reactivo de ensayo de Cu^{2+} /BCA en cada pocillo. Homogeneizar, tapar y dejar incubar durante 30 min a 37°C.
- Leer las absorbancias (A) a 562 nm en función de la concentración final, teniendo en cuenta la dilución. Establecer la relación de calibración $A = f(\text{concentración de SA en } \mu\text{g/ml})$ por regresión lineal.

La concentración de las proteínas conjugadas con las nanopartículas a evaluar se deduce de la ecuación de la regresión lineal obtenida con la curva de calibración.

35 ii. Caracterización de la relación SA:NPs

La concentración másica de estreptavidina obtenida con el ensayo de BCA se convierte en una concentración molar utilizando la siguiente fórmula:

$$[\text{SA}]_{\text{molar}}(\text{moles/l}) = \frac{[\text{SA}]_{\text{másica}}(\text{g/l})}{\text{Masa molar}(\text{g/mol})}$$

Para obtener la relación (R) del número de SA:NP, se aplica finalmente la siguiente ecuación:

$$R = \frac{[\text{SA}]_{\text{molar}}}{[\text{NPs}]_{\text{molar}}}$$

La Tabla 3 a continuación recopila los valores obtenidos para las diferentes relaciones de concentración entre la disolución de estreptavidina y la disolución de nanopartículas de partida.

Relaciones de concentración entre la disolución de estreptavidina y la disolución de nanopartículas	1:1	5:1	10:1
Número determinado de moléculas de estreptavidina por nanopartícula al final del acoplamiento	0,97	3,8	9,29

50 TABLA 3: Caracterización del acoplamiento nanopartícula-estreptavidina para diferentes relaciones de concentración entre la disolución de estreptavidina y la disolución de nanopartículas.

Como destaca de los resultados presentados en la Tabla 3, el número de moléculas de estreptavidina por nanopartícula después del acoplamiento es del mismo orden que la relación de concentración en las disoluciones iniciales, y por lo tanto indica una muy buena eficiencia de acoplamiento.

Las nanopartículas así acopladas a estreptavidina pueden usarse ventajosamente en un método de diagnóstico *in vitro* acoplando las nanopartículas a un anticuerpo biotinilado, como se ilustra esquemáticamente en la Figura 6.

Alternativamente, también es posible acoplar directamente anticuerpos a las nanopartículas injertadas con iones citrato. En este caso, se utilizará el mismo protocolo que anteriormente, sustituyendo la disolución de estreptavidina por una disolución de anticuerpos.

EJEMPLO 5 (fuera de la invención)

Síntesis de nanopartículas $Y_{0,6}Eu_{0,4}VO_4$ a partir de metavanadato de sodio, con adición de iones de tetraalquilamonio al final de la síntesis

Se prepara una suspensión coloidal de nanopartículas $Y_{0,6}Eu_{0,4}VO_4$ a partir de sales de sodio según la síntesis del Ejemplo 2.

La purificación se realiza mediante diálisis.

Se añade 1 equivalente (con respecto a los iones vanadato) de hidróxido de tetrametilamonio $N(CH_3)_4OH$, se deja 20 minutos, después se dializa nuevamente para eliminar el exceso de contraiones hasta alcanzar una conductividad estrictamente menor que $100 \mu S.cm^{-1}$.

El potencial zeta, determinado como se describe en el Ejemplo 1, al pH de la suspensión obtenida de 8,9 es -2,20 mV.

No es posible obtener el mismo resultado que aquel obtenido con el procedimiento de la invención, usando un procedimiento de síntesis de las nanopartículas estándar y después añadiendo, al final de la síntesis, iones voluminosos de tipo tetraalquilamonio.

Referencias

[1] "Bioconjugate Techniques", GT Hermanson, Academic Press, 1996;

[2] "Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity. A Practical Guide to Technology for Quantitative Real-Time Analysis", Segunda edición, Mason WT, Ed., Academic Press, 1999;

[3] Nam et al., Science 301, 1884-1886 (2003);

[4] Riwotzki et al., J. Phys. Chem. B 1998, 105, 12709-127;

[5] Huignard et al., Chem. Mater. 2000, 12, 1090-1094;

[6] Riwotzki et al., Angew. Chem. 2001, 40(3), 573-576;

[7] Lehmann et al., J. Am. Chem. Soc. 2004, 126(45), 14935-14942;

[8] Riwotzki et al., J. Phys.Chem. B.I, IB., 2000, 104, 2824-2828;

[9] Huignard et al., Chem. Mater. 2000, 12, 10920-1094;

[10] Giaume et al., Langmuir 2008, 24, 11018-11026;

[11] Huignard et al., Chem. Mater. 2002, 14, 2264-2269;

[12] Riwotzki et al., J. Phys. Chem. B 1998, 102, 10129-10135;

[13] Mialon et al., Acs Nano, 2008 - ACS Publication, vol. 2, Nº 12, 2505-2512;

[14] Li et al., J. Phys. Chem. C 2008, 112, 6228-6231;

[15] Wu et al., J. Mater. Chem., 2003, 13, 1223-1228;

[16] Liang et al., J. Alloys and Compounds 552 (2013) 289-293;

[17] Wu et al., J. Phys. Chem. B 2006, 110, 15791-15796;

[18] Xu et al., Inorg. Chem. 2010, 49, 6706-6715;

[19] Takeshita et al., Journal of Luminescence 128 (2008) 1515-1522.

5

REIVINDICACIONES

1. Partícula luminiscente que comprende una nanopartícula de fórmula:



en la que:

- A se selecciona de itrio (Y), gadolinio (Gd), lantano (La), y sus mezclas;
- Ln se selecciona de europio (Eu), disprosio (Dy), samario (Sm), neodimio (Nd), erbio (Er), iterbio (Yb), y sus mezclas;
- $0 < x < 1$; y
- $0 \leq y < 1$;

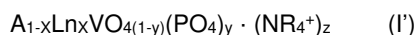
caracterizado por que la nanopartícula presenta en superficie cationes de tetraalquilamonio en una cantidad tal que dicha nanopartícula tiene un potencial zeta, anotado ζ , menor o igual a -28 mV, en un medio acuoso de pH ≥ 5 , en particular de pH $\geq 5,5$, y con una conductividad iónica estrictamente menor que $100 \mu S \cdot cm^{-1}$.

2. Partícula según la reivindicación anterior, caracterizado por que dichos cationes de tetraalquilamonio están asociados con la nanopartícula vía interacciones electrostáticas con los iones de superficie de la nanopartícula cargadas negativamente O^{2-} .

3. Partícula según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que dichos cationes de tetraalquilamonio son cationes de fórmula NR_4^+ en la que R, idénticos o diferentes, representan un grupo alquilo de C_1-C_6 , en particular alquilo de C_1-C_4 , y más particularmente alquilo de C_1-C_3 ; preferiblemente dichos cationes de tetraalquilamonio se seleccionan entre tetrametilamonio, tetraetilamonio, tetrapropilamonio, tetrapropilamonio, y sus mezclas, en particular dichos cationes de tetraalquilamonio son cationes de tetrametilamonio.

4. Partícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicha nanopartícula presenta un potencial zeta ζ menor o igual a -30 mV, en un medio acuoso de pH $\geq 6,5$, en particular de pH ≥ 7 , y con una conductividad iónica estrictamente menor que $100 \mu S \cdot cm^{-1}$.

5. Partícula según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, siendo dicha nanopartícula de fórmula (I')



en la que:

- A se selecciona de Y, Gd, La, y sus mezclas;
- Ln se selecciona de Eu, Dy, Sm, Nd, Er, Yb, y sus mezclas;
- $0 < x < 1$;
- $0 \leq y < 1$;
- R, idénticos o diferentes, representan un grupo alquilo de C_1-C_6 , en particular alquilo de C_1-C_4 , particularmente alquilo de C_1-C_3 , y muy particularmente metilo; y
- z representa el número de cationes de tetraalquilamonio NR_4^+ localizados en la superficie de dicha nanopartícula, en particular z está comprendido entre 100 y 10000.

6. Partícula según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que:

y vale 0; y/o

A representa Y; y/o

Ln representa Eu.

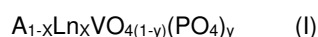
7. Partícula según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicha nanopartícula es de fórmula $Y_{1-x}Eu_xVO_4 \cdot (NR_4^+)_z$ (III'), en la que x, R y z son como se definen en la reivindicación 5, en particular de fórmula $Y_{0,6}Eu_{0,4}(VO_4) \cdot (NR_4^+)_z$ (III'), en la que z es como se define en la reivindicación 5.

8. Partícula según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la nanopartícula de fórmula (I) es de forma elipsoidal alargada, que presenta en particular una longitud del eje mayor, a , comprendida entre 20 y 60 nm y una longitud del eje menor, b , comprendida entre 10 y 30 nm.

9. Partícula según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el producto entre el porcentaje de dopaje, x , en iones Ln, en particular en Eu, y el rendimiento cuántico de la emisión por la nanopartícula está maximizado, en particular en la que la nanopartícula presenta una cristalinidad imperfecta.

10. Partícula según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicha nanopartícula está acoplada a al menos un agente de direccionamiento.

11. Procedimiento para preparar partículas luminiscentes que comprende una nanopartícula de fórmula:



en la que:

- A se selecciona entre itrio (Y), gadolinio (Gd), lantano (La), y sus mezclas;

- Ln se selecciona entre europio (Eu), disprosio (Dy), samario (Sm), neodimio (Nd), erbio (Er), iterbio (Yb), y sus mezclas;

- $0 < x < 1$; y

- $0 \leq y < 1$;

por reacción de coprecipitación, en medio acuoso, a partir de precursores de dichos elementos A y Ln, y en presencia de iones ortovanadato (VO_4^{3-}) y eventualmente fosfato (PO_4^{3-});

estando dicha reacción llevada a cabo en presencia de una cantidad eficaz de cationes de tetraalquilamonio tal que dicha nanopartícula presenta un potencial zeta, anotado ζ , menor o igual a -28 mV, en un medio acuoso de pH ≥ 5 , en particular de pH $\geq 5,5$, y con una conductividad iónica estrictamente menor que $100 \mu S \cdot cm^{-1}$.

12. Procedimiento según la reivindicación anterior, caracterizado por que comprende al menos las etapas que consisten en:

(i) disponer de una disolución acuosa, anotada disolución (1), que comprende iones ortovanadato (VO_4^{3-}), y eventualmente iones fosfato (PO_4^{3-}), y cationes de tetraalquilamonio;

(ii) añadir a la disolución acuosa (1) una disolución acuosa, denominada disolución (2), que comprende dichos precursores de los elementos A y Ln, en particular en forma de sales, especialmente nitratos, en condiciones propicias para la formación por coprecipitación de las nanopartículas de fórmula (I); y

(iii) recuperar las nanopartículas de fórmula (I) a la superficie de las cuales se localizan unos cationes de tetraalquilamonio, formadas al final de la etapa (ii).

13. Procedimiento según la reivindicación 11 o 12, en el que los cationes de tetraalquilamonio se seleccionan entre tetrametilamonio, tetraetilamonio, tetrapropilamonio, tetrabutilamonio, y sus mezclas, en particular dichos cationes de tetraalquilamonio son cationes de tetrametilamonio.

14. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, para preparar partículas tales como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9.

15. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que los iones ortovanadato (VO_4^{3-}) son generados *in situ* haciendo reaccionar una sal de metavanadato, en particular metavanadato de amonio (NH_4VO_3), con una base, en particular una base fuente de cationes de tetraalquilamonio, y muy particularmente con un hidróxido de tetraalquilamonio.

16. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, caracterizado por que comprende además una o más etapas de acoplamiento de las partículas con uno o más agentes de direccionamiento.

17. Suspensión acuosa coloidal que comprende partículas como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, u obtenidas según el procedimiento definido según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16.

18. Uso de partículas tales como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 u obtenidas según el procedimiento definido en una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, o de una suspensión acuosa coloidal de estas partículas, como agente de diagnóstico.
- 5 19. Kit de diagnóstico, que comprende al menos unas partículas tales como se define según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o tales como se obtienen mediante el procedimiento definido según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, o una suspensión acuosa coloidal de estas partículas.

Fig. 1a

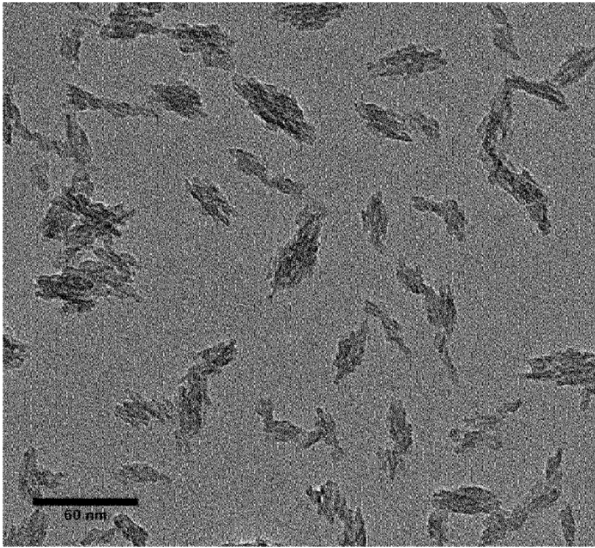


Fig. 1b

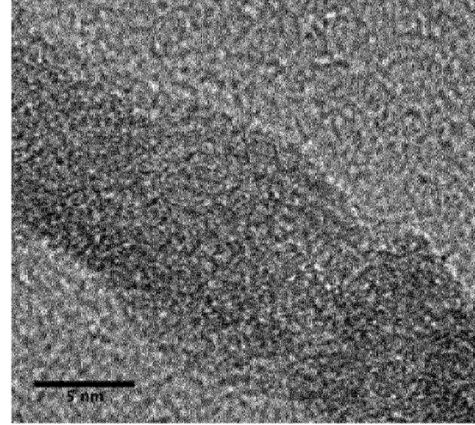


FIGURA 1

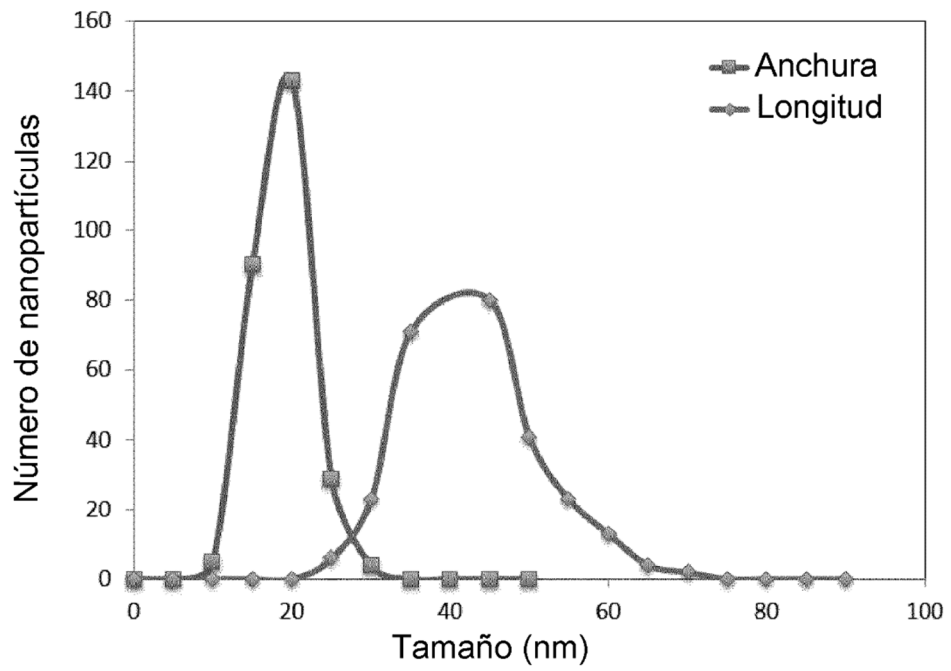


FIGURA 2

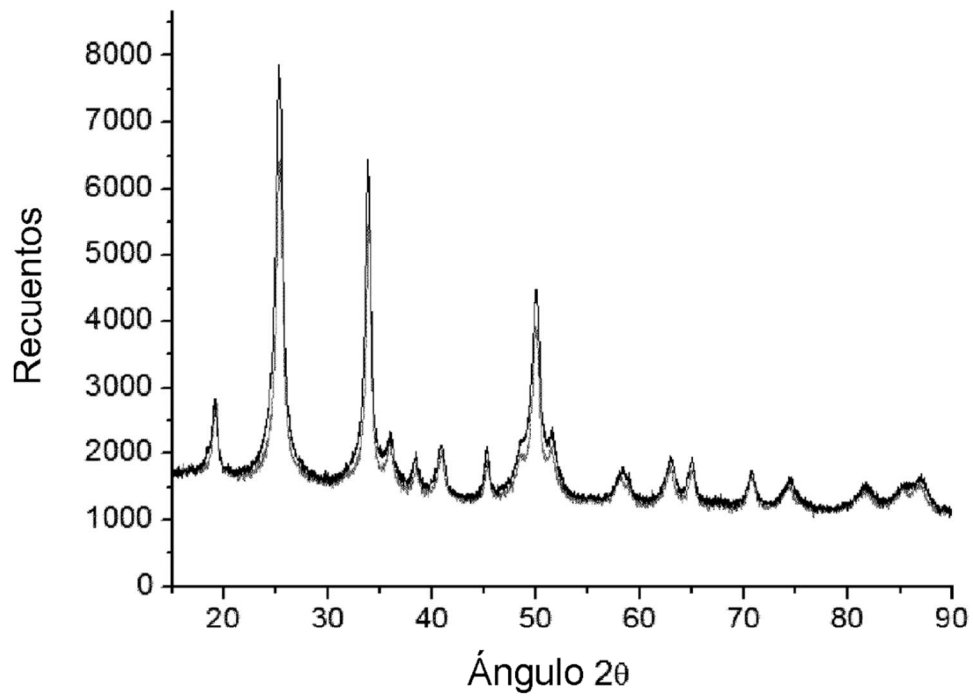


FIGURA 3

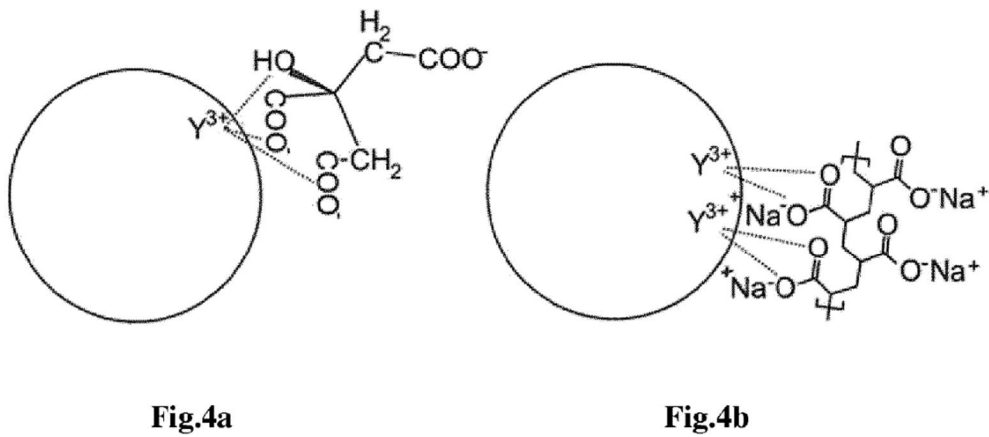


Fig.4a

Fig.4b

FIGURA 4

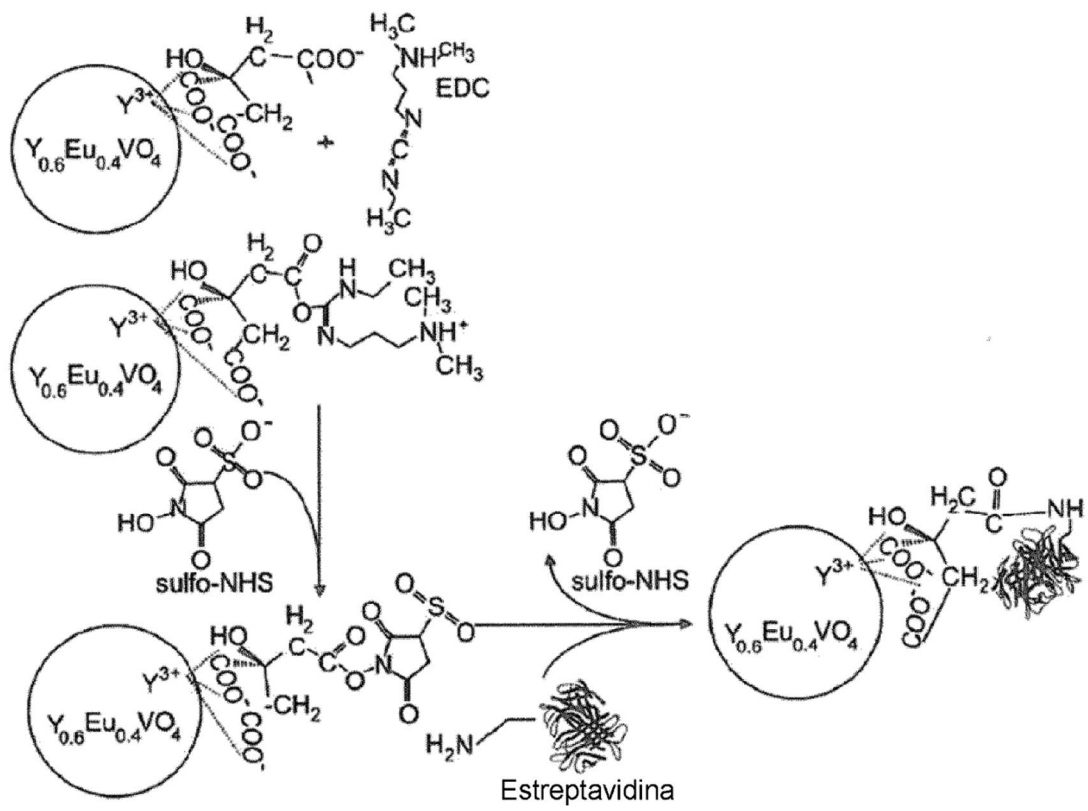


FIGURA 5

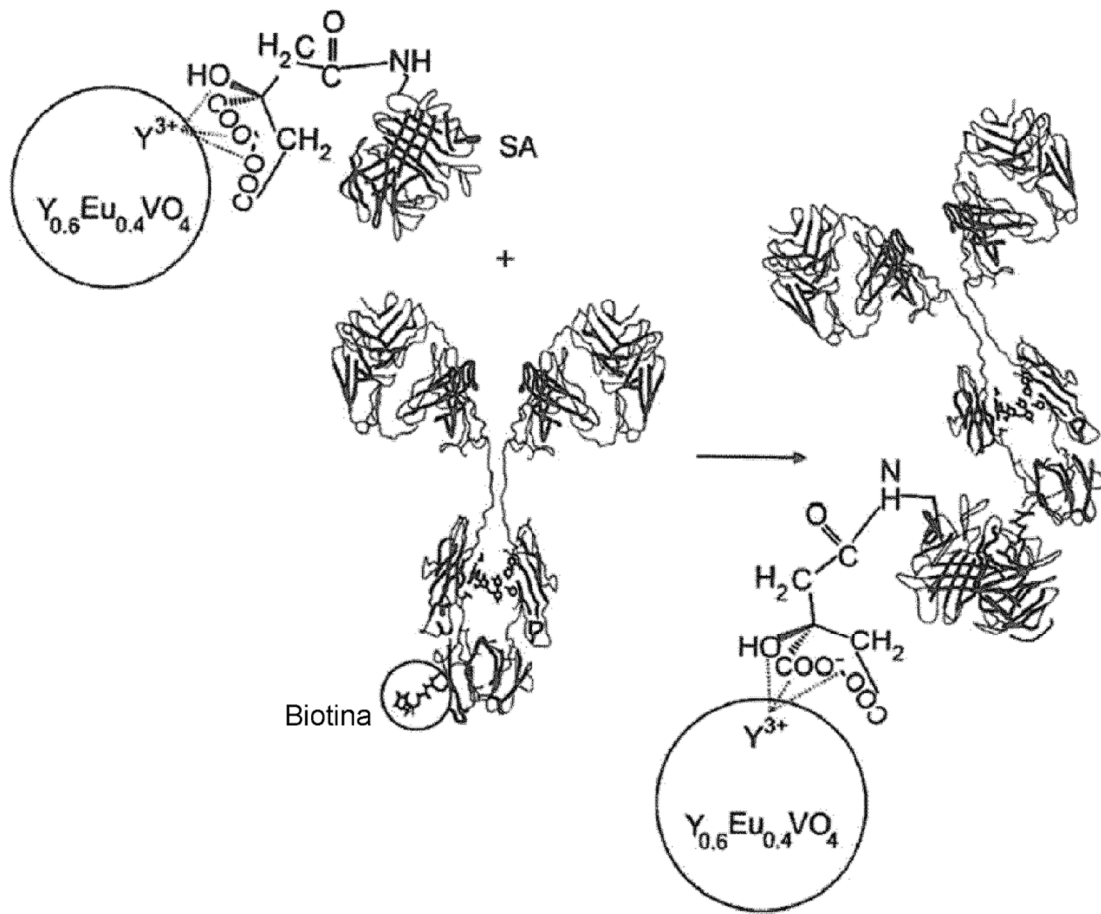


FIGURA 6