

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la  
Propiedad Intelectual  
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2016/016505 A1**

(43) Fecha de publicación internacional  
4 de febrero de 2016 (04.02.2016) **WIPO | PCT**

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:  
*A61K 49/06* (2006.01) *B82Y 30/00* (2011.01)  
*C01C 3/08* (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2015/070595
- (22) Fecha de presentación internacional:  
30 de julio de 2015 (30.07.2015)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:  
P 201431165 31 de julio de 2014 (31.07.2014) ES
- (71) Solicitantes: **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; C/ Serrano, 117, 28006 Madrid (ES). **UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA (UPV)** [ES/ES]; Ctro. Apoyo a la Innovación, la Investigación y la Transferencia de Tecnología, CTT, Edf. 6G, Camino de Vera, s/n, 46022 Valencia (ES).
- (72) Inventores: **BOTELLA ASUNCIÓN, Pablo**; Instituto de Tecnología Química (ITQ), Campus UPV, Avda. de los Naranjos, s/n, Edificio C, 46022 Valencia (ES). **CABRERA GARCÍA, Alejandro**; Instituto de Tecnología Química (ITQ), Campus UPV, Avda. de los Naranjos, s/n, Edificio C, 46022 Valencia (ES).
- (74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta de Rubén Darío, 4, 28010 Madrid (ES).
- (81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publicada:**  
— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

(54) Title: HYBRID MATERIAL AS CONTRAST AGENT IN MAGNETIC RESONANCE IMAGES

(54) Título : MATERIAL HÍBRIDO COMO AGENTE DE CONTRASTE EN IMÁGENES DE RESONANCIA MAGNÉTICA

(57) Abstract: The invention relates to a contrast agent of magnetic resonance based on a hybrid material formed by an organo-metallic core derived from Prussian blue and a silica cover, and optionally, molecules of a poly(ethylene glycol), a fluorescent agent, a radio nucleus and/or a substance that directs to specific receptors, cells or tissues, joined by covalent bonding to the surface of the inorganic cover.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a un agente de contraste de resonancia magnética basado en un material híbrido compuesto de un núcleo organo-metálico derivado del azul de Prusia y una cubierta de sílice y, opcionalmente, moléculas de un poli(etilenglicol), un agente fluorescente, un radionúcleo y/o una sustancia directora a receptores, células o tejidos específicos, unidas por enlace covalente a la superficie de la cubierta inorgánica.



WO 2016/016505 A1

## MATERIAL HÍBRIDO COMO AGENTE DE CONTRASTE EN IMÁGENES DE RESONANCIA MAGNÉTICA

### DESCRIPCIÓN

5

#### **Campo de la Técnica**

La presente invención se enmarca dentro de las aplicaciones de los derivados del azul de Prusia (AP) para imagen y diagnóstico. La elevada solubilidad de los materiales en fluidos biológicos y el carácter altamente tóxico de sus componentes limita su utilización en la práctica clínica. La incorporación de una cubierta insoluble y biocompatible basada en sílice estabiliza las nanopartículas del derivado del AP y reduce su toxicidad *in vitro* e *in vivo*, a la vez que favorece la acumulación del compuesto magnéticamente activo en tejidos patógenos por el efecto de permeabilidad y retención aumentada y mejora el contraste en la imágenes de resonancia magnética.

15

#### **Antecedentes**

La resonancia magnética de imagen (MRI) es una técnica de diagnóstico clínico no invasiva y no radiactiva de amplia utilización. La intensidad de las imágenes obtenidas por MRI depende de la densidad de protones del agua en los tejidos examinados, así como de los tiempos de relajación longitudinal ( $T_1$ ) y transversal ( $T_2$ ). Habitualmente, la diferencia en la densidad de protones del agua en los distintos tejidos es escasa, por lo que para obtener alta resolución en las imágenes de MRI es necesaria la administración de un agente de contraste (CA). Se trata de un compuesto capaz de modificar los valores de  $T_1$  y  $T_2$  en los tejidos. Habitualmente se diferencia dos tipos de estos agentes: aquellos capaces de reducir el valor de  $T_1$  y aquellos capaces de bajar el  $T_2$ . En el primer caso, se trata de sustancias que aumentan el brillo (contraste positivo) de las imágenes de MRI, mientras que en el segundo caso se trata de compuestos que oscurecen aquellas regiones en las que se acumulan (contraste negativo). Al respecto, desde un punto de vista de su aplicación en diagnóstico clínico, la información aportada por los agentes  $T_1$  es muy superior a la que ofrecen las sustancias que disminuyen el  $T_2$ , si bien la combinación de ambos puede resultar complementaria.

35

El agente de contraste para MRI puede ser inyectado vía intravenosa (*iv*) para mejorar la visualización de tumores, vasos sanguíneos y/o tejidos inflamados, entre otros. Igualmente, un agente de contraste puede ser inyectado directamente sobre un determinado órgano o tejidos, o sobre una articulación, cuando se desee obtener una imagen específica de los mismos. Como se ha comentado, se diferencian dos tipos de estos materiales magnéticamente activos capaces de modificar el contraste en las imágenes de MRI: paramagnéticos, capaces de reducir primariamente el  $T_1$  (agentes  $T_1$ ) y ferromagnéticos, capaces de bajar primariamente el  $T_2$  (agentes  $T_2$ ).

10 Todos los agentes  $T_1$  utilizados en MRI clínica están basados en complejos paramagnéticos de  $Gd^{3+}$  y ligandos poliaminopolicarboxilatos solubles en medio fisiológico. El elevado spin electrónico de este catión, con 7 electrones desapareados ( $4f^7$ ,  $S=7/2$ ), unido a su estado electrónico basal ( $^8S_{7/2}$ ) y a la lenta relajación electrónica ( $10^{-9}$  s), proporciona al  $Gd^{3+}$  unas propiedades magnético-nucleares únicas para la disminución del tiempo de relajación longitudinal de los protones del agua. Sin embargo, el uso de estos compuestos solubles de  $Gd^{3+}$  conlleva una serie de problemas y riesgos que limitan la práctica clínica. En primer lugar, la baja relajatividad del  $T_1$  de estos agentes ante la acción de un campo magnético de alta intensidad obliga a administrar elevadas dosis para obtener contraste, debiendo alcanzar una concentración plasmática superior a 0,1 mM. Además, estas moléculas de pequeño tamaño presentan una velocidad de aclaramiento plasmático muy elevada, lo que reduce considerablemente el tiempo de medida. Todo esto complica la utilización clínica de los agentes  $T_1$ , puesto que el  $Gd^{3+}$  es un potente tóxico del sistema renal, pudiendo dar lugar a fibrosis sistémica nefrogénica y dermatopatía nefrogénica fibrosante, como consecuencia de la liberación del catión por el quelato. Dicha toxicidad es una consecuencia del radio atómico del  $Gd^{3+}$  (1,02 Å), muy similar al del  $Ca^{2+}$  (1,00 Å). De esta forma, la presencia de  $Gd^{3+}$  libre en el organismo provoca la alteración de las funciones de los canales de calcio dependientes del voltaje de las membranas celulares.

30 Todos los agentes de contraste  $T_2$  aprobados para uso hospitalario en MRI se basan en nanopartículas de óxido férrico superparamagnéticas (SPIONs, 5-500 nm). A pesar de que se trata de materiales con elevada sensibilidad, no tóxicos y con capacidad para entrar en las células, desde el punto de vista de diagnóstico clínico e imagen celular, la resolución de las imágenes obtenidas con agentes  $T_2$  es inferior a las generadas por compuestos  $T_1$  y, con frecuencia, resulta difícil distinguirlas de

35

hemorragias, calcificaciones, depósitos metálicos y otras formaciones posibles en un tejido dañado.

Por otro lado, tanto los agentes de contraste  $T_1$  como  $T_2$  son inestables en el medio ácido estomacal, lo que impide su administración oral. Al respecto, el desarrollo de un nuevo agente de contraste requiere un sistema estable en medio fisiológico, con elevado tiempo de residencia plasmática y capaz de acumularse en los tejidos y células diana, permitiendo mejorar el contraste en las imágenes de MRI a baja concentración, a la vez que se aumenta el periodo durante el cual es posible realizar el estudio. Asimismo, debe tratarse de un sistema de fácil eliminación, fundamentalmente por vía renal o digestiva, una vez cumplido su cometido, sin que los procesos intracelulares a los que pueda verse sometido den lugar a metabolitos tóxicos. Por último, con vistas a mejorar la resolución de las imágenes de MRI, sería de gran interés que dicho agente de contraste permita reducir sensiblemente los valores de  $T_1$  y  $T_2$  conjuntamente.

Los derivados del AP dopados con un  $Gd^{3+}$  u otro catión paramagnético presentan utilidad como agentes de contraste  $T_1$  y  $T_2$ . En la patente US 2010/0254912 **2010**; Huang, S.D.; Li, Y.; Shokouhimehr, M., se presenta un material basado en nanopartículas ultrafinas de AP dopado con  $Gd^{3+}$ , de fórmula genérica  $A_{4x}Fe_{4-x}^{III}[Fe^{II}(CN)_6]_{3+x}nH_2O$ , en donde A es un catión seleccionado del grupo formado por  $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Rb^+$ ,  $Cs^+$ ,  $NH_4^+$  o  $Tl^+$ ,  $Fe^{III}$  esta sustituido por  $Gd^{3+}$  en una proporción que oscila entre 1 y 100 %, x varía de 0 a 1 y n varía de 1 a 24, y su aplicación como agente de contraste  $T_1$ . Sin embargo, la solubilidad parcial de los derivados del AP en medio biológico limita considerablemente el uso clínico de estos materiales, debido a la posible liberación de iones  $Gd^{3+}$  y  $Fe(CN)_6^{4-}$ , ambos altamente tóxicos.

En la patente WO2012/108856 **2012**; Huang, S.; Khitrin, A.K.; Perea, V.S.; Kandanapitive, M.S., se describe un agente de contraste de MRI basado en nanopartículas (4-500 nm) del compuesto  $A_xMn_y[M(CN)_6]_z nH_2O$ , en donde A=Li, Na, K,  $NH_4$  o Tl, M=Cr, Mn, Fe, Co o Ru, x=0-2, y=1-4, z=1-4, y n=0 o 1-20, protegidas con una cubierta hidrófila de ácido carboxílico o polímero biocompatible. Asimismo, se indica que la liberación *in vitro* de iones  $CN^-$  en agua es menor de 0,1 mM durante un periodo de 24 h, lo que indica un cierto efecto estabilizador de la cubierta orgánica sobre el derivado del AP nanoparticulado.

La patente WO2012/110835 **2012**; Máthé, D.; Szigeti, K., reivindica un material basado en nanopartículas con un núcleo metálico de AP dopado con uno o más isótopos metálicos y una cubierta orgánica biocompatible, así como su aplicación como agente de contraste en MRI. La composición de dicho núcleo metálico responde a la fórmula  $A_x M'_m [M(CN)_6]_n$ , donde A puede corresponder a un metal seleccionado del grupo formado por Li, Na, K, Rb, Cs, Fr y Tl, M corresponde a un metal seleccionado del grupo formado por V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Ga, Zr, Nb, Mo, Ru, Cd, In, Hf, Ta, W, Os o Hg, M' corresponde a un metal seleccionado del grupo formado por Ca, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Sr, Zr, Nb, Mo, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, In, Lu, Ba, Hf, Ta, W, Os, Pt, Hg, La, Eu, Gd, Tb, Dy y Ho, m varía de 0 a 5, x varía de 0 a 5 y n varía de 0,5 a 10. Respecto de la cubierta orgánica biocompatible, comprende uno o más materiales biocompatibles seleccionados del grupo formado por anticuerpos, dextrano, polietilenglicol, polivinil pirrolidona y citrato. De nuevo la aplicación hospitalaria de este tipo de materiales, que requiere de administración *iv*, se ve limitada por la posible liberación de iones como  $Gd^{3+}$  y  $Fe(CN)_6^{4-}$  en plasma (no se ofrece dato alguno acerca de la estabilidad del material en medio biológico), y sus posibles efectos tóxicos.

Todo lo anterior conduce a la necesidad de desarrollar nuevos sistemas para mejorar la resolución de las imágenes de MRI mediante un aumento del contraste, que reúnan las siguientes propiedades: i) biocompatibilidad, es decir, no provocar respuesta inmune inespecífica o específica; ii) elevados valores de relajatividad longitudinal ( $r_1$ ) y transversal ( $r_2$ ), permitiendo aumentar, respectivamente, el contraste positivo y negativo en las imágenes de MRI con dosis bajas del producto; iii) estabilidad en plasma humano, esto es, que no libere componente alguno en medio fisiológico o, en caso de que se produzca liberación de alguno de sus componentes, su concentración en sangre debe mantenerse por debajo de los niveles de toxicidad; iv) capacidad para incorporar sobre su superficie moléculas de diversa funcionalidad (terapéutica, diagnóstico, estabilizadora, etc.) mediante unión covalente estable.

En nuestro caso, hemos encontrado que las nanopartículas de un material híbrido compuesto de un núcleo organo-metálico derivado del AP y una cubierta de sílice, presentan valores de  $r_1$  y  $r_2$  muy altos, a la vez que resultan biocompatibles y muy estables en medio fisiológico, pudiendo incorporar gran cantidad de moléculas que les confieren carácter multifuncional. Al respecto, el encapsulamiento de nanopartículas de derivados del AP con una capa de sílice se encuentra fuertemente impedido, debido a que estos compuestos se disuelven de forma prácticamente instantánea en el

medio alcalino en que se lleva a cabo la polimerización del silicato. Para superar este inconveniente, se ha desarrollado un procedimiento de deposición de una capa de sílice sobre nanopartículas de derivados del AP a pH neutro mediante hidrólisis controlada de un precursor de sílice, utilizando aminas de bajo peso molecular como agentes activadores del silicato. Como resultado se ha obtenido un nanocomposite AP@SiO<sub>2</sub> en el que se mejora ostensiblemente la estabilidad en medio fisiológico de los nanocristales del derivado de AP, a la vez que se controla los parámetros texturales de la cubierta, la cual ofrece numerosas posibilidades de funcionalización.

## 10 Descripción de la Invención

La presente invención se refiere a un agente de contraste de resonancia magnética (MRI) basado en un material híbrido que puede comprender, al menos:

- 15 - Un núcleo órgano-metálico de tamaño nanométrico derivado del azul de Prusia (AP), de fórmula genérica



donde

20 **A** es Li, Na, K, Rb, Cs, Fr, Tl, NR<sub>4</sub> siendo R=H o cualquier radical alquilo de estequiometría C<sub>a</sub>H<sub>2a+2</sub>, o combinaciones de los mismos;

**M** es Cr, Mn, Fe, Co, Ru, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, o combinaciones de los mismos;

**M'** es Cr, Mn, Fe, Co, Ru o combinaciones de los mismos;

x=0-2,

25 m=1-4,

n=1-3, y

- Una cubierta de sílice que recubre homogéneamente las nanopartículas del núcleo.

30 Según una realización particular, la cubierta de sílice puede ser una cubierta de sílice seleccionada preferentemente entre no estructurada y no porosa, que recubre homogéneamente las nanopartículas del núcleo, entre no estructurada y porosa, con diámetro de poro comprendido entre 1 y 100 nm, que recubre homogéneamente las nanopartículas del núcleo, entre estructurada y porosa, preferentemente mesoporosa,

con diámetro de poro comprendido entre 1 y 30 nm, que recubre homogéneamente las nanopartículas del núcleo.

La presencia conjunta de un agente  $T_1$  (p.e.,  $Gd^{3+}$ ) y un agente  $T_2$  (p.e.,  $Fe^{3+}$ ) en el sistema de contraste de la presente invención resulta beneficiosa para mejorar el contraste global (positivo y negativo) de las imágenes de MRI y, por tanto, la resolución, especialmente cuando los valores de relajatividad  $r_1$  y  $r_2$  son muy altos. Así, el agente de contraste de la presente invención puede presentar valores de relajatividad longitudinal ( $r_1$ ) entre 5,0 y 50,0  $mM^{-1} s^{-1}$ , preferentemente entre 5,0 y 30,0  $mM^{-1} s^{-1}$ , y valores de relajatividad transversal ( $r_2$ ) entre 10 y 300  $mM^{-1} s^{-1}$ , preferentemente entre 10 y 200  $mM^{-1} s^{-1}$ , en un campo magnético de fuerza preferentemente entre 0,5 y 11,0 T, y más preferentemente entre 1,2 y 9,4 T.

La finalidad de la incorporación de la cubierta de sílice sobre las nanopartículas del derivado del AP es múltiple; de un lado, la capa inorgánica estabiliza los nanocristales del derivado del AP, minimizando o suprimiendo la disolución en medio fisiológico y liberación de iones tóxicos, como  $Gd^{3+}$  y  $Fe(CN)_6^{3-}$ . De esta forma se evitan efectos indeseados causados por la toxicidad de dichos iones, a la vez que se favorece la acumulación del agente de contraste en los tejidos y células diana, lo que permite reducir la dosis administrada sin perder resolución en las imágenes de MRI. Asimismo, la cubierta de sílice evita fenómenos de agregación no controlada de las nanopartículas del compuesto órgano-metálico, a la vez que impide fenómenos de extravasación, reacciones inmunitarias y rápida eliminación renal. Por otro lado, la cubierta de sílice presenta gran cantidad de grupos silanoles en superficie sobre los cuales puede unirse por enlace covalente multitud de moléculas que proporcionan multifuncionalidad al material híbrido. En cualquier caso, el encapsulamiento de las nanopartículas del derivado del AP con una cubierta de sílice no supone alteración estructural y/o funcional alguna del agente de contraste, tal y como se muestra en la Figura 1. La presencia de la capa superficial de sílice queda en evidencia por una banda ancha en el espectro de infrarrojo a  $1080\text{ cm}^{-1}$ , que no se aprecia en el material sin recubrir, (véase Figura 2).

En el agente de contraste de la presente invención las partículas de dicho agente de contraste pueden presentar diferentes formas. De manera preferente sus partículas pueden presentar la forma seleccionada entre esférica, varilla, aspa o estrellada y

combinaciones de las mismas. De manera preferente, las partículas tienen forma de aspa o estrellada.

Según la presente invención las partículas del agente de contraste pueden presentar  
5 un diámetro medio comprendido entre 10 y 3000 nm, preferentemente entre 20 y 1000 nm.

Según una realización particular, la cubierta de sílice del agente de contraste puede tener un espesor entre 1 y 100 nm, preferentemente entre 5 y 50 nm.

10 En una realización adicional de la presente invención la cubierta de sílice del agente de contraste puede funcionalizarse con una molécula, es decir, la cubierta de sílice del agente de contraste puede comprender, además, una molécula seleccionada entre un poli(etilenglicol) (PEG), un agente fluorescente, un radionúcleo, una molécula directora y combinaciones de los mismos.

15 Según la realización particular en la que el agente de contraste se funcionaliza con un PEG, esta molécula aumenta la solubilidad y estabilidad del material en medio acuoso, permitiendo la preparación de coloides estables a la vez que reduce las interacciones de las nanopartículas con componentes del plasma sanguíneo, aumentando el tiempo  
20 de residencia plasmática, reduciendo o eliminando la respuesta inmune, reduciendo la toxicidad y aumentando la eficacia, y promoviendo la acumulación en tejidos y/o células específicos. En el material de la presente invención, el peso molecular de la molécula de PEG puede oscilar entre 200 y 20.000 Da y su concentración puede oscilar entre el 1 y el 30% en peso.

25 Según otra realización particular el agente de contraste se funcionaliza con un agente fluorescente unido por enlace covalente. La molécula del agente fluorescente permite el estudio de la biodistribución del agente de contraste. De manera preferente, el agente fluorescente puede estar seleccionado entre 5-amino fluoresceína, fluoresceína  
30 isotiocianato, NHS-fluoresceína, rodamina B isotiocianato, tetrametilrodamina B isotiocianato, NHS-Cy5 y/o NHS-Cy5.5 o un derivado de estos que incorpore un ligando orgánico que facilite la unión covalente con la cubierta inorgánica, así como combinaciones de los mismos. En el material de la presente invención, la concentración del agente fluorescente puede oscilar entre el 0,01 y el 5% en peso.

35

Según otra realización particular de la presente invención la cubierta de sílice del agente de contraste puede incorporar un radionúcleo, preferentemente un radionúcleo de  $^{18}\text{F}$  como molécula funcionalizadora. El isótopo radioactivo permite el estudio de la biodistribución y la farmacocinética del preparado farmacéutico mediante la técnica de tomografía de emisión de positrones (PET). En el material de la presente invención, la concentración del radionúcleo de  $^{18}\text{F}$  puede oscilar entre el 0,0001 y el 1% en peso.

En otra realización particular de la presente invención, la cubierta de sílice del agente de contraste puede incorporar una molécula directora, entendiéndose por molécula directora cualquier molécula que favorezca la internalización por endocitosis en las células diana. La molécula directora puede estar seleccionada entre una molécula sintética, semi-sintética, natural y combinaciones de las mismas. La molécula directora según la presente invención puede estar seleccionada entre proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, hormonas y análogos hormonales, vitaminas, co-factores enzimáticos y metabolitos de la síntesis de proteínas, un derivado de estos que incorpore un ligando orgánico que facilite la unión covalente a la cubierta inorgánica y combinaciones de los mismos.

La presente invención también se refiere a un método de preparación del agente de contraste definido anteriormente. Este método puede comprender, al menos, poner en contacto una suspensión acuosa de nanopartículas del derivado del azul de Prusia (AP) con una solución de al menos un compuesto de silicio seleccionado de manera preferente entre un alcóxido de silicio, un alquilsilano, silicato sódico y sílice coloidal y combinaciones de los mismos, en presencia de al menos una amina seleccionada de manera preferente entre amina primaria, secundaria, terciaria y combinaciones de las mismas y su peso molecular es inferior a 1000 Da, manteniendo preferentemente el pH entre 7 y 8, y agitando para permitir el crecimiento de la pared inorgánica que envuelve el núcleo órgano-metálico.

Dicho método puede comprender, además, una etapa de lavado y liofilización del material híbrido obtenido. De forma adicional, según una realización particular, la formación de la cubierta inorgánica puede llevarse a cabo en presencia de un surfactante orgánico, que se puede añadir a la mezcla, y que posteriormente será eliminado, preferentemente mediante extracción con alcoholes. Este surfactante orgánico puede ser de manera preferente un compuesto catiónico, aniónico o neutro,

con una relación surfactante:SiO<sub>2</sub> comprendida preferentemente entre 0,005 y 0,65 molar, más preferentemente entre 0,01 y 0,5 molar. Como se ha comentado, dicho surfactante puede ser eliminado tras la obtención de las partículas del material híbrido, mediante extracción a reflujo con alcoholes de cadena corta.

5 Según otra realización particular, el método de preparación del agente de contraste puede comprender, además, el uso de un co-solvente orgánico, añadiendo este a la mezcla, con una relación preferente co-solvente:agua en volumen comprendida entre 1:1 y 10:1, más preferentemente entre 2:1 y 4:1. Según esta realización, dicho co-solvente puede ser de manera preferente un alcohol de cadena alifática con un  
10 número de carbonos comprendido entre 1 y 6.

La presente invención se refiere también al uso del agente de contraste definido anteriormente y obtenido por el método descrito arriba para resonancia magnética (MRI), concretamente para mejorar la resolución de las imágenes de MRI,  
15 comprendiendo dicho uso la administración a humanos y animales ya sea por vía oral, parenteral, respiratoria o transdérmica en concentración suficiente para alcanzar de forma no selectiva los tejidos patológicos. La elevada estabilidad del agente de contraste en medio biológico y el incremento del tiempo de residencia plasmática respecto de los compuestos solubles de Gd<sup>3+</sup>, así como los procesos de angiogénesis  
20 y destrucción parcial del endotelio vascular asociados a las lesiones internas, favorece la extravasación de las nanopartículas del agente de contraste (efecto EPR), permitiendo su acumulación de en la matriz extracelular. Alternativamente el agente de contraste definido anteriormente puede ser administrado al huésped mediante inyección directa en la zona lesionada, acumulándose en el tejido intersticial.

25 El agente de contraste descrito en la presente invención puede ser utilizado con campo magnético de fuerza variable entre 0,5 y 11,0 T, preferiblemente entre 1,2 y 9,4 T.

La dosis del agente de contraste de la presente invención dependerá del huésped, el  
30 tejido y/o células objeto de estudio y la vía de administración. De una forma general, la dosis varía entre 0,001 y 0,1 mmol/Kg.

La vida media en sangre del agente de contraste de la presente invención es suficiente para poder obtener imágenes de MRI en los diferentes huéspedes, estando dicha vida  
35 media en el rango de 0,5 a 6 h, preferiblemente entre 1 y 6 h.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

### Breve descripción de las figuras

10 **Figura 1** muestra los difractogramas de rayos X del material  $\text{Gd}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  preparado según el Ejemplo 1 (A) y el Ejemplo 3 (C), y del agente de contraste de la presente invención preparado según el Ejemplo 2 (B) y el Ejemplo 4 (D).

15 **Figura 2** muestra los espectros de infrarrojo del material  $\text{Gd}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  preparado según el Ejemplo 1 (A) y el y del agente de contraste de la presente invención preparado según el Ejemplo 2 (B).

**Figura 3** es una ilustración esquemática del proceso de preparación de nanopartículas del agente de contraste de la presente invención.

20

**Figura 4** muestra imágenes de microscopía electrónica de transmisión de nanopartículas del agente de contraste de la presente invención preparadas según el Ejemplo 2, mostrando la morfología general (A) y el recubrimiento de sílice depositado sobre la superficie del material  $\text{Gd}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (B).

25 **Figura 5** muestra la evolución de la velocidad de relajación longitudinal ( $1/T_1$ ) y transversal ( $1/T_2$ ) respecto de la concentración del agente de contraste de la presente invención preparado según el Ejemplo 2, así como los valores calculados de relajatividad longitudinal ( $r_1$ ) y transversal ( $r_2$ ).

30 **Figura 6** muestra la evolución de la velocidad de relajación longitudinal ( $1/T_1$ ) y transversal ( $1/T_2$ ) respecto de la concentración del agente de contraste de la presente invención preparado según el Ejemplo 4, así como los valores calculados de relajatividad longitudinal ( $r_1$ ) y transversal ( $r_2$ ).

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos que no pretenden ser limitantes de la misma.

## EJEMPLOS

5

**EJEMPLO 1. Preparación de nanopartículas del material Gd[Fe(CN)<sub>6</sub>] de diámetro medio comprendido entre 100 y 400 nm (modificado de J. Phys. Chem. C 2009, 113, 21531-21537; Yamada, M; Yonekura, S.).**

10 En un balón de 500 ml conectado a la línea de N<sub>2</sub> se introduce 3,30 g (10 mmol) de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] y 6,30 g (30 mmol) de bromuro de tetraetil amonio (Et<sub>4</sub>NBr), y se disuelven con agitación en 200 ml de metanol a 30°C durante 3 días bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla se filtra (0,45 μm), y el filtrado se concentra hasta unos 10 ml en un rotavapor. La disolución resultante se agita con 100 ml de éter etílico y se filtra el precipitado amarillo obtenido. El producto crudo se disuelve en 100 ml de acetonitrilo a  
15 reflujo; a continuación se deja enfriar la disolución para cristalizar el polvo purificado de (Et<sub>4</sub>N)<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]. En un balón de 250 ml se disuelven 11,75 g de CH<sub>3</sub>COOH (225 mmol) y Gd(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O (1,08 g, 2,50 mmol) en 50 ml de una mezcla H<sub>2</sub>O:etanol (2:5 v/v). Luego se añade una disolución de (Et<sub>4</sub>N)<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (1,50 g, 2,50 mmol) en 15 ml  
20 de metanol. La mezcla se mantiene a 25°C un día completo en reposo. El precipitado se filtra y se lava con etanol, y se seca a vacío para obtener un polvo naranja de Gd[Fe(CN)<sub>6</sub>], constituido por cristales en forma de aspa y de varilla de diámetro medio comprendido entre 100 y 400 nm. En la Figura 1A se muestra el difractograma de rayos X del material.

25

**EJEMPLO 2. Preparación de un agente de contraste de resonancia magnética basado en nanopartículas de un material híbrido compuesto de un núcleo de Gd[Fe(CN)<sub>6</sub>] preparado según el Ejemplo 1 y una cubierta de sílice.**

30 Se dispersa 3,80 g del material Gd[Fe(CN)<sub>6</sub>] preparado según el Ejemplo 1 en 1900 ml de una mezcla hidroalcohólica H<sub>2</sub>O:etanol (2:5 v/v) y se añade 3,6 ml (0,019 mol) de cianopropil trimetoxisilano con agitación magnética vigorosa. Después de 30 minutos, se introduce 9.5 ml (0,064 mol) de tetrametil ortosilicato (TMOS) y, a continuación, se adiciona 0,38 ml (0,003 mol) de trietilamina. La dispersión resultante se mantiene en  
35 agitación durante 24h, lo que permite el crecimiento de una pared de sílice no porosa

amorfa sobre la superficie de los cristales del material  $\text{Gd}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ . A las 24 h y a las 48 h se llevan a cabo sucesivas adiciones de TMOS (9,5 ml, 0,064 mol) manteniendo la agitación. Finamente, la suspensión se centrifuga (500 g, 2 h), se lava tres veces con una mezcla hidroalcohólica  $\text{H}_2\text{O}$ :etanol (2:5 v/v) (2000 g, 20 min). El sedimento se  
5 liofiliza a  $-55^\circ\text{C}$  durante 16 h. Se obtiene un polvo de color naranja, constituido por partículas de  $\text{Gd}[\text{Fe}(\text{CN})_6]@\text{SiO}_2$  de diámetro medio comprendido entre 100-400 nm. En la Figura 1B se muestra el difractograma de rayos X del material, y en la Figura 4 se muestran imágenes de microscopía electrónica de transmisión de las partículas.

10 **EJEMPLO 3. Preparación de nanopartículas del material  $\text{Gd}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  de diámetro medio comprendido entre 20 y 200 nm (modificado de J. Phys. Chem. C 2009, 113, 21531-21537; Yamada, M; Yonekura, S.).**

En un balón de 500 ml conectado a la línea de  $\text{N}_2$  se introduce 3,30 g (10 mmol) de  
15  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  y 6,30 g (30 mmol) de bromuro de tetraetil amonio ( $\text{Et}_4\text{NBr}$ ), y se disuelven con agitación en 200 ml de metanol a  $30^\circ\text{C}$  durante 3 días bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla se filtra (0,45  $\mu\text{m}$ ), y el filtrado se concentra hasta unos 10 ml en un rotavapor. La disolución resultante se agita con 100 ml de éter etílico y se filtra el precipitado amarillo obtenido. El producto crudo se disuelve en 100 ml de acetonitrilo a  
20 reflujo; a continuación se deja enfriar la disolución para cristalizar el polvo purificado de  $(\text{Et}_4\text{N})_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ . En un balón de 250 ml se disuelve  $\text{Gd}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (1,08 g, 2,50 mmol) en 50 ml de una mezcla  $\text{H}_2\text{O}$ :etanol (2:5 v/v). Luego se añade una disolución de  $(\text{Et}_4\text{N})_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (1,50 g, 2,50 mmol) en 15 ml de metanol. La mezcla se mantiene a  
25  $25^\circ\text{C}$  un día completo en reposo. El precipitado se filtra y se lava con etanol, y se seca a vacío para obtener un polvo naranja de  $\text{Gd}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , constituido por cristales en forma de varilla de diámetro medio comprendido entre 20 y 200 nm. En la Figura 1C se muestra el difractograma de rayos X del material.

30 **EJEMPLO 4. Preparación de un agente de contraste de resonancia magnética basado en nanopartículas de un material híbrido compuesto de un núcleo de  $\text{Gd}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  preparado según el Ejemplo 3 y una cubierta de sílice.**

Se dispersa 3,80 g del material  $\text{Gd}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  preparado según el Ejemplo 3 en 1900 ml de una mezcla hidroalcohólica  $\text{H}_2\text{O}$ :etanol (2:5 v/v) y se añade 3,6 ml (0,019 mol) de  
35 cianopropil trimetoxisilano con agitación magnética vigorosa. Después de 30 minutos,

se introduce 9.5 ml (0,064 mol) de tetrametil ortosilicato (TMOS) y, a continuación, se adiciona 0,38 ml (0,003 mol) de trietilamina. La dispersión resultante se mantiene en agitación durante 24h, lo que permite el crecimiento de una pared de sílice no porosa amorfa sobre la superficie de los cristales del material  $\text{Gd}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ . A las 24 h y a las 5 48 h se llevan a cabo sucesivas adiciones de TMOS (9,5 ml, 0,064 mol) manteniendo la agitación. Finalmente, la suspensión se centrifuga (500 g, 2 h), se lava tres veces con una mezcla hidroalcohólica  $\text{H}_2\text{O}$ :etanol (2:5 v/v) (2000 g, 20 min). El sedimento se liofiliza a  $-55^\circ\text{C}$  durante 16 h. Se obtiene un polvo de color naranja, constituido por partículas de  $\text{Gd}[\text{Fe}(\text{CN})_6]@\text{SiO}_2$  de diámetro medio comprendido entre 20-200 nm. 10 En la Figura 1D se muestra el difractograma de rayos X del material.

**EJEMPLO 5. Medida de la relajatividad longitudinal ( $r_1$ ) y transversal ( $r_2$ ) respecto de la concentración del agente de contraste preparado en el Ejemplo 2.**

15 Se preparan suspensiones estables del agente de contraste  $\text{Gd}[\text{Fe}(\text{CN})_6]@\text{SiO}_2$  obtenido según el procedimiento descrito el Ejemplo 2, variando la concentración de  $\text{Gd}^{3+}$  de 0,1 a 2,0 mM, y se miden la relajación de los protones  $T_1$  y  $T_2$  en un equipo de RMN de 400 MHz (9,4 T). Los resultados obtenidos expresados como relajatividad normalizada frente a la concentración se presentan en la Figura 5. Los valores 20 obtenidos de  $r_1$  y  $r_2$  se indican igualmente en la Tabla 1.

**EJEMPLO 6. Medida de la relajatividad longitudinal ( $r_1$ ) y transversal ( $r_2$ ) respecto de la concentración del agente de contraste preparado en el Ejemplo 4.**

25 Se preparan suspensiones estables del agente de contraste  $\text{Gd}[\text{Fe}(\text{CN})_6]@\text{SiO}_2$  obtenido según el procedimiento descrito el Ejemplo 4, variando la concentración de  $\text{Gd}^{3+}$  de 0,1 a 2,0 mM, y se mide la relajación de los protones  $T_1$  y  $T_2$  en un equipo de RMN de 400 MHz (9,4 T). Los resultados obtenidos expresados como relajatividad normalizada frente a la concentración se presentan en la Figura 6. Los valores 30 obtenidos de  $r_1$  y  $r_2$  se indican igualmente en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores de relajatividad longitudinal y transversal medidos a 9,4 T para agentes de contraste preparados según los procedimientos descritos en la presente invención.

Ejemplo	Composición	Tamaño Partícula (nm)	$r_1$ ( $\text{cm}^3 \text{mol}^{-1} \text{g}^{-1}$ )	$r_2$ ( $\text{cm}^3 \text{mol}^{-1} \text{g}^{-1}$ )
2	Gd[Fe(CN) <sub>6</sub> ]@SiO <sub>2</sub>	100-400	11,7	58,6
2	Gd[Fe(CN) <sub>6</sub> ]@SiO <sub>2</sub>	20-200	13,2	66,6

## REIVINDICACIONES

1. Agente de contraste de resonancia magnética caracterizado porque está basado en un material híbrido que comprende, al menos:

- 5 - Un núcleo órgano-metálico de tamaño nanométrico derivado del azul de Prusia, de fórmula genérica



donde

10 **A** es Li, Na, K, Rb, Cs, Fr, Tl, NR<sub>4</sub> siendo R=H o cualquier radical alquilo de estequiometría C<sub>a</sub>H<sub>2a+2</sub>, o combinaciones de los mismos;

**M** es Cr, Mn, Fe, Co, Ru, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, o combinaciones de los mismos;

**M'** es Cr, Mn, Fe, Co, Ru o combinaciones de los mismos;

x=0-2,

15 m=1-4,

n=1-3, y

- Una cubierta de sílice que recubre homogéneamente las nanopartículas del núcleo.

20 2. Agente de contraste según la reivindicación 1, caracterizado porque la cubierta de sílice es una cubierta no estructurada y no porosa.

3. Agente de contraste según la reivindicación 1, caracterizado porque la cubierta de sílice es una cubierta no estructurada y porosa, con diámetro de poro comprendido  
25 entre 1 y 100 nm.

4. Agente de contraste según la reivindicación 3, caracterizado porque la cubierta de sílice es una cubierta estructurada y porosa, con diámetro de poro comprendido entre  
30 1 y 30 nm.

5. Agente de contraste según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque presenta valores de relajatividad longitudinal (r<sub>1</sub>) entre 5,0 y 50,0 mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, y valores de relajatividad transversal (r<sub>2</sub>) entre 10 y 300 mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, en un campo magnético de fuerza entre 0,5 y 11,0 T.

6. Agente de contraste según la reivindicación 5, caracterizado porque presenta valores de relajatividad longitudinal ( $r_1$ ) entre 5,0 y 30,0  $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$ .
7. Agente de contraste según la reivindicación 5, caracterizado porque presenta  
5 valores de relajatividad transversal ( $r_2$ ) entre 10 y 200  $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$ .
8. Agente de contraste según la reivindicación 5, caracterizado porque el campo magnético es un campo magnético de fuerza entre 1,2 y 9,4 T.
- 10 9. Agente de contraste según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque sus partículas presentan forma seleccionada entre esférica, varilla, aspa o estrellada y combinaciones de las mismas.
- 15 10. Agente de contraste según la reivindicación 9, caracterizado porque las partículas presentan forma de aspa o varilla.
11. Agente de contraste según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las partículas presentan un diámetro medio comprendido entre 10 y 3000 nm.
- 20 12. Agente de contraste según la reivindicación 11, caracterizado porque las partículas presentan un diámetro medio comprendido entre 20 y 1000 nm.
13. Agente de contraste según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la cubierta de sílice tiene un espesor entre 1 y 100 nm.
- 25 14. Agente de contraste según la reivindicación 13, caracterizado porque la cubierta de sílice tiene un espesor entre 5 y 50 nm.
15. Agente de contraste según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la  
30 cubierta de sílice comprende, además, una molécula seleccionada entre un poli(etilenglicol), un agente fluorescente, un radionúcleo, una molécula directora y combinaciones de los mismos.

16. Agente de contraste según la reivindicación 15, caracterizado porque la molécula es un poli(etilenglicol) unido por enlace covalente de peso molecular seleccionado entre 200 y 20.000 Da y una concentración en peso entre el 1 y el 30%.
- 5 17. Agente de contraste según la reivindicación 15, caracterizado porque la molécula es un agente fluorescente unido por enlace covalente seleccionado entre 5-amino fluoresceína, fluoresceína isotiocianato, NHS-fluoresceína, rodamina B isotiocianato, tetrametilrodamina B isotiocianato, NHS-Cy5 y/o NHS-Cy5.5 o un derivado de estos que incorpore un ligando orgánico que facilite la unión covalente con la cubierta  
10 inorgánica y combinaciones de los mismos.
18. Agente de contraste según la reivindicación 15, caracterizado porque la molécula es un radionúcleo de  $^{18}\text{F}$ .
- 15 19. Agente de contraste según la reivindicación 15, caracterizado porque la molécula es una molécula directora seleccionada entre molécula sintética, semi-sintética, natural y combinaciones de las mismas.
20. Agente de contraste según la reivindicación 19, caracterizado porque la molécula  
20 directora está seleccionada entre proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, hormonas y análogos hormonales, vitaminas, co-factores enzimáticos y metabolitos de la síntesis de proteínas, o un derivado de estos que incorpore un ligando orgánico que facilite la unión covalente a la cubierta inorgánica, y combinaciones de los mismos.
- 25 21. Método de preparación del agente de contraste descrito según las reivindicaciones 1 a 20, caracterizado porque comprende, al menos, poner en contacto una suspensión acuosa de nanopartículas del derivado del azul de Prusia con una solución de al menos un compuesto de silicio en presencia de al menos una amina, manteniendo el  
30 pH entre 7 y 8 y agitando.
22. Método de preparación del agente de contraste según la reivindicación 21, caracterizado porque comprende, además, lavar y liofilizar el material híbrido obtenido.
23. Método de preparación del agente de contraste según las reivindicaciones 21 y 22,  
35 caracterizado porque comprende, además, añadir un surfactante orgánico a la mezcla.

24. Método de preparación del agente de contraste según la reivindicación 21, caracterizado porque el compuesto de silicio está seleccionado entre un alcóxido de silicio, un alquilsilano, silicato sódico, sílice coloidal y combinaciones de los mismos.
- 5
25. Método de preparación del agente de contraste según la reivindicación 21, caracterizado porque la amina está seleccionada entre amina primaria, secundaria, terciaria y combinaciones de las mismas y su peso molecular es inferior a 1000 Da.
- 10
26. Método de preparación del agente de contraste según la reivindicación 21, caracterizado porque comprende, además, añadir un co-solvente orgánico a la mezcla, con una relación co-solvente:agua en volumen comprendida entre 1:1 y 10:1.
- 15
27. Método de preparación del agente de contraste según la reivindicación 21, caracterizado porque comprende, además, añadir un surfactante orgánico a la mezcla con una relación surfactante:SiO<sub>2</sub> comprendida entre 0,005 y 0,65 molar.
- 20
28. Uso del agente de contraste descrito en las reivindicaciones 1-20 y obtenido según el método descrito en las reivindicaciones 21 a 27 para resonancia magnética.
29. Uso del agente de contraste según la reivindicación 28, caracterizado porque la fuerza de campo magnético variable está entre 0,5 y 11,0 T.

FIG. 1

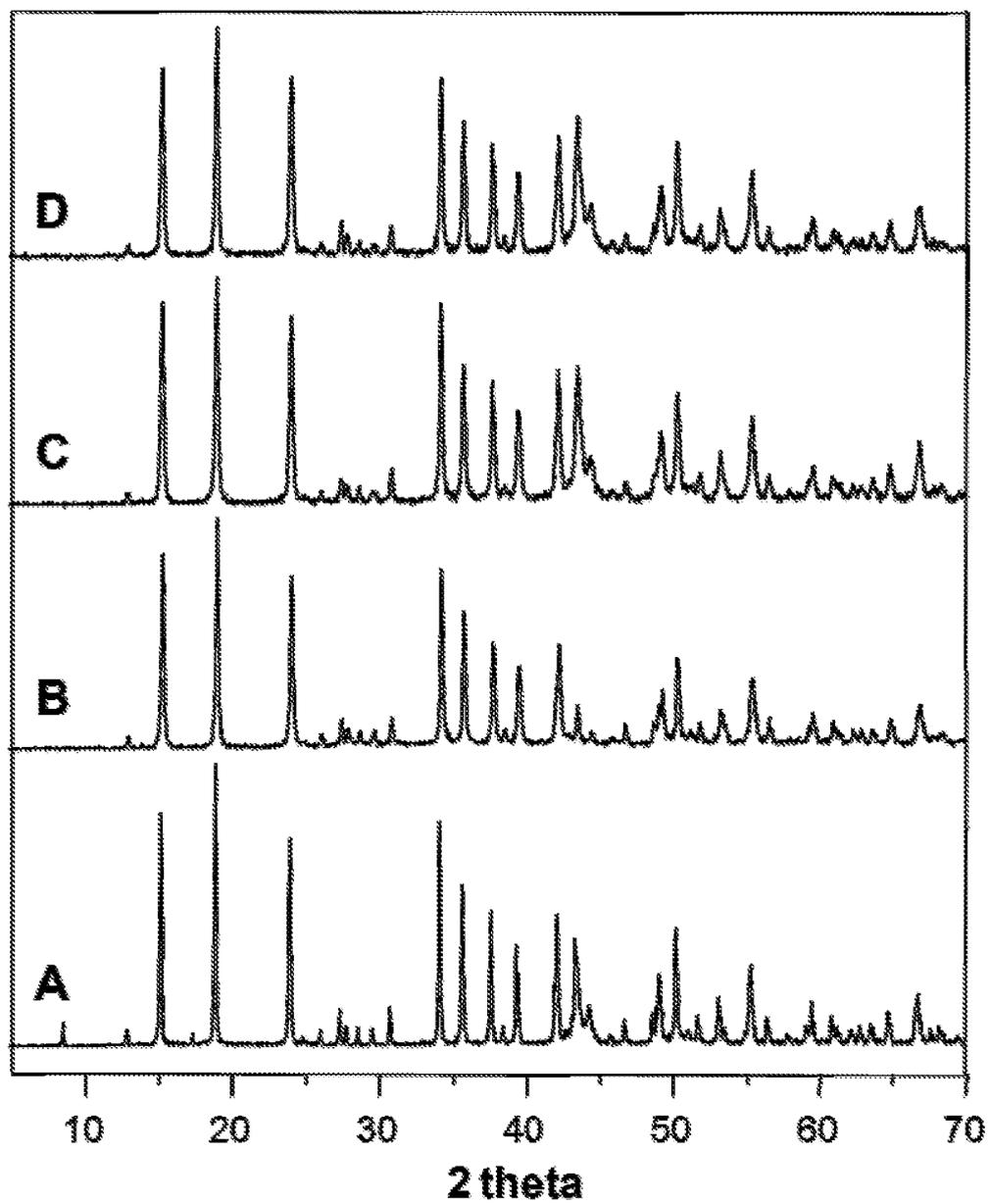


FIG. 2

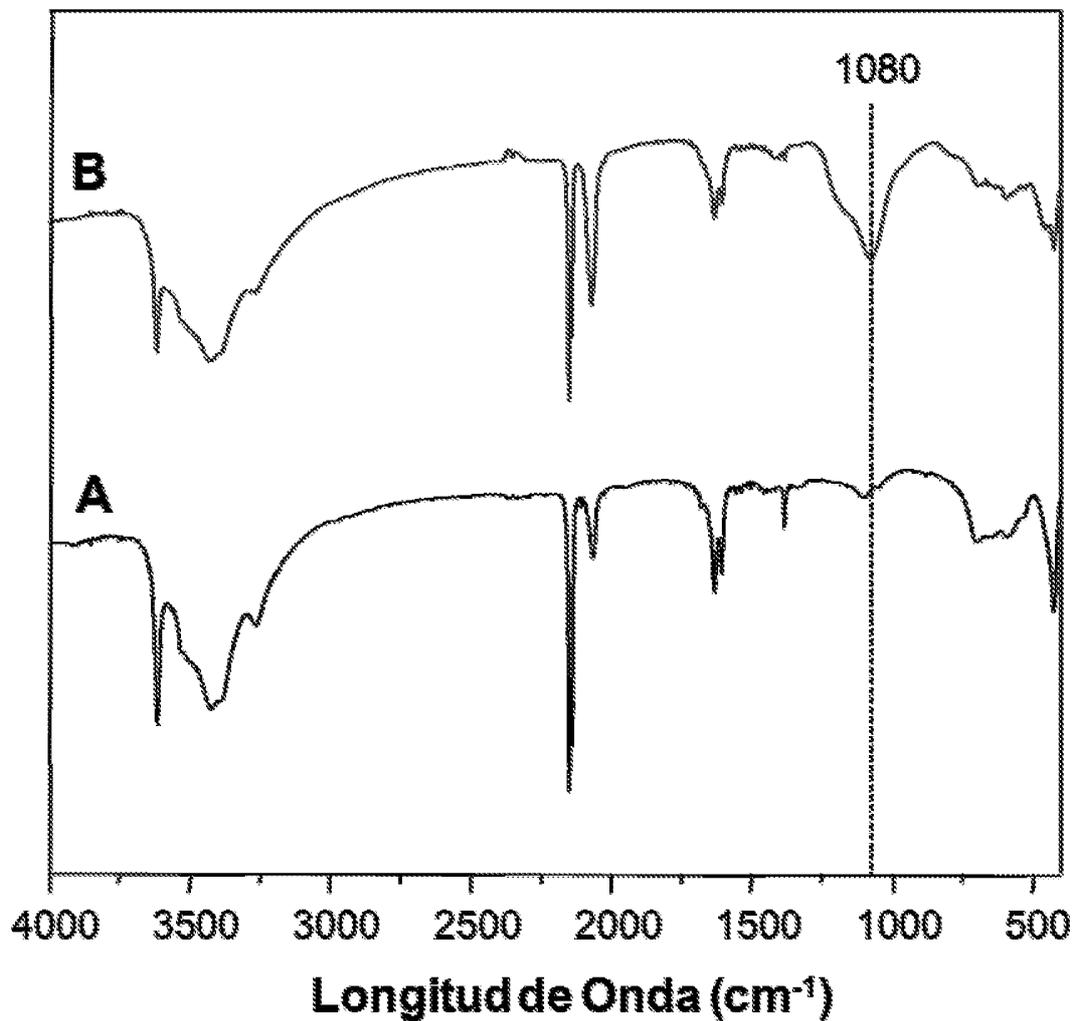


FIG. 3

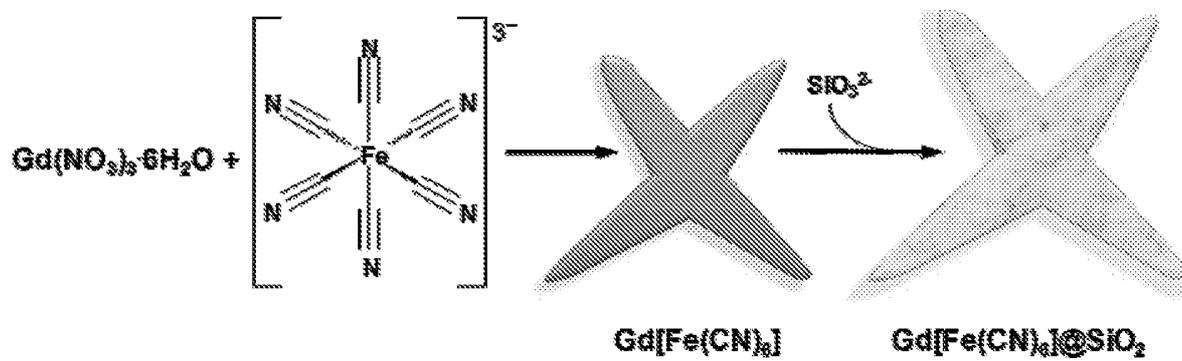


FIG. 4

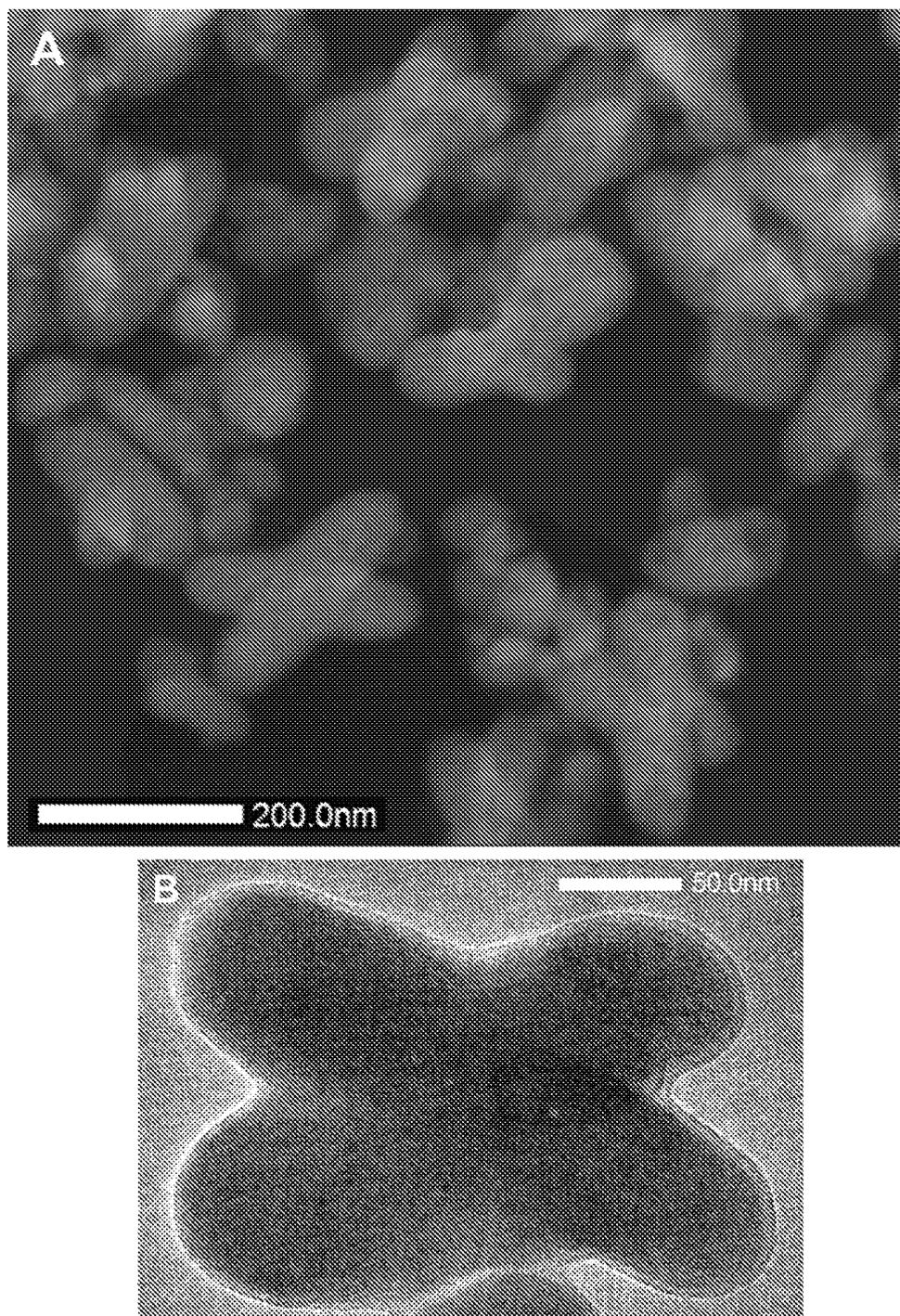


FIG. 5

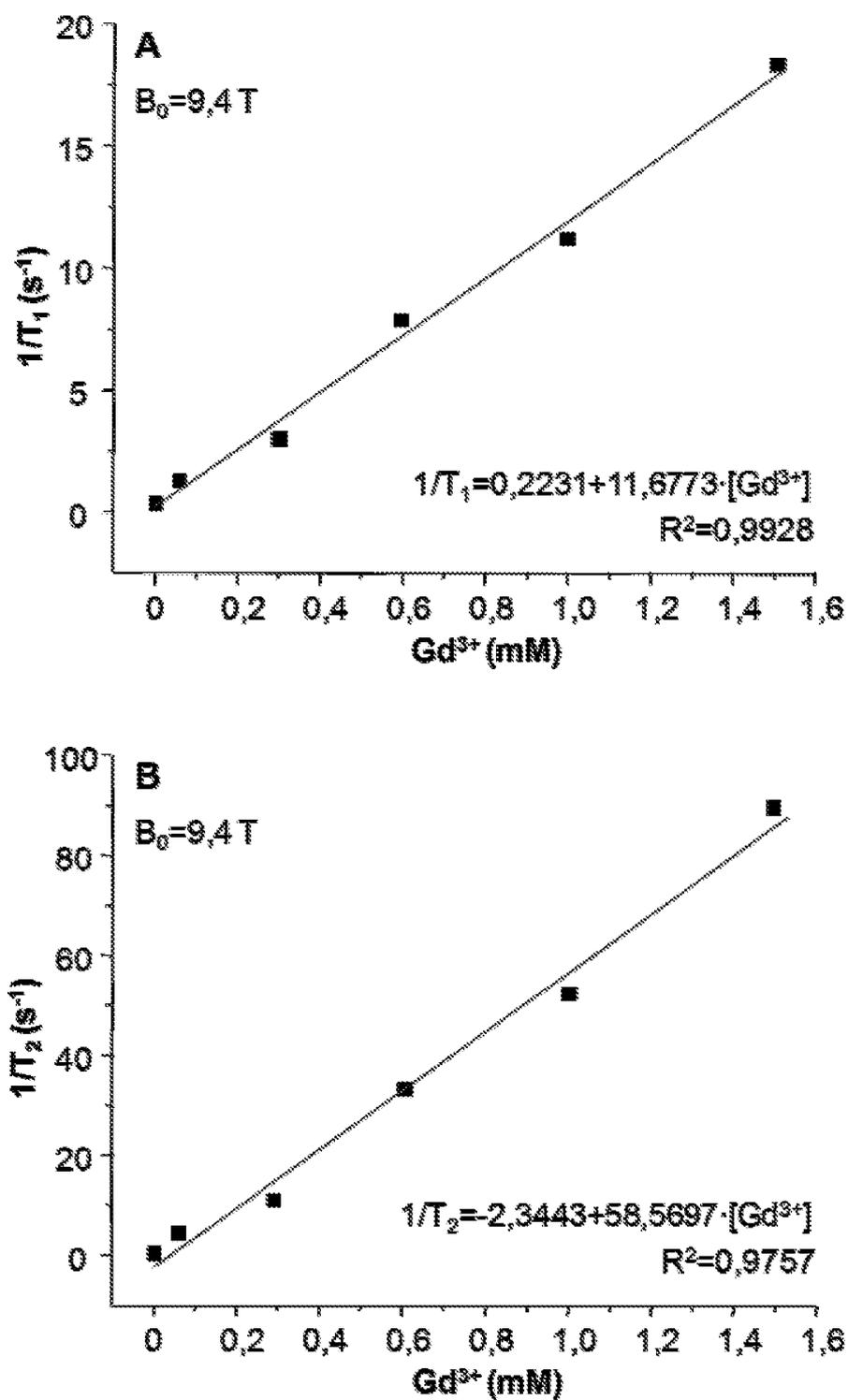
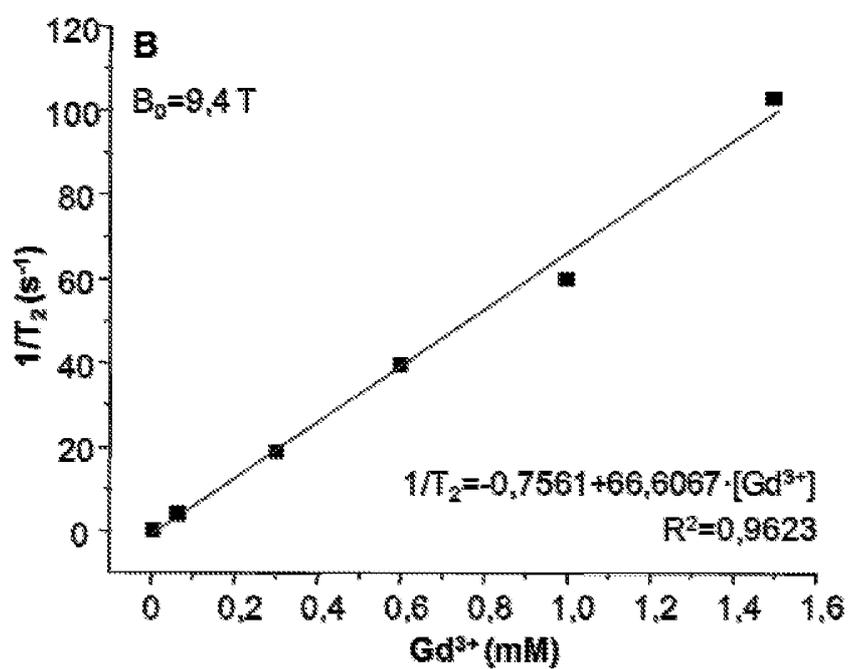
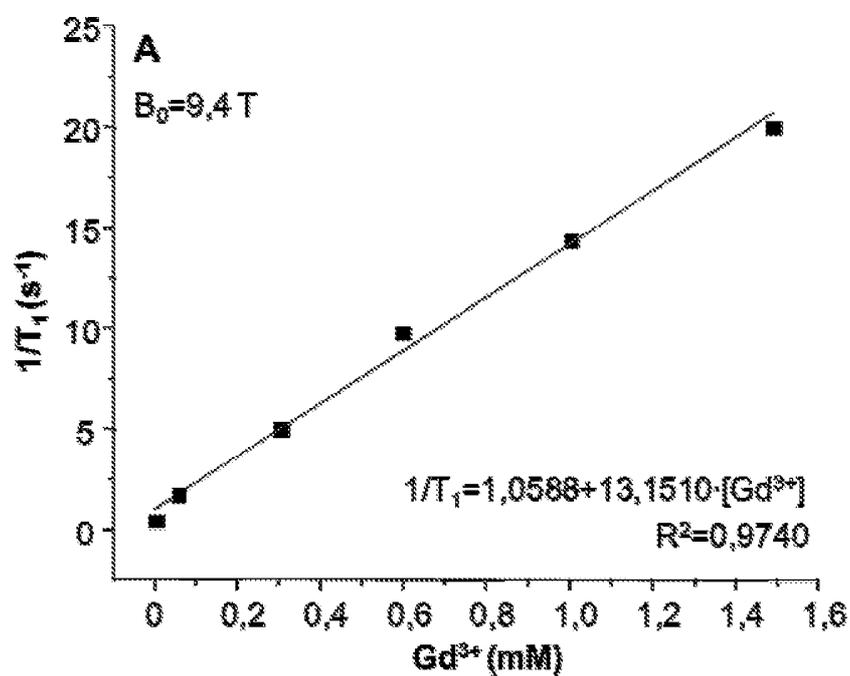


FIG. 6



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ES2015/070595

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**See extra sheet**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, C01C, B82Y

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, XPESP, TXT, HCAPLUS, REGISTRY

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FORNASIERI, G., et al., Elaboration of Prussian Blue analogue/silica nanocomposites: towards tailor-made nano-scale electronic devices, Materials, 2012, Vol.5, pps:385-403. Paragraph: "Controlled precipitation of CoFePBA within disordered porosity of silica (xero)gels" and Fig.3a.	1-14,28,29
Y		15-20
X	ROHILLA, S., et al., Synthesis and characterization of Fe <sub>4</sub> [Co(CN) <sub>6</sub> ] <sub>3</sub> ·16H <sub>2</sub> O/SiO <sub>2</sub> nano-composites by coprecipitation method, Adv. Mat.Lett., 2013, Vol.4, pps:53-57. Abstract and paragraph: "Experimental".	1-14,28,29
Y		15-20
X	MOORE, J.G., et al., Transparent, superparamagnetic K <sub>x</sub> Co <sub>y</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]-silica nanocomposites with tunable photomagnetism, Angew.Chem.Int.Ed., 2003, Vol.42, pps:2741-2743. Pag.2741 and fig.3.	1-14,28,29
Y		15-20

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search  
03/11/2015

Date of mailing of the international search report  
(05/11/2015)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer  
M. García Poza

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3495568

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2015/070595

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ES 2366841 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 26/10/2011.	15-20
A	LARTIGUE, L., et al., Superspin-glass behavior on Co <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sub>2</sub> Prussian blue nanoparticles confined in mesoporous silica, Materials Chemistry and Physics, 2012, Vol.132, pps:438-445.	1-29
A	YOON, T.-J., et al., Multifunctional nanoparticles possessing a "magnetic motor effect" for drug or gene delivery, Angew.Chem.Int.Ed., 2005, Vol.44, pps:1068-1071.	1-29
A	SHOKOUHIMEHR, M., et al., Biocompatible Prussian blue nanoparticles: preparation, stability, cytotoxicity, and potential use as an MRI contrast agent, Inorganic Chemistry Communications, 2010, Vol.13, pps:58-61.	1-29

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/ES2015/070595

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
ES2366841 A1	26.10.2011	WO2011124739 A1 WO2011124739 A4	13.10.2011 01.12.2011
-----			

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2015/070595

## CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*A61K49/06* (2006.01)

*C01C3/08* (2006.01)

*B82Y30/00* (2011.01)

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2015/070595

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

### Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, C01C, B82Y

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, XPESP, TXT, HCAPLUS, REGISTRY

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	FORNASIERI, G., et al., Elaboration of Prussian Blue analogue/silica nanocomposites: towards tailor-made nano-scale electronic devices, Materials, 2012, Vol.5, pps:385-403. Paragraph: "Controlled precipitation of CoFePBA within disordered porosity of silica (xero)gels" and Fig.3a.	1-14,28,29
Y		15-20
X	ROHILLA, S., et al., Synthesis and characterization of Fe <sub>4</sub> [Co(CN) <sub>6</sub> ] <sub>3</sub> ·16H <sub>2</sub> O/SiO <sub>2</sub> nano-composites by coprecipitation method, Adv. Mat.Lett., 2013, Vol.4, pps:53-57. Abstract and paragraph: "Experimental".	1-14,28,29
Y		15-20
X	MOORE, J.G., et al., Transparent, superparamagnetic K <sub>x</sub> Co <sub>y</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]-silica nanocomposites with tunable photomagnetism, Angew.Chem.Int.Ed., 2003, Vol.42, pps:2741-2743. Pag.2741 and fig.3.	1-14,28,29
Y		15-20

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.  
05/11/2015

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.  
**05 de noviembre de 2015 (05/11/2015)**

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional  
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado  
M. García Poza  
Nº de teléfono 91 3495568

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2015/070595

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
Y	ES 2366841 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 26/10/2011.	15-20
A	LARTIGUE, L., et al., Superspin-glass behavior on Co <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sub>2</sub> Prussian blue nanoparticles confined in mesoporous silica, Materials Chemistry and Physics, 2012, Vol.132, pps:438-445.	1-29
A	YOON, T.-J., et al., Multifunctional nanoparticles possessing a "magnetic motor effect" for drug or gene delivery, Angew.Chem.Int.Ed., 2005, Vol.44, pps:1068-1071.	1-29
A	SHOKOUHIMEHR, M., et al., Biocompatible Prussian blue nanoparticles: preparation, stability, citotoxicity, and potential use as an MRI contrast agent, Inorganic Chemistry Communications, 2010, Vol.13, pps:58-61.	1-29

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2015/070595

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
ES2366841 A1	26.10.2011	WO2011124739 A1 WO2011124739 A4	13.10.2011 01.12.2011
-----			

**CLASIFICACIONES DE INVENCION**

*A61K49/06* (2006.01)

*C01C3/08* (2006.01)

*B82Y30/00* (2011.01)