

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 932**

21 Número de solicitud: 201430524

51 Int. Cl.:

A61K 49/00 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

B82Y 25/00 (2011.01)

A61K 33/26 (2006.01)

B82Y 40/00 (2011.01)

B22F 1/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

09.04.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

09.10.2015

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE (90.0%)

Cta. de Utrera, km. 1

41013 Sevilla ES y

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (10.0%)**

72 Inventor/es:

ZADERENKO PARTIDA, Ana Paula;

MERKLING, Patrick;

CALERO DÍAZ, Sofía;

SAYAGUÉS DE VEGA, M^a Jesús;

OLIVA MONTERO, José María;

CARO SALAZAR, Carlos y

AGUAYO OROZCO, Alejandro

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Procedimiento post-síntesis de modificación de la superficie de nanopartículas superparamagnéticas de óxidos de hierro**

57 Resumen:

Procedimiento post-síntesis de modificación de la superficie de nanopartículas superparamagnéticas de óxidos de hierro.

La presente invención se refiere a un procedimiento post-síntesis de modificación de la superficie de nanopartículas superparamagnéticas de óxidos de hierro con grupos hidroxilo, sin espaciador, a las nanopartículas de superficie modificada obtenidas por el mismo, así como el uso de estas nanopartículas de superficie modificada en terapia, diagnóstico y en técnicas de concentración y separación de muestras químicas y biológicas.

ES 2 547 932 A1

**PROCEDIMIENTO POST-SÍNTESIS DE MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE
NANOPARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS DE ÓXIDOS DE HIERRO**

DESCRIPCIÓN

5

La presente invención se refiere a un procedimiento post-síntesis de modificación de la superficie de nanopartículas superparamagnéticas de óxidos de hierro con grupos hidroxilo, a las nanopartículas de superficie modificada obtenidas por el mismo, así como el uso de estas nanopartículas de superficie modificada en terapia, diagnóstico y en técnicas de concentración y separación de muestras químicas y biológicas.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

15

A lo largo de la última década las nanopartículas de óxidos de hierro han despertado un gran interés en diferentes ámbitos tecnológicos, especialmente en biomedicina, debido a sus propiedades superparamagnéticas. El superparamagnetismo es un comportamiento magnético que exhibe algunas características del ferromagnetismo y otras del paramagnetismo, y se produce al reducir el tamaño de un material ferromagnético a la escala nanométrica. La reducción del tamaño hace que las interacciones ferromagnéticas en el interior del nanomaterial sean suficientemente intensas como para lograr un ordenamiento magnético por debajo de cierta temperatura crítica, pero con interacciones muy débiles entre ellas, por lo que el ordenamiento magnético no puede extenderse a todo el sistema. El resultado es que se comportan como paramagnetos, pero con un momento magnético muy superior al de las sustancias paramagnéticas, por lo que reciben el nombre de superparamagnetos.

20

25

30

35

Entre las aplicaciones biomédicas de las nanopartículas superparamagnéticas de óxidos de hierro (Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles, SPION) cabe destacar su uso como agentes de contraste en Resonancia Magnética de Imagen (MRI) para la diagnosis del cáncer de hígado y metástasis hepáticas [Z.R. Stephen, F.M. Kievit and M Zhang. Magnetite Nanoparticles for Medical MR Imaging. *Mater Today* (Kidlington). 2011; 14(7-8): 330-338]. Para su uso en MRI las nanopartículas SPION se recubren con polímeros tales como, por ejemplo, dextrano o carboxidextrano. Su pequeño tamaño y la naturaleza del recubrimiento hacen que puedan ser endocitadas por las células de Kupffer (macrófagos situados en el hígado). Los gradientes de campo

magnético inducidos por SPION amplifican las señales de MRI de los protones que se encuentran en su vecindad y, puesto que los tumores malignos de hígado no poseen macrófagos de Kupffer, no retienen SPION, haciendo que aumente el contraste en las imágenes de MRI y se puedan detectar tumores de tamaño muy pequeño. SPION son biodegradables, ya que se metabolizan pasando a formar parte de los almacenes de hierro del cuerpo e integrándose a la hemoglobina, y su uso clínico ha sido aprobado por la *Food and Drug Administration* para la detección de tumores hepáticos, existiendo actualmente numerosas formulaciones comerciales (Endorem®, Fedirex®, Lumirem®, Resovist®, Sinerem®, Combidex®). La aplicabilidad de las nanopartículas superparamagnéticas en diagnóstico no se limita a la MRI, y recientemente se ha desarrollado una nueva metodología de imagen denominada de Partícula Magnética (MPI), que está demostrando un enorme potencial en diagnóstico [Gleich, B.; Weizenecker, J. Tomographic imaging using the nonlinear response of magnetic particles. *Nature* 2005, 435, 1214-1217] [Du, Y.; Lai, P.T.; Leung, C.H.; Pong, P.W.T. Design of Superparamagnetic Nanoparticles for Magnetic Particle Imaging (MPI). *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 18682-18710.].

Además de en diagnóstico, SPION también poseen aplicaciones terapéuticas, entre las que destaca su uso en la terapia antitumoral por hipertermia. Esta terapia consiste en dirigir las nanopartículas al tejido tumoral a tratar, ya sea por direccionamiento activo o pasivo, y someter al paciente a un campo magnético alterno. Este campo magnético provocará el calentamiento de las nanopartículas y estas, al disipar el calor, elevarán localmente la temperatura en el tejido tumoral en el que se encuentran. Un aumento de 5-6 °C sobre la temperatura corporal hará que las células entren en apoptosis, destruyéndose el tumor. La eficacia de esta terapia se puede aumentar conjugando las nanopartículas a un agente quimioterapéutico convencional [M Torres-Lugo and C Rinaldi. Thermal potentiation of chemotherapy by magnetic nanoparticles. *Nanomedicine* 2013, 8(19), 1689-1707]. Tanto en aplicaciones de diagnóstico como terapéuticas es necesario que las nanopartículas posean un recubrimiento que las haga estables en medios biológicos, y que permita su unión a moléculas o biomoléculas con actividad antitumoral [Forrest M. Kievit And Miqin Zhang. Surface Engineering of Iron Oxide Nanoparticles for Targeted Cancer Therapy. *Accounts of Chemical Research*. 2011,44(10), 853-862].

Otra importante aplicación de estas nanopartículas es su uso en procesos de separación y concentración de muestras, tanto en aplicaciones biomédicas como medioambientales. El fundamento de estas técnicas de separación/concentración reside, de nuevo, en las propiedades magnéticas de las nanopartículas, que hacen posible que estas se puedan separar del medio en el que se encuentran por la acción de un imán, arrastrando con ellas aquellas especies químicas que se adsorban a su superficie. Los procesos de separación requieren que la superficie de las nanopartículas esté recubierta por un ligando que posea afinidad por la especie que se desea separar. Esta tecnología, además de permitir separar especies químicas (tales como, por ejemplo, compuestos orgánicos e inorgánicos, biomoléculas o iones metálicos), también permite separar microorganismos y células [Tang Yan, Chu LinYa, Sun Ning, Liu RenXiao, Ge GuangLu. Research progress in magnetic separation with iron oxide magnetic nanoparticles. Chinese Science Bulletin, 2013, 58(24): 2377-2384]. Actualmente existen casas comerciales que comercializan micropartículas (microbeads) magnéticas para aplicaciones de separación. Frente a las microbeads las nanopartículas tienen la ventaja de poseer una mayor relación superficie/volumen (de 100 a 1000 veces mayor), por lo que un determinado peso de nanopartículas puede unir una mayor cantidad del ligando (generalmente anticuerpos) que interacciona con la especie a separar, que la misma cantidad de microbeads, aumentando la eficiencia de la separación.

Las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro pueden sintetizarse mediante diferentes métodos, que favorecen la producción de nanopartículas de distinto tamaño y forma. Artículos de revisión recientes, como el de Laurent et al [Sophie Laurent, Delphine Forge, Marc Port, Alain Roch, Caroline Robic, Luce Vander Elst, and Robert N. Muller. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chem. Rev.* 2008, 108, 2064-2110] o el de Reddy et al [L. Harivardhan Reddy, José L. Arias, Julien Nicolas, and Patrick Couvreur. Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Chem. Rev.* 2012, 112, 5818-5878] proporcionan una perspectiva amplia y completa del actual estado de la técnica en lo que a síntesis y modificaciones superficiales de las nanopartículas se refiere. Independientemente del método de síntesis elegido, la complejidad del procedimiento radica en lograr un estricto control del tamaño estableciendo unas condiciones experimentales óptimas. Entre los métodos de síntesis disponibles el más utilizado por su sencillez, eficiencia y bajo

coste es el denominado método de Massart o método de *co-precipitación*, que consiste en hacer precipitar en medio acuoso básico o ácido dos sales de hierro (una férrica y otra ferrosa).

5 Con respecto a la superficie de las nanopartículas su modificación se puede llevar a cabo tanto durante la síntesis como en un procedimiento post-síntesis. Como hemos mencionado en párrafos anteriores, las modificaciones de la superficie cumplen dos funciones, por un lado aportan estabilidad al sistema coloidal en el medio dispersante y, por otro, aportan grupos funcionales en superficie que permiten conjugarlas a
10 moléculas o biomoléculas necesarias en la aplicación concreta a la que están destinadas. Uno de los métodos más habituales de modificación, que se puede realizar bien durante la síntesis bien en un procedimiento post-síntesis, consiste en tratar las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro con moléculas orgánicas portadoras de grupos carboxilato, fosfato o sulfato, ya que estos grupos
15 poseen afinidad por la superficie de las nanopartículas y se adsorben a ella. Estas moléculas, que actúan como espaciadores químicos, deben poseer, además de un grupo con afinidad por la superficie de las nanopartículas, otros grupos funcionales que aporten estabilidad en medio acuoso y permitan la posterior funcionalización de las nanopartículas con moléculas o biomoléculas de interés. En aplicaciones
20 biomédicas el espaciador debe ser biocompatible, lo que limita el número de espaciadores disponibles.

Otra estrategia muy utilizada consiste en recubrir las nanopartículas con polímeros. Este recubrimiento puede comprometer la biocompatibilidad de las nanopartículas
25 haciéndolas inadecuadas para aplicaciones biomédicas, por lo que el polímero se debe seleccionar de un grupo restringido de polímeros biocompatibles y biodegradables. Por otra parte, la comparación entre el número de grupos funcionales que aporta un polímero para unir ligandos (generalmente limitado a los dos grupos funcionales terminales) y su elevado volumen proporciona una relación muy poco
30 eficiente y, aunque la nanopartícula esté totalmente recubierta por polímeros, su superficie reactiva será baja.

Otras estrategias de funcionalización consisten en recubrir las nanopartículas con otro material, como grafito, oro o dióxido de silicio, para unir a esta capa externa moléculas
35 orgánicas que aporten los grupos funcionales necesarios para unir el ligando. Estas estrategias poseen varias desventajas: comprometen la biocompatibilidad, introducen

dos pasos adicionales a la síntesis y, si la funcionalización no recubre totalmente la superficie se pueden producir uniones inespecíficas a esta, disminuyendo la selectividad en aplicaciones de separación.

5 Por último, algunos métodos de síntesis en medio acuoso dan lugar a grupos OH en superficie. Por ejemplo, la síntesis de magnetita por co-precipitación de sales de hierro en medio básico origina algunos sitios Fe-OH en la superficie de la nanopartículas [E. Tombácz, A. Majzik, Zs. Horvát, E. Illés. Magnetite in aqueous medium: coating its surface and surface coated with it. Roman. Rep. Physics, 2006, 58(3), 281-286].

10

No obstante, el examen de los espectros de IR de estas nanopartículas disponibles en la bibliografía, ponen de manifiesto que el área de la banda debida a la presencia de grupos hidroxilo es muy inferior a las bandas características de la magnetita, por lo que la prevalencia de grupos OH es muy limitada y, en cualquier caso, insuficiente

15

Teniendo en cuenta los factores limitantes expuestos, existe la necesidad de desarrollar un procedimiento sencillo, que permita obtener nanopartículas superparamagnéticas de óxidos de hierro de pequeño tamaño, monodispersas y con un elevado recubrimiento superficial, preferentemente un grupo funcional directamente

20

unido a la superficie de las nanopartículas, que les aporte estabilidad y versatilidad en diferentes aplicaciones.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

25

La presente invención se refiere a nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro seleccionadas de entre magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) o una combinación de las mismas, cuyas superficies están funcionalizadas directamente con grupos hidroxilo. Los grupos hidroxilos están unidos directamente a

30

la superficie, es decir, estos grupos hidroxilos no requieren de espaciadores orgánicos o inorgánicos para unirse a las nanopartículas.

Además, los grupos hidroxilos unidos directamente a la superficie permiten su posterior funcionalización con moléculas o biomoléculas de interés, bien mediante la

35

formación de enlaces covalentes bien mediante conjugación.

De acuerdo a su composición química tanto el núcleo de las nanopartículas superparamagnéticas como su recubrimiento tienen una gran estabilidad en medio acuoso y/o medio biológico, son biocompatibles y biodegradables y se pueden unir a moléculas y biomoléculas como pueden ser un anticuerpo que sirva de modelo de vector de direccionamiento, un agente antitumoral o un oligonucleótido que sirven como modelos de quimioterapia y terapia génica, entre otros.

Por otro lado, la presente invención se refiere al procedimiento post-síntesis de modificación de la superficie de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro seleccionadas de entre magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) o una combinación de las mismas. Mediante el procedimiento se obtienen nanopartículas superparamagnéticas de pequeño tamaño, monodispersas y con un alto grado de recubrimiento superficial con grupos hidroxilos que permiten la posterior conjugación o unión mediante enlaces covalentes de moléculas y biomoléculas sin que las propiedades superparamagnéticas del núcleo se vean afectadas. Se trata de un procedimiento sencillo y de bajo coste.

Cabe resaltar que el tamaño de las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro tras el tratamiento post-síntesis no se ve incrementado significativamente, como ocurre con el uso de espaciadores orgánicos o inorgánicos.

Por último, la presente invención se refiere al uso de estas nanopartículas superparamagnéticas de superficie modificada con grupos hidroxilo y que además pueden comprender moléculas o biomoléculas unidas o conjugadas a los grupos hidroxilo, como agentes de diagnóstico o de tratamiento, en terapias selectivas, detección temprana y en técnicas de concentración y separación de muestras químicas y biológicas.

En un primer aspecto, la presente invención reivindica una nanopartícula de óxido de hierro seleccionado de entre magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) o cualquiera de sus combinaciones, cuya superficie está modificada directamente con grupos hidroxilo, sin espaciadores (a partir de ahora nanopartículas de la invención).

El diámetro medio de las nanopartículas de óxido de hierro descritas es de entre 1,5 y 150 nm, preferiblemente entre 2 y 50, mas preferiblemente entre 3 y 30 nm y aún mas

preferiblemente entre 4 y 20 nm, de acuerdo con su caracterización por microscopia electrónica de transmisión

5 La química superficial de las partículas de óxido de hierro es un factor limitante en su aplicabilidad, por lo que es necesario dotarlas de un recubrimiento de calidad, es decir, que proporcione un número elevado de grupos funcionales que aporten las propiedades físico-químicas requeridas, entre ellas la estabilidad coloidal. Uno de estos grupos es el grupo hidroxilo que, además de aportar estabilidad, permite la funcionalización de las nanopartículas. En los procesos de síntesis en medio acuoso
10 de nanopartículas de óxidos de hierro se producen algunos sitios Fe-OH en la superficie, y estos sitios no son suficientes para conferirles estabilidad en medio acuoso, como se pone de manifiesto en el bajo valor de potencia zeta de las nanopartículas. Por ejemplo, nanopartículas de óxido hierro de un tamaño en torno a 8 nm (medido por TEM) sin tratamiento post-síntesis tienen un valor de potencial zeta
15 de 0 a 10 mV en el intervalo de pH de 8 a 6 en el que se desarrollan la mayoría de sus aplicaciones, especialmente las biomédicas. Con estos valores de potencial zeta las partículas no son estables en suspensión acuosa, y agregan alcanzando diámetros hidrodinámicos en los agregados de 800 a 1000 nm.

20 Se entiende en la presente invención que la calidad del recubrimiento con los grupos hidroxilo es adecuada cuando el potencial zeta es mayor de 20 mV en el intervalo de pH de 8 a 6.

Por todo ello, en una realización preferida la superficie de las nanopartículas de óxido
25 de hierro de la invención tienen un valor de potencial zeta en medio acuoso a pH 6-8 superior a 20 mV. Preferiblemente entre 25 y 80 mV y aún más preferiblemente entre 30 y 60. Este potencial zeta se alcanza mediante el tratamiento post-síntesis de las nanopartículas de óxido de hierro objeto de la invención.

30 En una realización preferida de la invención el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas de la invención, resultantes tras el tratamiento post-síntesis, es de entre 4 y 200 nm. Preferiblemente de 6 a 150 nm, y aún más preferiblemente de entre 8 a 100 nm.

35 Otra forma de definir la calidad del recubrimiento con grupos hidroxilo es mediante espectroscopia FTIR. La calidad del recubrimiento es adecuada cuando el espectro de

IR de las nanopartículas obtenidas presenta una banda debida a la presencia de grupos hidroxilo (δOH) superior a las bandas características de las nanopartículas ($\nu\text{Fe-O}$) sin pretratar.

5 En una realización preferida de la invención el valor de la relación de las áreas de las bandas $\delta\text{OH}/\nu\text{Fe-O}$ es superior a 2. Preferiblemente superior a 10, y aún más preferiblemente de entre 10 y 50.

10 Con estas características descritas se aumenta de forma muy considerable la superficie reactiva de las nanopartículas.

Otro aspecto de la invención se refiere al procedimiento post-síntesis de modificación de la superficie de nanopartículas de óxido de hierro seleccionadas de entre magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) o cualquier combinación de las mismas, que comprende las siguientes etapas:

15 a) adicionar una disolución acuosa de peróxido sobre nanopartículas de óxido de hierro seleccionadas de entre magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) o cualquier combinación de las mismas, y
b) opcionalmente, purificar las nanopartículas obtenidas en la etapa a).

20 De acuerdo a esta forma de realización se minimiza el proceso, y en un solo paso se obtienen las partículas de interés.

25 En una realización preferida, el peróxido es peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La disolución acuosa puede incluir, además del peróxido, uno o varios agentes oxidantes más. En el caso de utilizar una combinación con al menos otro agente oxidante, preferiblemente se trataría de una combinación de peróxido de hidrógeno y al menos otro agente oxidante seleccionado de entre, ácido nítrico, ácido crómico, dicromatos, permanganatos y percloratos.

30 El agente oxidante se utiliza en el procedimiento en forma de disolución acuosa. Preferiblemente la disolución acuosa es de H_2O_2 y de entre el 10 y el 33% en peso, mas preferiblemente entre 20 y 30% en peso

35 La adición del agente oxidante debe ser lenta y bajo agitación vigorosa puesto que la reacción es exotérmica.

En otra realización preferida, las nanopartículas de óxido de hierro obtenidas mediante el procedimiento post-síntesis descrito anteriormente, se encuentran en forma de suspensión coloidal en un medio dispersante. Preferiblemente el medio dispersante es un disolvente polar.

5 Más preferiblemente, las nanopartículas de óxido de hierro se encuentran en forma de disolución coloidal en agua.

Preferiblemente, el procedimiento post-síntesis descrito anteriormente incluye la etapa b) de purificación de las nanopartículas obtenidas en la etapa a).

10

En otra realización preferida, la etapa b) del procedimiento post-síntesis comprende un lavado de las nanopartículas con un disolvente y la separación de las mismas por técnicas de decantación. Preferiblemente, las técnicas de decantación se seleccionan de entre decantación magnética y/o centrifugación y el disolvente para el lavado es preferiblemente un disolvente orgánico, de menor polaridad que el agua, por ejemplo, pero sin limitarse, acetona, etanol, propanol, DMSO; DMF, THF, acetato de Etilo, acetonitrilo o dioxano.

15

Dependiendo de su posterior uso o adecuación las nanopartículas se pueden purificar para eliminar restos de agente oxidante que puedan interferir en la aplicación.

20

Por todo ello, en otra realización preferida, las nanopartículas de la invención se encuentran en forma sólida.

Las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro descritas anteriormente se pueden funcionalizar para utilizar, entre otros, como agentes para el diagnóstico en metodologías de imagen, como en contraste en Resonancia Magnética (MRI) o en otros métodos de imagen como de partícula magnética (MPI). Igualmente serían aptas para aplicaciones terapéuticas. Su recubrimiento estable en medios biológicos y que permite su unión a moléculas o biomoléculas con actividad terapéutica, les hace aptos para esta utilidad. Otro uso para el que claramente están preparadas es para procesos de separación y concentración de muestras, tanto en el campo de la biomedicina como el de aplicaciones medioambientales. Esto es posible tanto por la funcionalización que pueda darse como sobre todo por sus propiedades magnéticas.

25

30

35

Con el fin de poderse utilizar en estas aplicaciones es necesario funcionalizar las nanopartículas de la presente invención.

5 Por lo que otra realización preferida de la presente invención es que el procedimiento post-síntesis descrito anteriormente incluye la etapa c) de funcionalización de la nanopartícula obtenida en la etapa a) o b).

10 El paso c) de funcionalización consiste en la presente invención en conjugar a la superficie de las nanopartículas a través de los grupos OH obtenidos en los pasos previos, moléculas o biomoléculas de interés dependiendo de la aplicación final de dichas nanopartículas.

Otro aspecto de la invención se refiere a una nanopartícula funcionalizada. Entendiéndose por nanopartícula funcionalizada aquella que ha sido modificada en su superficie con moléculas confiriéndole nuevas propiedades y/o funcionalidades.
15 Dichas moléculas pueden ser orgánicas o inorgánicas, por ejemplo una biomolécula, un agente terapéutico, un marcador fluorescente, un agente de contraste, organosilanos, un polímero, o un agente complejante.

20 Ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos son fármacos hidrofóbicos, fármacos hidrofílicos, toxinas y radioisótopos.

Entendiéndose el término "biomolécula" en la presente invención como cualquier compuesto natural o diseñado y/o fabricado por el hombre, que tiene o ejerce un efecto observable en una célula, un componente celular o un organismo. Este término
25 se aplica a las proteínas, los complejos de proteínas que comprenden entidades químicas, el ADN, complejos de ADN, de ARN, enzimas, factores de crecimiento, factores quimiotácticos, citoquinas, péptidos, receptores, polipéptidos, anticuerpos, antígenos, epítopos antigénicos y variantes de los mismos, vacunas, neurotransmisores, polinucleótidos, hormonas, hidratos de carbono, lípidos,
30 fosfolípidos y sondas marcadas capaces de ser detectadas.

Por ello, en otra una realización preferida, la nanopartícula comprende un anticuerpo.

35 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la nanopartícula funcionalizada como agente de diagnóstico. Dependiendo de la funcionalización de la nanopartícula su aplicación en el campo del diagnóstico es muy versátil, pudiéndose

utilizar en técnicas de contraste, como en Resonancia Magnética (MRI) o en otros métodos de imagen.

5 Cuando la funcionalización de la nanopartícula se lleva a cabo con agentes terapéuticos, otro aspecto de la invención se refiere al uso de la nanopartícula funcionalizada para la elaboración de una composición farmacéutica.

10 La nanopartícula de la invención puede actuar asimismo como vehículo de liberación sostenida o direccionamiento de fármacos. Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la nanopartícula de la invención como vehículo para la liberación controlada de fármacos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la nanopartícula funcionalizada o no de la invención.

15 En la presente invención se entiende por composición farmacéutica una composición que incluya la nanopartícula objeto de la invención. Esta puede estar funcionalizada o no. Por ejemplo, pero sin limitarse, la nanopartícula puede actuar por si sola como agente terapéutico, o estar funcionalizada con una molécula o biomolécula para conseguir que se dirija hacia el foco a tratar, por ejemplo un tumor, o puede ser direccionada por aplicación de un campo magnético. También puede tratarse de una composición farmacéutica donde el papel de la nanopartícula, sea de vehículo de direccionamiento del fármaco o biomolécula que se conjuga.

25 Otro aspecto más de la invención se refiere al uso de la nanopartícula funcionalizada como reactivo en técnicas de concentración y/o separación de muestras químicas y/o biológicas.

30 Las nanopartículas de la presente invención son especialmente idóneas para este tipo de técnicas puesto que se requiere que la especie a separar o concentrar tenga afinidad por los ligandos de la superficie de las nanopartículas, y la separación será más eficiente cuanto mayor sea el recubrimiento de la nanopartícula con estos ligandos. Como se ha expuesto anteriormente, las nanopartículas de la presente invención, cuya superficie está modificada con grupos hidroxilo, logran un alto grado de funcionalización en superficie, aumentando de esta forma la efectividad en este tipo de aplicaciones.

Otro aspecto se refiere a un kit que comprende las nanopartículas funcionalizadas descritas anteriormente y un sistema magnético de separación.

- 5 El último aspecto de la invención se refiere al uso del kit descrito anteriormente para la concentración y separación de muestras químicas y biológicas.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o
10 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. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1 Imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las nanopartículas obtenidas, tras el tratamiento post-síntesis, a diferentes ampliaciones.

- 20 FIG. 2. Espectro de infrarrojo (FT-IR) de las nanopartículas superparamagnéticas de óxidos de hierro antes (gris) y después (negro) del tratamiento.

FIG. 3. Espectro de infrarrojo (FT-IR) de las nanopartículas superparamagnéticas de óxidos de hierro obtenidas tras su funcionalización con (3-Aminopropil)trimetoxisilano.

- 25 FIG. 4. Espectro de fluorescencia de la suspensión de nanopartículas obtenida tras su funcionalización con el anticuerpo (negro) y las aguas madre obtenidas por separación magnética de las nanopartículas tras la reacción de acoplamiento (gris).

30 EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

35 1.- Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro (magnetita):

Se mezcla una disolución acuosa de FeCl_2 (12,5 ml, 0,22 M) con una disolución acuosa de FeCl_3 (15 ml, 0,38 M), disolviendo las dos sales con la ayuda de un baño de ultrasonidos.

- 5 A continuación se añaden a la mezcla 19 ml de una disolución acuosa de NaOH (6,2 M) bajo agitación y de forma rápida.

Las nanopartículas obtenidas se lavan con agua destilada tres veces y se decantan magnéticamente o por centrifugación.

10

Tras el último lavado se añaden 20 mL de una disolución acuosa de HNO_3 (2M) bajo agitación vigorosa, y la mezcla se mantiene en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo las nanopartículas se separan por decantación magnética.

15

2.- Tratamiento post-síntesis de las nanopartículas de óxido de hierro obtenidas en el apartado anterior

20

Se resuspenden las nanopartículas obtenidas en el apartado anterior en 20 ml de agua destilada, y se adicionan 40 ml de H_2O_2 (al 30%). La adición debe ser lenta y bajo agitación vigorosa puesto que la reacción es exotérmica.

La mezcla se mantiene 12 horas bajo agitación y, transcurrido este tiempo, se lavan las nanopartículas con acetona y se separan por decantación magnética.

25

3.- Caracterización de las nanopartículas de óxido de hierro cuya superficie esta funcionalizada con grupos hidróxidos obtenidas en el apartado anterior.

30

Las nanopartículas obtenidas en el apartado 2 poseen un diámetro medio de 7 nm, de acuerdo a su caracterización por microscopia electrónica de transmisión (Fig.1), y su diámetro hidrodinámico medio de 35 nm.

35

La caracterización mediante espectroscopia FT-IR confirma el recubrimiento con grupos hidroxilo en la superficie tras el tratamiento post síntesis (Fig. 2). En el espectro de las nanopartículas antes del tratamiento se observan las bandas características de la magnetita a 614 cm^{-1} ($\nu\text{Fe-O}$) y a 420 cm^{-1} ($\delta\text{Fe-O}$). En cambio,

tras el tratamiento post-síntesis, las bandas más intensas son las correspondientes a los grupos hidroxilo superficiales, a 1358 cm^{-1} (δOH) y 3236 cm^{-1} (νOH), mientras que la banda debida a las nanopartículas, ($\nu\text{Fe-O}$) a 614 cm^{-1} , es prácticamente inapreciable, poniendo de manifiesto el elevado recubrimiento que se logra con el

5 tratamiento post-síntesis. Tras el tratamiento también se observa la aparición de una banda poco intensa a 670 cm^{-1} , que podría deberse a la oxidación superficial de las nanopartículas.

El potencial zeta de de las nanopartículas suspendidas en agua a pH 6,5 es de 47,5

10 mv. Este valor es muy elevado, lo que indica la gran estabilidad de estas nanopartículas en medio acuoso. El signo del potencial es positivo, como cabe esperar de nanopartículas recubiertas de grupos hidroxilo a este pH, por lo que la gran estabilidad observada se debe a repulsiones electrostáticas.

15 **4.- Ejemplo de aplicación de las nanopartículas obtenidas**

Ejemplo de aplicación 1. Funcionalización de las nanopartículas obtenidas en el apartado 2 del ejemplo (MAGOH) con (3-aminopropil)trimetoxisilano (APS).

20 A 1 mL de una suspensión de MAGOH (1mg/mL en agua:metanol al 50 %) se le añade 1 mL de APS gota a gota en agitación vigorosa, y se mantiene la mezcla en agitación suave durante 12 horas a temperatura ambiente. Seguidamente se realizan tres lavados con acetona, separando las nanopartículas mediante decantación magnética.

25 En el espectro de FT-IR de las nanopartículas obtenidas (Fig. 3) se observan las bandas características del APS: 3064 , 1566 y 1335 cm^{-1} (νNH y δNH), 2887 y 2934 cm^{-1} (νCH_2), 1029 cm^{-1} (δSiO). Estas bandas son extremadamente intensas, comparadas con las bandas debidas a las nanopartículas, lo que indica el alto nivel de

30 recubrimiento alcanzado.

Ejemplo de aplicación 2. Funcionalización de las nanopartículas obtenidas en el apartado 2 del ejemplo con el anticuerpo Anti-EGFR marcado con Alexa Fluor.

35 A 1 mL de una suspensión de MAGOH (1mg/mL en agua) se le añade 20 μL de una disolución acuosa de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (0,01M) y 10 μL de

una disolución acuosa de N-hidroxisuccinimida (0,02M), y se mantiene la mezcla de reacción en agitación suave durante 4 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se separan las nanopartículas por decantación magnética, se lavan con agua y se resuspenden en 180 μ L de una disolución acuosa conteniendo el anticuerpo. La reacción de acoplamiento con el anticuerpo mantiene a 4°C durante 12 horas en agitación suave. Transcurrido este tiempo se separan las nanopartículas por decantación magnética, se lavan con agua y se resuspenden en 180 μ L de agua.

La correcta funcionalización de las nanopartículas con el anticuerpo se comprueba por fluorescencia, comparando la emisión de la suspensión acuosa de las nanopartículas con la de las aguas madre obtenidas por separación magnética tras la reacción de acoplamiento con el anticuerpo (Fig. 4).

15

REIVINDICACIONES

1. Nanopartícula de óxido de hierro seleccionado de entre magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) o cualquiera de sus combinaciones, cuya superficie está modificada directamente con grupos hidroxilo, sin espaciadores, y caracterizadas por un potencial zeta mayor de 20 mV en disolución acuosa a un pH de 8 a 6.
2. Nanopartícula según la reivindicación 1, que además comprende una biomolécula, un agente terapéutico, un marcador fluorescente, un agente de contraste, un organosilano, un polímero o un agente complejante.
3. Procedimiento de obtención de las nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 que comprende las siguientes etapas:
 - a) adicionar una disolución acuosa de peróxido sobre nanopartículas de óxido de hierro seleccionadas de entre magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) o cualquiera de sus combinaciones,
 - b) opcionalmente, purificar las nanopartículas obtenidas en la etapa a).
4. Procedimiento, según la reivindicación 3, donde el agente oxidante es peróxido de hidrógeno.
5. Procedimiento, según la cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, donde el agente oxidante es una combinación de peróxido y otro agente oxidante seleccionado de entre, ácido nítrico, ácido crómico, dicromatos, permanganatos y percloratos.
6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, donde se lleva a cabo la etapa b) de purificación de las nanopartículas obtenidas en la etapa a).
7. Procedimiento, según la reivindicación 6, donde la etapa b) comprende un lavado de las nanopartículas con un disolvente orgánico y la separación de las mismas por técnicas de decantación.

8. Procedimiento, según cualquier de las reivindicaciones 3 a 7 que incluye un paso c) de funcionalización de la nanopartícula obtenida en la etapa a) o b).
- 5 9. Uso de las nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 para la elaboración de un agente de diagnóstico.
10. Uso de las nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 para la elaboración de una composición farmacéutica.
- 10 11. Composición farmacéutica que comprende las nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
- 15 12. Uso de las nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 como reactivo en técnicas de concentración y/o separación de muestras químicas y/o biológicas.
- 20 13. Kit que comprende las nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 y un sistema magnético.
14. Uso del kit, según la reivindicación 13, para la concentración y separación de muestras químicas y biológicas.

FIG. 1

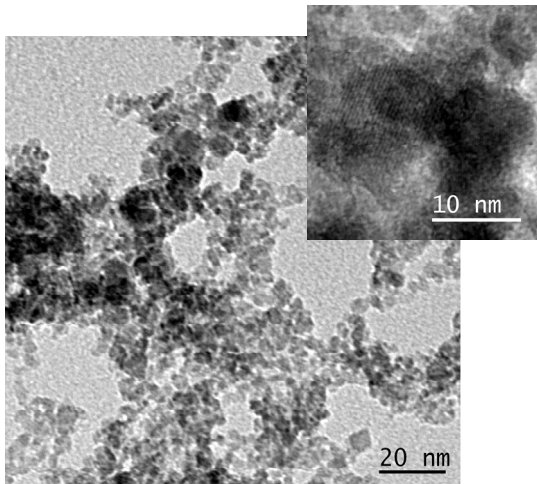


FIG. 2

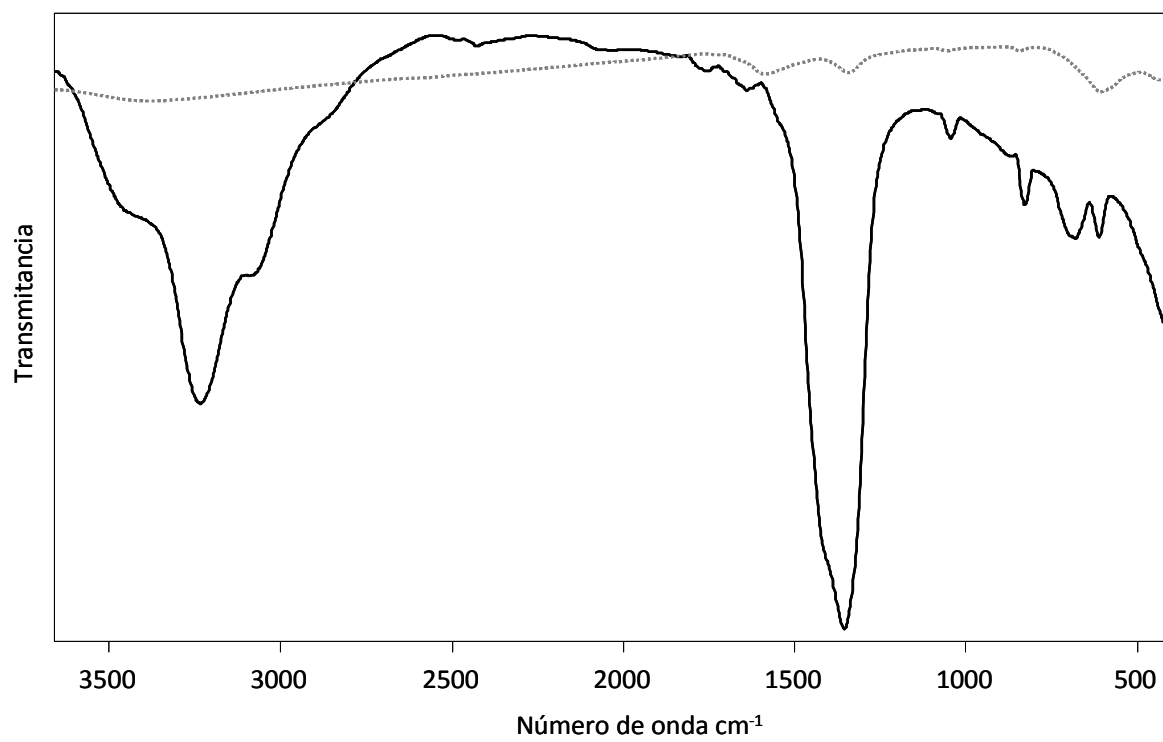


FIG. 3

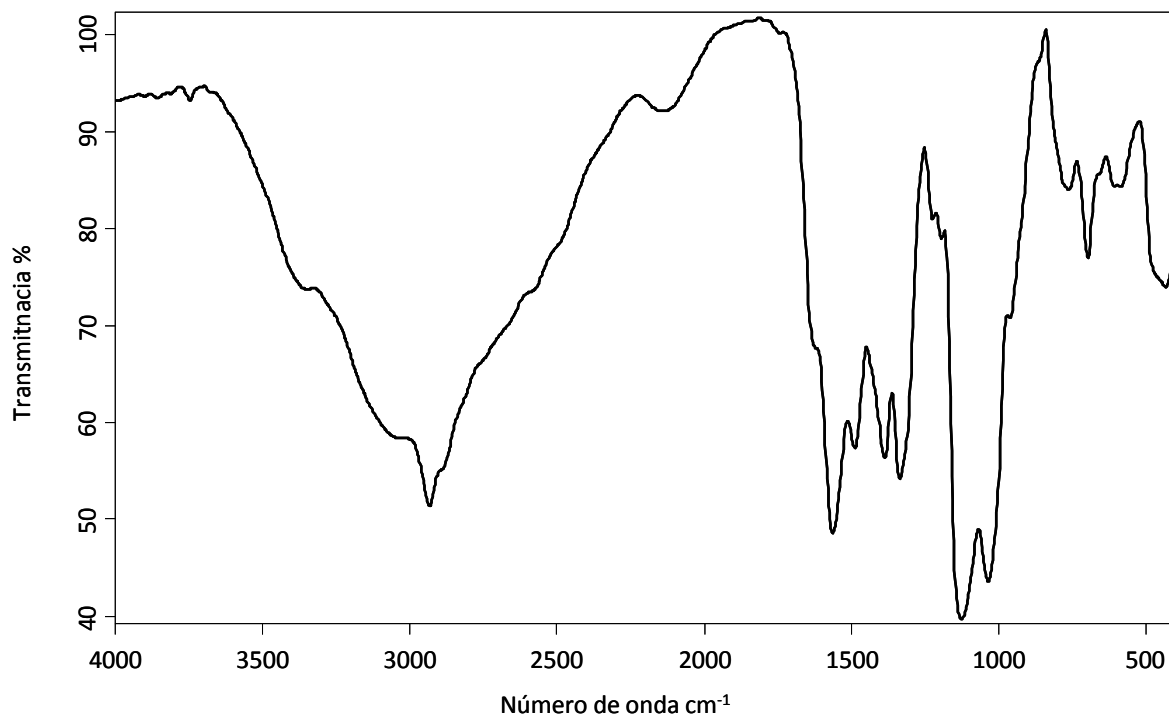
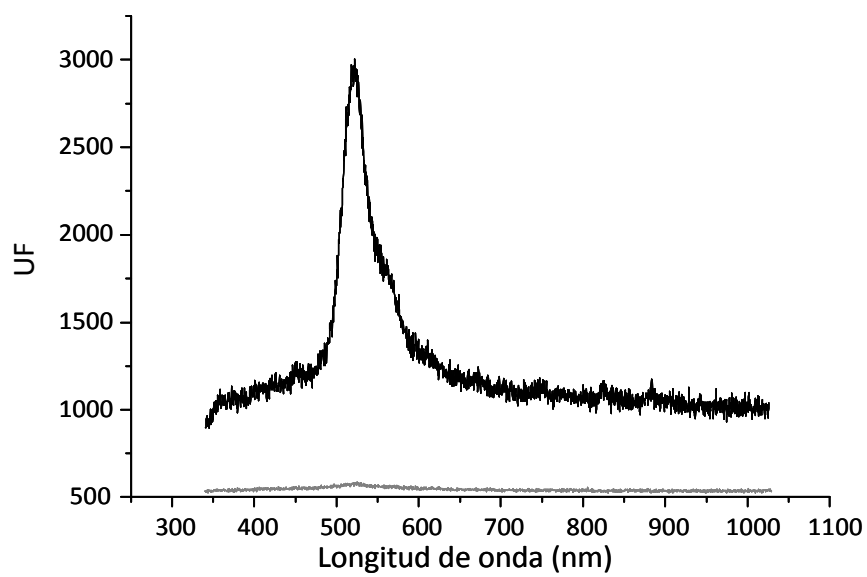


FIG. 4





- ②① N.º solicitud: 201430524
②② Fecha de presentación de la solicitud: 09.04.2014
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CN 101593594 A (UNIV SICHUAN) 02.12.2009, (resumen) [en línea] [recuperado el 01.07.2015]. Recuperado de: EPOQUE EPODOC Database.	1-14
A	HO J et al. N,N'-Carbonyldiimidazole-mediated functionalization of superparamagnetic nanoparticles as vaccine carrier. COLLOIDS AND SURFACES. B, BIOINTERFACES, 20110301 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 01.03.2011 VOL: 83 No: 1 Págs: 83-90 ISSN 0927-7765; figura 1.	1-14
A	PHAN N T S et al. Superparamagnetic nanoparticles-supported phosphine-free palladium catalyst for the Sonogashira coupling reaction. JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS A: CHEMICAL, 20110104 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 04.01.2011 VOL: 334 No: 1-2 Págs: 130-138 ISSN 1381-1169; esquema 1.	1-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
06.08.2015

Examinador
N. Vera Gutiérrez

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K49/00 (2006.01)

B82Y5/00 (2011.01)

B82Y25/00 (2011.01)

A61K33/26 (2006.01)

B82Y40/00 (2011.01)

B22F1/00 (2006.01)

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

B82Y, A61K, B22F

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

INVENES, EPODOC, CAS, WPI, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP, XPESP2

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 06.08.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	CN 101593594 A (UNIV SICHUAN)	02.12.2009
D02	HO J et al. N,N'-Carbonyldiimidazole-mediated functionalization of superparamagnetic nanoparticles as vaccine carrier. COLLOIDS AND SURFACES. B, BIOINTERFACES, 20110301 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 01.03.2011 VOL: 83 No: 1 Págs: 83-90 ISSN 0927-7765; figura 1.	01.03.2011
D03	PHAN N T S et al. Superparamagnetic nanoparticles-supported phosphine-free palladium catalyst for the Sonogashira coupling reaction. JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS A: CHEMICAL, 20110104 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 04.01.2011 VOL: 334 No: 1-2 Págs: 130-138 ISSN 1381-1169; esquema 1.	04.01.2011

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención se refiere a nanopartículas de óxido de hierro seleccionado entre magnetita, maghemita, hematita o cualquiera de sus combinaciones, cuya superficie está modificada directamente con grupos hidroxilo, sin espaciadores, y caracterizadas por un potencial zeta mayor de 20mV en disolución acuosa a un pH de 8 a 6.

El documento D01 divulga nanopartículas magnéticas de óxido de hierro cuya superficie está modificada por grupos amino e hidroxilo, o por grupos amino, hidroxilo y carboxilo.

El documento D02 divulga la preparación de nanopartículas superparamagnéticas de magnetita (Fe_3O_4) conjugadas con ovoalbúmina mediante una reacción mediada por N,N'-carbonyldiimidazol. La figura 1 muestra un esquema del procedimiento de preparación, en el que se representan las nanopartículas con grupos hidroxilo en su superficie. Las nanopartículas obtenidas son útiles como vehículo portador de vacunas.

El documento D03 divulga la preparación de nanopartículas superparamagnéticas de CoFe_2O_4 funcionalizadas en su superficie con una base de Schiff, para formar ligandos bidentados inmovilizados. En el esquema 1 se recoge el procedimiento de síntesis de las nanopartículas, en una de cuyas etapas se representan las nanopartículas que presentan la superficie modificada con grupos hidroxilo.

Ninguno de los documentos citados divulga nanopartículas de óxido de hierro con superficie modificada por grupos hidroxilo, que presenten un potencial zeta mayor de 20mV en disolución acuosa a un pH de 8 a 6. Según se desprende de la descripción, estos valores de potencial zeta conseguidos tras el tratamiento post-síntesis de las nanopartículas, son indicativos de la adecuada calidad del recubrimiento.

Por ello, se considera que la invención tal como se define en las reivindicaciones 1-14 de la solicitud es nueva e implica actividad inventiva (Artículos 6.1 y 8.1 L.P.).