

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 830 873**

21 Número de solicitud: 201931077

51 Int. Cl.:

<b>C07F 7/02</b>	(2006.01)
<b>C07F 7/08</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/56</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/295</b>	(2006.01)
<b>B82Y 5/00</b>	(2011.01)
<b>A61P 33/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 31/04</b>	(2006.01)

12

## SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**04.12.2019**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**04.06.2021**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE ALCALÁ (100.0%)  
Plaza de San Diego s/n  
28801 Alcalá de Henares (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**GÓMEZ RAMÍREZ, Rafael;  
DE LA MATA DE LA MATA, F. Javier;  
BARRIOS GUMIEL, Andrea;  
SÁNCHEZ-NIEVES FERNÁNDEZ, Javier;  
COPA PATIÑO, José L. y  
SOLIVERI DE CARRANZA, Juan**

54 Título: **NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS ESTABILIZADAS CON SISTEMAS DENDRÍTICOS CARBOSILANO Y SUS USOS**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a nanopartículas magnéticas (NPM), principalmente de magnetita ( $Fe_3O_4$ ), recubiertas en su superficie con moléculas dendríticas, particularmente dendrones, de estructura carbosilano y funcionalizados en su periferia con grupos activos que preferiblemente están en forma catiónica. La presente invención también se refiere al procedimiento de obtención de las NPM a partir de los precursores (magnetita) y dendrones carbosilano. Además, la invención se refiere a los usos de dichos compuestos en concentración o eliminación de microorganismos y ácidos nucleicos. Su capacidad de retención depende de la generación de los sistemas dendríticos soportados por la NPM. En cualquier caso, se observa la capacidad de interacción de las NPM con bacterias, tanto Gram+ como Gram-, y con ácidos nucleicos. La aplicación de un campo magnético a soluciones de dichas NPM en un medio con bacterias o ácidos nucleicos permite la retirada de estos de dicho medio.

ES 2 830 873 A1

**DESCRIPCIÓN**  
**NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS ESTABILIZADAS CON SISTEMAS DENDRÍTICOS**  
**CARBOSILANO Y SUS USOS**

5

La presente invención se refiere a nanopartículas magnéticas de óxido de hierro (magnetita;  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), recubiertas en su superficie con moléculas dendríticas de estructura carbosilano, funcionalizadas en su periferia con grupos activos que preferiblemente están en forma catiónica. La presente invención también se refiere al procedimiento de obtención de las nanopartículas a partir de los precursores, nanopartículas magnéticas de óxido de hierro y moléculas dendríticas de estructura carbosilano. Además, la invención se refiere a los usos de dichos compuestos en biomedicina y más concretamente en la concentración y eliminación de microorganismos (bacterias, hongos y amebas) y ácidos nucleicos.

15 **ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

Las nanopartículas magnéticas (NPM) son de gran interés entre otras razones por su gran relación superficie/volumen y por poder ser guiadas por un campo magnético externo (Akbarzadeh, A. et al. *Nanoscale Research Letters* **2012**, 7, 144). Para su aplicación en diferentes campos la funcionalización es la clave, ya que orienta la utilidad y le confiere las propiedades adecuadas para ello. Además, el recubrimiento de la superficie favorece la dispersión en estado líquido. Entre sus aplicaciones se puede destacar la bioseparación, la detección molecular o la concentración de analitos (Oksvold, M. P.; et al. *Methods Mol Biol* **2015**, 1218, 465).

25 Un tipo de moléculas que se ha utilizado recientemente para estabilizar NP, y que además tiene un atractivo específico para aplicaciones biomédicas, son las moléculas dendríticas (MD) (Newkome, G. R.; Shreiner, C. D. *Polymer* **2008**, 49, 1). Las MD, dendrímeros y dendrones, son moléculas hiperramificadas de construcción arborescente, de tamaño y estructura tridimensional bien definidos y que poseen unas propiedades químicas uniformes debidas en parte a su baja polidispersidad como consecuencia de su síntesis controlada. Los dendrímeros y dendrones de mayores generaciones presentan una topología molecular esférica. En ambos casos, su superficie contiene los grupos activos de estas moléculas. Además, en el caso de los dendrones, éstos presentan una posición adicional denominada punto focal, que puede servir para introducir una nueva función activa o como anclaje a otros sistemas, por ejemplo, a NP.

35

Las MD por sí mismos pueden tener actividad biológica, actuando por ejemplo como agentes antibacterianos (Chen, C.Z., Cooper, S.L., *Biomaterials* **2002**, 23, 3359). También pueden actuar como agentes de transporte de ácidos nucleicos o fármacos (M. A. Mintzer and E. E. Simanek, *Chem. Rev.*, **2009**, 109, 259). Esta actividad depende principalmente de las funciones periféricas y está relacionada con la multivalencia de las MD, ya que presentan un número elevado de funcionalidades sobre una misma molécula.

Por ejemplo, MD con grupos catiónicos se emplean como transportadores de ácidos nucleicos en terapias frente al VIH, cáncer, etc., debido a la formación de nanoconjugados a través de interacciones electrostáticas entre la carga positiva de las MD y las cargas negativas de los ácidos nucleicos (M. J. Serramía, et al. *J. Control. Release*, **2015**, 200, 60). Este mismo tipo de sistemas presentan interesantes propiedades bactericidas precisamente por la carga positiva neta que presentan y su capacidad para interactuar con membranas bacterianas (Fuentes-Paniagua, E., et al. *RSC Adv.* **2016**, 6, 7022). La incorporación de MD a NP ha llevado a la formación de NP de oro y plata cubiertas en su superficie con MD que presentan propiedades como las comentadas anteriormente (Peña-González, C.E. et al. *Int J. Pharm.* **2017**, 528, 55).

Si esta funcionalización con MD se realizara sobre NPM, se podría plantear que la interacción de estas con ácidos nucleicos o bacterias, en un medio en el cual estos sistemas estuvieran presentes, permitirían la concentración de estos agentes sobre las NPM, de modo que la aplicación de un campo magnético retiraría las NPM del medio arrastrando además los ácidos nucleicos y bacterias que están interactuando con ellas. Es decir, este tipo de NPM serviría por ejemplo para concentrar bacterias o ácidos nucleicos para mejorar su análisis o para purificar aguas. Esto último es de especial relevancia, ya que para algunas aplicaciones el nivel de pureza requerido ha de ser mejorado y trazas de microorganismos o ácidos nucleicos pueden conllevar la aparición de complicaciones en pacientes de hospital, como por ejemplo en pacientes de diálisis (Bossola M, et al. *Clin J Am Soc Nephrol.* **2009**, 4, 379).

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona nanopartículas magnéticas (NPM) recubiertas de moléculas dendríticas (MD) de estructura carbosilano que están funcionalizados en su periferia con grupos catiónicos (sales de amonio) o neutros (grupos amino). Esta unión entre las MD y las NPM se realiza preferentemente por reacción entre un grupo trialcóxosililo presente en las MD y los grupos hidroxilo de la superficie de las NPM. Preferentemente, las

nanopartículas son de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) y las MD son dendrones de estructura carbosilano funcionalizados en su superficie con grupos catiónicos o neutros a través de reacciones de adición de tipo tiol-eno.

5 El procedimiento de obtención de las NPM de la invención permite, mediante un proceso sencillo, la síntesis de sistemas catiónicos. Además, la invención proporciona sus usos como sistema de concentración de bacterias o ácidos nucleicos, que puede servir para la mejora de detección de estos agentes o purificación de medios contaminados.

10 Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a una NPM (a partir de ahora compuesto de la invención) que comprende:

-Un núcleo compuesto por magnetita,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , de tamaño nanoscópico. Este núcleo puede tener una disposición de sus átomos esférica, cilíndrica, de prisma u otras, con al menos una dimensión entre 1 y 1000 nm.

15 -La superficie de la NPM está a su vez recubierta por al menos una molécula dendrítica (MD). Por "molécula dendrítica" se refiere en la presente invención a una macromolécula muy ramificada donde las unidades, ramas o ramificaciones de crecimiento tienen esqueleto carbosilano y esta molécula dendrítica está funcionalizada en su capa externa con grupos catiónicos (amonio) o neutros (amino). La molécula dendrítica se  
20 selecciona entre dendrón o dendrímero y comprende una cadena anclante de fórmula  $-\text{Si} - (\text{CH}_2)_b - \text{R}^1 - (\text{CH}_2)_a -$  donde:

la molécula dendrítica está unida al núcleo por el átomo de Si,

a es un número entero que varía entre 0 a 10;

b es un número entero que varía de 1 a 10, preferiblemente varían de 1 a 5; y

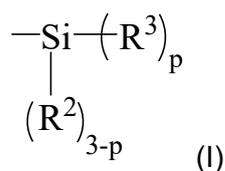
25  $\text{R}^1$  se selecciona de entre un grupo urea ( $-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}-$ ), carbamato ( $-\text{O}-\text{CO}-\text{NH}-$  ó  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{O}-$ ), tiocarbamato ( $-\text{S}-\text{CO}-\text{NH}-$ ,  $-\text{O}-\text{CS}-\text{NH}-$ ,  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{S}-$  o  $-\text{NH}-\text{CS}-\text{O}-$ ), tiourea ( $-\text{NH}-\text{CS}-\text{NH}-$ ) o un grupo triazol, preferiblemente el N del grupo  $\text{R}^1$  está unido a la molécula dendrítica a través o no de grupos metilenos. Preferiblemente  $\text{R}^1$  es un grupo urea ( $-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}-$ ).

30 Este compuesto dendrítico es preferentemente un dendrón (Figura 1), también denominado este último como cuña dendrítica, que se refiere a una macromolécula muy ramificada con forma de cono y que está definida por un punto focal, las unidades, ramas o ramificaciones de crecimiento, que parten de dicho punto focal y la capa externa, superficie o periferia de  
35 dichas ramificaciones, que incorpora grupos funcionales.

Cuando la molécula dendrítica es un dendrón:

-el punto focal del dendrón es la cadena anclante. La unión del dendrón a la NPM se realiza a través del átomo de silicio presente en la cadena anclante de fórmula  $-\text{Si}-(\text{CH}_2)_b-\text{R}^1-(\text{CH}_2)_a-$ ; donde: a y b son números enteros que varían de 1 a 10, preferiblemente varía de 1 a 5; y  $\text{R}^1$  se ha descrito anteriormente y preferentemente un grupo urea, y

-la capa externa del dendrón consiste en unidades iguales o diferentes del grupo de fórmula (I):



donde:  $\text{R}^2$  es un grupo alquilo ( $\text{C}_1-\text{C}_4$ ), preferiblemente  $\text{R}^2$  es un grupo metilo;

p es un número entero y varía entre 1 y 3, preferiblemente p es 2;

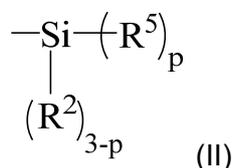
$\text{R}^3$  es el siguiente grupo  $-(\text{CH}_2)_c-\text{S}-(\text{CH}_2)_d-\text{R}^4$ ;

c representa un número entero que varía de 2 a 5; preferiblemente c es 2 ó 3;

d representa un número entero que varía de 1 a 10; preferiblemente d varía entre 1 y 5;

$\text{R}^4$  es un grupo  $-\text{NR}'\text{R}''$  o un grupo  $-\text{NR}'\text{R}''\text{R}'''$ , donde  $\text{R}'$ ,  $\text{R}''$  y  $\text{R}'''$ , representan de manera independiente un grupo alquilo ( $\text{C}_1-\text{C}_4$ ) o un hidrógeno; aún más preferiblemente  $\text{R}^4$  es un grupo  $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$  o un grupo  $-\text{NH}_3^+$ . Aún más preferiblemente c es 2 y aún más preferiblemente d es 2.

Cuando la molécula dendrítica es un dendrímero, la nanopartícula magnética puede estar también recubierta por un dendrímero carbosilano (Figura 2). Este dendrímero se encuentra heterofuncionalizado (ver por ejemplo WO 2014016460) y consiste en una capa externa, que presenta unidades del grupo de fórmula (II):



donde:  $\text{R}^2$  es un grupo alquilo ( $\text{C}_1-\text{C}_4$ ), preferiblemente  $\text{R}^2$  es un grupo metilo;

p es un número entero y varía entre 1 y 3, preferiblemente p es 2;

$\text{R}^5$  es el siguiente grupo  $-(\text{CH}_2)_c-\text{S}-(\text{CH}_2)_d-\text{R}^6$ ;

c representa un número entero que varía de 2 a 5; preferiblemente c es 2 ó 3;

d representa un número entero que varía de 1 a 10; preferiblemente d varía entre 1 y

5;

$\text{R}^6$  es un grupo  $-\text{NR}'\text{R}''$  o un grupo  $-\text{NR}'\text{R}''\text{R}'''$ , donde  $\text{R}'$ ,  $\text{R}''$  y  $\text{R}'''$ , representan de

manera independiente un grupo alquilo ( $C_1-C_4$ ) o un hidrógeno; aún más preferiblemente  $R^6$  es un grupo  $-NMe_3^+$  o un grupo  $-NH_3^+$ . Aún más preferiblemente  $c$  es 2 y aún más preferiblemente  $d$  es 2. En este caso, al menos uno de estos grupos  $R^6$  de la capa externa consiste en una unidad de la cadena anclante de fórmula  $-Si-(CH_2)_b-R^1-(CH_2)_a-$  donde el dendrímero está unido al núcleo por el átomo de Si,  $a$  es 0; y  $b$  y  $R^1$  están definidos anteriormente. Por lo tanto, este átomo de silicio presente en dicha cadena es el que ancla el dendrímero a la superficie de la NPM.

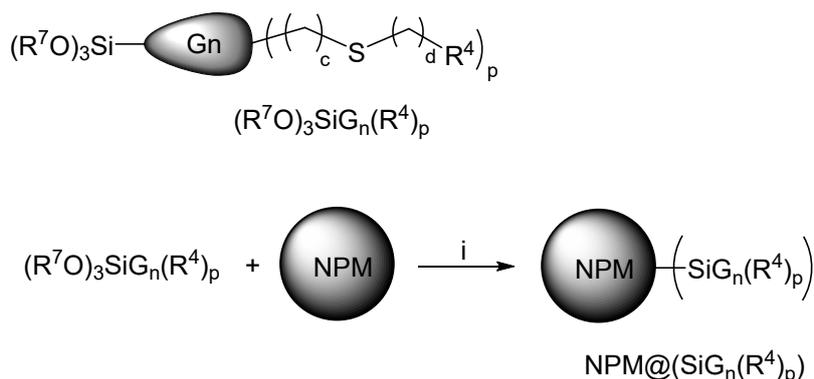
El término "alquilo" se refiere en la presente invención a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 4 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, tert-butilo o sec-butilo, preferiblemente tiene de 1 a 2 átomos de carbono, más preferiblemente el grupo alquilo es un metilo o un etilo.

El compuesto de la presente invención es preferiblemente catiónico, formado  $R^4$  o  $R^6$  por grupos amonio (por ejemplo  $-NH_3^+$  o  $-NMe_3^+$ ). Por lo tanto, la presente invención no solo incluye los compuestos por sí mismos, sino cualquiera de sus sales. Preferiblemente las sales son de halogenuro, que se pueden seleccionar entre sales de cloruro, bromuro, ioduro; u otro tipo de aniones como triflato. Preferiblemente las sales son de ioduro y cloruro.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al procedimiento de obtención de los compuestos de la invención que comprende una reacción entre los grupos hidroxilos de la superficie de las nanopartículas de  $Fe_3O_4$ , y grupos trialcoxosililos de la cadena anclante de la molécula dendrítica. La funcionalización de las NPM con las MD se realiza preferentemente por reacción entre un grupo trialcoxosililo presente en las MD y los grupos hidroxilo de la superficie de las NPM. De este modo, la cadena anclante del dendrón o del dendrímero serían del tipo  $-(CH_2)_a-R^1-(CH_2)_b-Si(OR^7)_3$ ; donde  $a$ ,  $b$  y  $R^1$  se han definido anteriormente y  $R^7$  es un grupo alquilo.

En una realización preferida del procedimiento de la invención, la reacción se lleva a cabo en presencia de un disolvente polar, preferentemente un alcohol, como por ejemplo etanol, o una mezcla de disolventes, preferentemente etanol/DMF, sin descartar otros.

La síntesis de estas NPM dendronizadas neutras o catiónicas puede representarse, de manera general, por el esquema 1. A partir de ahora los dendrones (Figura 1), se nombrarán como aparecen en este esquema.



Esquema 1. Síntesis de NPM a partir de dendrones carbosilano. i) Etanol/DMF.

donde las NPM se nombrarán simplídicamente como  $\text{NPM}@(SiG_n(R^4)_p)$ , estando formadas preferentemente por magnetita ( $Fe_3O_4$ ;  $\text{NPM} = Fe_3O_4$ ), mientras que entre paréntesis se indica el ligando estabilizador de la NP de la siguiente manera (Figuras 3-8):

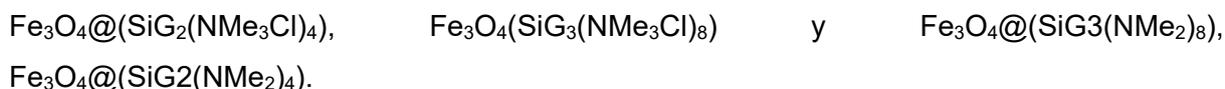
-Los dendrones neutros o catiónicos se nombran como  $SiG_n(R^4)_p$ , donde:

n indica el número de la generación G.

Si, indica que la funcionalización se realiza por reacción de las NPM con dendrímeros y dendrones que contienen una función del tipo  $-Si(OR^7)_3$

$R^4$  representa la naturaleza de los grupos funcionales situados en la periferia de las MD (preferentemente  $R^4 = NH_3^+$ ,  $NMe_2H^+$ ,  $NMe_3^+$ ,  $NH_2$ ,  $NMe_2$ ) y "p" el número de estos grupos funcionales, que va a depender de la generación dendrítica. Los compuestos  $(R^7O)_3SiG_n(R^4)_p$  empleados para la preparación de las NPM fueron descritos previamente (A. Martínez et al. Chem. Eur. J. **2015**, 21, 15651; M. Sánchez-Milla **2019**, Tesis Doctoral (UAH)).

Ejemplos de NPM de la invención que contienen dendrones se selecciona de entre:



-Los dendrímeros neutros o catiónicos se nombran de la misma manera que los dendrones, donde  $R^4$  sería  $R^6$ . Ejemplos de NPM de la invención que contienen dendrímeros serían:  $Fe_3O_4@(SiG_1(NMe_3^+)_7)$  y  $Fe_3O_4@(SiG_1(NMe_2)_7)$

Por otro lado, la obtención de NPM catiónicas de la invención se puede producir mediante una reacción de cuaternización del correspondiente grupo amino presente en las NPM neutras, que contienen grupos amino terminales, utilizando un derivado RX, sulfatos de alquilo ( $C_1-C_5$ ), triflato de metilo, o cualquiera de sus combinaciones como agente cuaternizante (donde R se selecciona de entre hidrógeno, alquilo ( $C_1-C_{24}$ ), alcohol ( $C_1-C_{24}$ ) o

un arilo, preferiblemente bencilo; y X es un halógeno, preferiblemente Cl, Br o I), como por ejemplo yoduro de metilo (MeI), HCl, cloruro de metilo, bromuro de metilo, cloruro de etilo, bromuro de etilo, cloruro de propilo, cloruro de hexilo, cloruro de dodecilo, cloruro de bencilo, bromuro de bencilo, bromuro de etanol, ioduro de etanol o cualquiera de sus combinaciones.

5 También, en el caso de compuestos funcionalizados con grupos amonio del tipo  $-NR_2 \cdot HCl$ , se neutralizan con medio básico y posteriormente se pueden cuaternizar con otros agentes alquilantes como los descritos anteriormente.

La presente invención se refiere también a los usos de las NPM dendronizadas de la presente invención descritas anteriormente que presentan grupos terminales catiónicos. Entre ellas destacan la utilización de los derivados catiónicos como agentes para atrapar microorganismos seleccionados entre bacterias, hongos o amebas, preferiblemente bacterias, tanto Gram+ como Gram-, de manera que permitan aumentar la concentración de estas para su análisis o la eliminación (purificación) del medio que las contiene.

15 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de las NPM dendronizadas de la presente invención descritas anteriormente que presentan grupos terminales catiónicos para atrapar ácidos nucleicos, de manera que permitan aumentar la concentración de estos para su análisis o la eliminación (purificación) del medio que los contiene.

20 Teniendo en cuenta la actividad microcida, y en particular biocida, de las MD incorporadas a las NPM de la invención, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de estos compuestos como agentes biocidas para aplicaciones no terapéuticas, como por ejemplo, pero sin limitarse a ellas, impedir la aparición de microorganismos en superficies.

25 Por "material nucleico" o "ácidos nucleicos" se refiere en la presente invención a un material, aislado y/o purificado, que comprende una secuencia nucleotídica y se puede seleccionar entre oligonucleotidos, ARN o ADN.

30 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. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

35

**DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

**Figura 1.** Representación de una cuña carbosilano catiónica de segunda generación  $(\text{EtO})_3\text{SiG}_2(\text{NMe}_3^+)_4$  ( $R^4 = \text{NMe}_3^+$ ,  $p = 4$ ,  $n = 2$ ,  $R^7 = \text{Et}$ ).

**Figura 2.** Representación de un dendrímero carbosilano catiónico de primera generación  $(\text{EtO})_3\text{SiG}_1(\text{NMe}_3^+)_7$  ( $R^6 = \text{NMe}_3^+$ ,  $p = 7$ ,  $n = 1$ ,  $R^7 = \text{Et}$ ).

**Figura 3.** Imagen TEM (izquierda) e histograma de distribución (derecha) de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@(\text{SiG}_2(\text{NMe}_3\text{Cl})_4)$  (tamaño promedio =  $11 \pm 3$  nm (134 NPM medidas con el programa Image J)).

**Figura 4.** Imagen TEM (izquierda) e histograma de distribución (derecha) de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@(\text{SiG}_3(\text{NMe}_3\text{Cl})_8)$  (tamaño promedio =  $11 \pm 2$  nm (103 NPM medidas con el programa Image J)).

**Figura 5.** Representación de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@(\text{SiG}_2(\text{NMe}_2)_4)$ .

**Figura 6.** Representación de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@(\text{SiG}_3(\text{NMe}_2)_8)$ .

**Figura 7.** Representación de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@(\text{SiG}_2(\text{NMe}_3\text{Cl})_4)$ .

**Figura 8.** Representación de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@(\text{SiG}_3(\text{NMe}_3\text{Cl})_8)$ .

**Figura 9.** Diagrama de retención de bacterias (*S. aureus*, izquierda; *E. coli*, derecha) con las NPM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@(\text{SiG}_2(\text{NMe}_3\text{Cl})_4)$  (G2) y  $\text{Fe}_3\text{O}_4@(\text{SiG}_3(\text{NMe}_3\text{Cl})_8)$  (G3). Este diagrama corresponde al procedimiento 2 descrito en **Capacidad de captura de bacterias de las nanopartículas magnéticas**.

**Figura 10.** Imágenes TEM de la interacción de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@(\text{SiG}_2(\text{NMe}_3\text{Cl})_4)$  (G2) con *S.aureus* (A) y *E.coli* (B) e imágenes SEM de la interacción de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@(\text{SiG}_2(\text{NMe}_3\text{Cl})_4)$  (G2) con *S.aureus* (C) y *E.coli* (D). Estas imágenes corresponden al procedimiento 2 descrito en **Capacidad de captura de bacterias de las nanopartículas magnéticas**.

**Figura 11.** Diagrama de retención de ácidos nucleicos con las NPM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@(\text{SiG}_2(\text{NMe}_3\text{Cl})_4)$  (G2) y  $\text{Fe}_3\text{O}_4@(\text{SiG}_3(\text{NMe}_3\text{Cl})_8)$  (G3).

**EJEMPLOS**

A continuación se describe la síntesis de ejemplos seleccionados de NPM funcionalizadas con dendrones carbosilano con grupos neutros y catiónicos. Estas últimas se describen con un contraión de tipo cloruro, pero sin descartar otros. Además, las estructuras de algunas NPM dendronizadas así como la imagen obtenida por microscopía electrónica (TEM) se muestran en las Figuras 3-8, y son representativas para el resto de sistemas que se describen en los siguientes ejemplos.

**Ejemplo 1.- NPM funcionalizadas con grupos neutros**

**Síntesis de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@(\text{SiG}_2(\text{NMe}_2)_4)$ .**

Una disolución de nanopartículas sin funcionalizar ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) en etanol (189 mL, 146 mg, 3.33 mM) fue sonicada durante 20 min. Posteriormente, el dendrón  $(\text{EtO})_3\text{SiG2}(\text{NMe}_2)_4$  (0.72 g, 0,631 mmol, 1 equiv) en EtOH fue añadido a la mezcla y sonicado 10 min más. La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 16 h. El producto fue lavado 5 veces con etanol, aislado mediante separación magnética y secado a vacío. Estas NPM se pueden utilizar *in situ* para la preparación de las correspondientes NPM catiónicas.

#### **Síntesis de $\text{Fe}_3\text{O}_4@(\text{SiG3}(\text{NMe}_2)_8)$ .**

Una disolución de nanopartículas sin funcionalizar ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) en etanol (171 mL, 132 mg, 3.33 mM) fue sonicada durante 20 min. Posteriormente, el dendrón  $(\text{EtO})_3\text{SiG3}(\text{NMe}_2)_8$  (1.27 g, 0,570 mmol, 1 equiv) en EtOH fue añadido a la mezcla y sonicado 10 min más. La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 16 h. El producto fue lavado 5 veces con etanol, aislado mediante separación magnética y secado a vacío. Estas NPM se pueden utilizar *in situ* para la preparación de las correspondientes NPM catiónicas.

#### **Ejemplo 2.- NPM funcionalizadas con grupos catiónicos**

##### **Síntesis de $\text{Fe}_3\text{O}_4@(\text{SiG2}(\text{NMe}_3\text{Cl})_4)$ .**

Una disolución de nanopartículas sin funcionalizar ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) en etanol (210 mL, 162 mg, 3.33 mM) fue sonicada durante 20 min. Posteriormente, el dendrón  $(\text{EtO})_3\text{SiG2}((\text{NMe}_3\text{Cl})_4)$  (1.19 g, 0,699 mmol, 1 equiv) en DMF fue añadido a la mezcla y sonicado 10 minutos más. La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 16 horas. El producto fue lavado 5 veces con agua mediante separación magnética y aislado secándolo a vacío.

Datos para  $\text{Fe}_3\text{O}_4@(\text{SiG2}(\text{NMe}_3\text{Cl})_4)$ : TGA (%): ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) 89.8, (L) 10.2. Diámetro promedio del núcleo de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ; D = 11 nm (TEM).

##### **Síntesis de $\text{NPM}@(\text{SiG3}(\text{NMe}_3\text{Cl})_8)$ .**

Una disolución de nanopartículas sin funcionalizar ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) en etanol (174 mL, 134 mg, 3.33 mM) fue sonicada durante 20 min. Posteriormente, el dendrón  $(\text{EtO})_3\text{SiG3}((\text{NMe}_3\text{Cl})_8)$  (1.96 g, 0,580 mmol, 1 equiv) en DMF fue añadido a la mezcla y sonicado 10 minutos más. La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 16 horas. El producto fue lavado 5 veces con agua mediante separación magnética y aislado secándolo a vacío.

Datos para  $\text{Fe}_3\text{O}_4@(\text{SiG3}(\text{NMe}_3\text{Cl})_8)$ : TGA (%): ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) 78.5, (L) 21.5. Diámetro promedio del núcleo de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ; D = 11 nm (TEM).

## ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS CATIÓNICAS FRENTE A BACTERIAS.

Se ha estudiado la capacidad de las NPM de la invención para capturar bacterias de tipo Gram+ (ej. *S. aureus*) y Gram- (ej. *E. coli*) en medios acuosos, la posterior elución y supervivencia de estos microorganismos. Estos estudios pueden ser aplicados a otras bacterias o microorganismos, como por ejemplo hongos o amebas.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### **Capacidad de captura de bacterias de las nanopartículas magnéticas.**

A continuación, se describen dos procedimientos seguidos para analizar la capacidad de las NPM para capturar bacterias, sin descartar otros posibles:

1) Para determinar la capacidad de captura de bacterias de las NPM, se preparó una serie de soluciones bacterianas (*S. aureus* y *E. coli*) (1mL) de diferentes concentraciones (Densidad óptica  $DO_{625}$ : 0.1-1.2). Posteriormente, se añadió 1 mg de las NPM a cada una de estas soluciones. Estas soluciones son agitadas vigorosamente durante un minuto. Posteriormente se emplea un imán externo para la separación magnética de los sistemas NPM-bacteria. La densidad óptica (DO) del sobrenadante es de nuevo medida, indicando la cantidad de bacteria que ha sido capturada por el sistema:

$$\% \text{ captura de bacterias} = [(DO \text{ control} - DO \text{ sobrenadante}) / DO \text{ control}] \times 100$$

2) Para determinar la capacidad de captura de bacterias de las NPM, se preparó una serie de soluciones de NPM de diferentes concentraciones (2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5 ppm). Posteriormente, a 750  $\mu$ L de cada una de estas disoluciones se añaden 750  $\mu$ L de una solución de bacterias (*S. aureus* y *E. coli*), cuya densidad óptica ha sido previamente medida a una longitud de onda de 625 nm ( $DO = 0.2$ ). Estas soluciones son agitadas vigorosamente durante 1 min y se mantienen incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente se emplea un imán externo para la separación magnética de los sistemas NPM-bacteria. La densidad óptica (DO) del sobrenadante es de nuevo medida y comparada con la densidad óptica de la solución sin tratar, indicando la cantidad de bacteria que ha sido capturada por el sistema (Figura 9).

$$\% \text{ captura de bacterias} = [(DO \text{ control} - DO \text{ sobrenadante}) / DO \text{ control}] \times 100$$

Para determinar la elución de las bacterias que han interactuado con las NPM y han sido capturadas, el sistema NPM-bacteria fue lavado dos veces con agua. A continuación, se añadió 1.5 mL de tampón fosfato salino (PBS) y se agitó durante 5 min. Posteriormente se

emplea un imán externo para la separación magnética de los sistemas NPM-bacteria. La densidad óptica del sobrenadante es de nuevo medida.

Para determinar la supervivencia tanto de las bacterias capturadas como de las bacterias que han quedado en el sobrenadante, 5  $\mu\text{L}$  de cada una de las soluciones son añadidos a una placa de agar PCA que es incubada a  $37^\circ\text{C}$  durante 20 horas.

### Capacidad de captura de ácidos nucleicos de las nanopartículas magnéticas.

A continuación, se describe el proceso realizado utilizando ADN bacteriano procedente de una cepa de *E. coli* (CECT434; WDCM00013), sin descartar otros procedimientos o ácidos nucleicos. 10  $\mu\text{L}$  de disolución de NPM (1000 ppm) son añadidos sobre 10  $\mu\text{L}$  de una disolución de ADN bacteriano. La mezcla se agita vigorosamente durante 2 min y se deja reposar durante un tiempo determinado (por ejemplo 10, 40 y 80 min). A continuación, se emplea un imán externo para la separación magnética de los sistemas NPM-ADN. La densidad óptica (D.O.) del sobrenadante es medida, así como un control de ADN (10  $\mu\text{L}$  ADN y 10  $\mu\text{L}$  agua). De esta manera puede calcularse el porcentaje de ADN que ha sido capturado por el sistema.

$$\% \text{ captura} = [(\text{DO sin tratamiento} - \text{DO sobrenadante}) / \text{DO sin tratamiento}] \times 100$$

## 20 RESULTADOS

### Interacción con bacterias

Como ejemplo, se analizaron 2 NPM preparadas según se describe en la invención de tipo  $\text{Fe}_3\text{O}_4@(\text{SiG}_n(\text{NMe}_3\text{Cl})_m)$  ( $n = 2, m = 4$ ;  $n = 3, m = 8$ ), funcionalizadas con dendrones de segunda y tercera generación respectivamente. Los resultados (Figura 9, método 2) muestran que en el caso de *S. aureus* la capacidad de captura de las NPM es claramente superior para la NPM de tercera generación  $\text{Fe}_3\text{O}_4@(\text{SiG}_3(\text{NMe}_3\text{Cl})_8)$ , consiguiendo porcentajes de captura del casi 100% a una concentración de 250 ppm, mientras que utilizando  $\text{Fe}_3\text{O}_4@(\text{SiG}_2(\text{NMe}_3\text{Cl})_4)$  se requiere una concentración de 1000 ppm. En el caso de *E. coli* la capacidad de ambas NPM es similar, obteniéndose porcentajes del 90% a concentraciones de 250 ppm.

Mediante la incubación de las soluciones de los sistemas NPM-bacteria, el sobrenadante, y las soluciones de elución con PBS se demostró la supervivencia de los microorganismos. Las imágenes obtenidas por TEM y SEM de los sistemas NPM-bacteria (Figura 10, método 2) muestran como las NPM recubren totalmente la superficie de las bacterias.

**Interacción con ácidos nucleicos**

Como ejemplo, se comentan los resultados obtenidos utilizando las NPM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@(\text{SiG}_2(\text{NMe}_3\text{Cl})_4)$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4@(\text{SiG}_3(\text{NMe}_3\text{Cl})_8)$  en su interacción con ADN bacteriano procedente de bacterias Gram-negativa de tipo *E. coli* (CECT434; WDCM00013). El uso de este tipo de ácido nucleico no es excluyente para otros ácidos nucleicos. Los resultados indican (Figura 11) que la retención es claramente dependiente de la generación del dendrón y del tiempo. Para el caso de la NPM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@(\text{SiG}_2(\text{NMe}_3\text{Cl})_4)$ , con un dendrón de segunda generación, solo se observa retención (en torno al 16%) a tiempos de 80 min. Sin embargo, un porcentaje próximo de retención se obtuvo para  $\text{Fe}_3\text{O}_4(\text{SiG}_3(\text{NMe}_3\text{Cl})_8)$  a los 10 min, alcanzándose un máximo de retención a los 40 min (en torno al 50%).

## REIVINDICACIONES

1. Nanopartícula magnética (NPM) recubierta de al menos una molécula dendrítica de naturaleza carbosilano y funcionalizada en su capa externa con grupos catiónicos (amonio) o neutros (amino), caracterizado por que:

-el núcleo de la nanopartícula está compuesto por  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ; y

-la molécula dendrítica se selecciona entre dendrón o dendrímero y comprende una cadena anclante de fórmula  $-\text{Si}-(\text{CH}_2)_b-\text{R}^1-(\text{CH}_2)_a-$  donde:

la molécula dendrítica está unida al núcleo por el átomo de Si,

a es un número entero que varía entre 0 a 10;

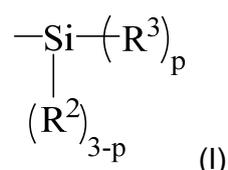
b es un número entero que varía de 1 a 10, preferiblemente varían de 1 a 5; y

$\text{R}^1$  se selecciona de entre un grupo urea, carbamato, tiocarbamato, tiourea o un grupo triazol.

2. Nanopartícula magnética según la reivindicación 1, donde la molécula dendrítica es un dendrón caracterizado por que:

-el punto focal del dendrón es la cadena anclante de fórmula  $-\text{Si}-(\text{CH}_2)_b-\text{R}^1-(\text{CH}_2)_a-$  donde: el dendrón está unido al núcleo por el átomo de Si, a es un número entero que varía entre 1 a 10, preferiblemente entre 1 y 5; y b y  $\text{R}^1$  están definidos en la reivindicación 1; y

-la capa externa del dendrón consiste en unidades iguales o diferentes del grupo de fórmula (I):



donde:  $\text{R}^2$  es un grupo alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_4$ ), preferiblemente  $\text{R}^2$  es un grupo metilo;

p es un número entero y varía entre 1 y 3, preferiblemente p es 2;

$\text{R}^3$  es el siguiente grupo  $-(\text{CH}_2)_c-\text{S}-(\text{CH}_2)_d-\text{R}^4$ ;

c representa un número entero que varía de 2 a 5; preferiblemente c es 2 ó 3;

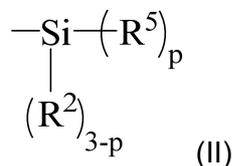
d representa un número entero que varía de 1 a 10; preferiblemente d varía entre 1 y 5; y

$\text{R}^4$  es un grupo  $-\text{NR}'\text{R}''$  o un grupo  $-\text{NR}'\text{R}''\text{R}'''$ , donde  $\text{R}'$ ,  $\text{R}''$  y  $\text{R}'''$ , representan de manera independiente un grupo alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_4$ ) o un hidrógeno.

3. Nanopartícula magnética según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde la

molécula dendrítica es un dendrímero caracterizado por que:

- la capa externa del dendrímero consiste en unidades iguales o diferentes del grupo de fórmula (II)



5 donde: R<sup>2</sup> es un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), preferiblemente R<sup>2</sup> es un grupo metilo;

p es un número entero y varía entre 1 y 3, preferiblemente p es 2;

R<sup>5</sup> es el grupo -(CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub>-R<sup>6</sup>;

c representa un número entero que varía de 2 a 5; preferiblemente c es 2 ó 3;

10 d representa un número entero que varía de 1 a 10; preferiblemente d varía entre 1 y 5;

R<sup>6</sup> es un grupo -NR'R'' o un grupo -NR'R''R''', donde R', R'' y R''' representan de manera independiente un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) o un hidrógeno, con la condición que al menos un grupo R<sup>6</sup> de la capa externa del dendrímero consiste en la cadena anclante de fórmula -Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>-R<sup>1</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>- donde el dendrímero está unido al núcleo por el átomo de Si, a es 0; y b y R<sup>1</sup> están definidos en la reivindicación 1.

15

4. Nanopartícula magnética según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, cuyo núcleo tiene una disposición de sus átomos de forma esférica, cilíndrica o de prisma, con al menos una dimensión entre 1 y 1000 nm.

20

5. Nanopartícula magnética según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde p es 2 y/o R<sup>2</sup> es un grupo metilo.

25 6. Nanopartícula magnética según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde c es 2 ó 3 y/o d es 2.

7. Nanopartícula magnética según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R<sup>1</sup> es un grupo urea.

30 8. Nanopartículas magnéticas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R<sup>4</sup> o R<sup>6</sup> son un grupo -NR'R''R'''.

9. Nanopartículas magnéticas según la reivindicación anterior, donde R<sup>4</sup> o R<sup>6</sup> son -NMe<sub>3</sub><sup>+</sup>.

10. Nanopartícula magnética según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, donde dicha nanopartícula está en forma de sal.

5

11. Procedimiento de obtención de las nanopartículas magnéticas descritas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende una reacción entre los grupos hidroxilos de la superficie de las nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, y grupos trialcoxosililos de la cadena anclante de la molécula dendrítica.

10

12. Uso de las nanopartículas magnéticas descritas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, como agente para concentrar y/o eliminar bacterias, hongos o amebas de un medio que las contenga.

15

13. Uso no terapéutico de las nanopartículas magnéticas descritas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, como biocida.

14. Uso de las nanopartículas magnéticas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, como agente para concentrar ácidos nucleicos de un medio que los contenga.

20

15. Uso de las nanopartículas magnéticas descritas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, como agente para eliminar ácidos nucleicos de un medio que los contenga.

FIG. 1

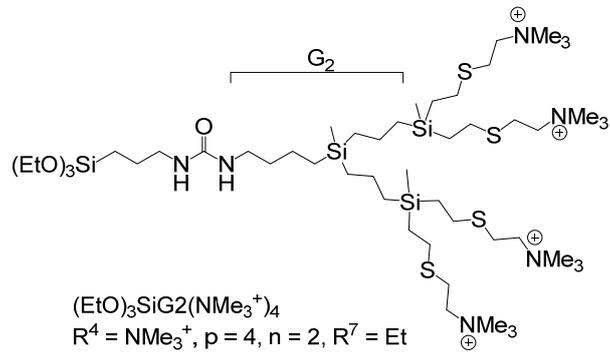


FIG. 2

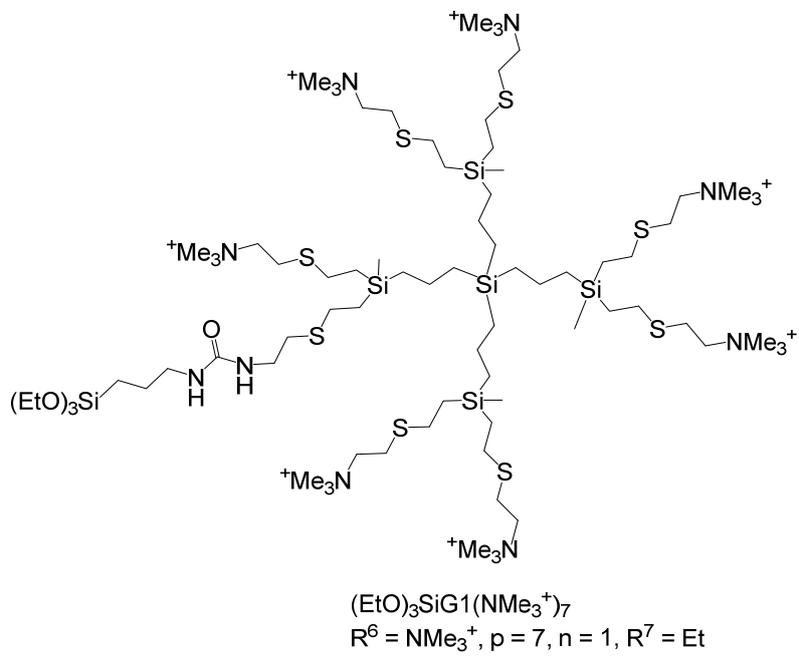


FIG. 3

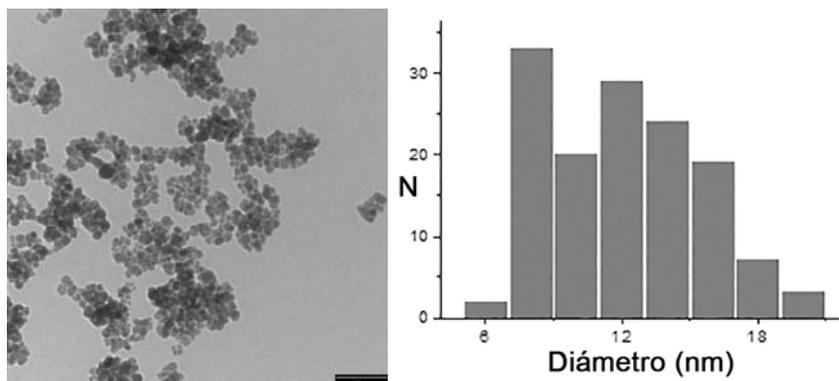


FIG. 4

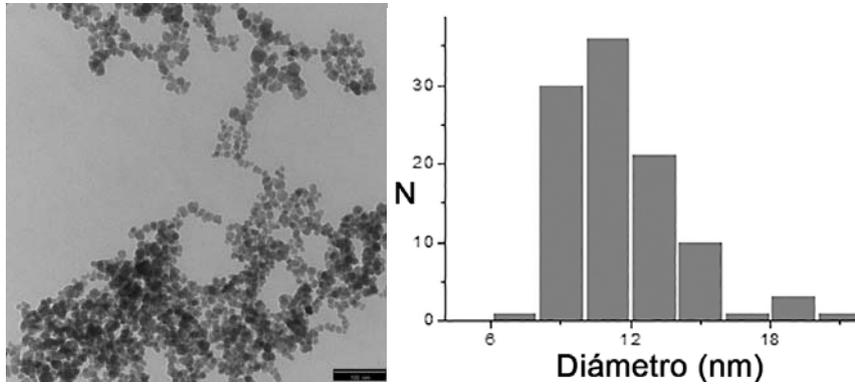


FIG. 5

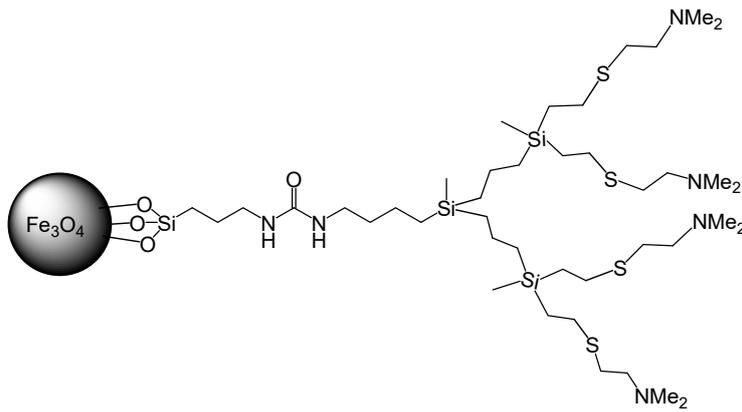


FIG. 6

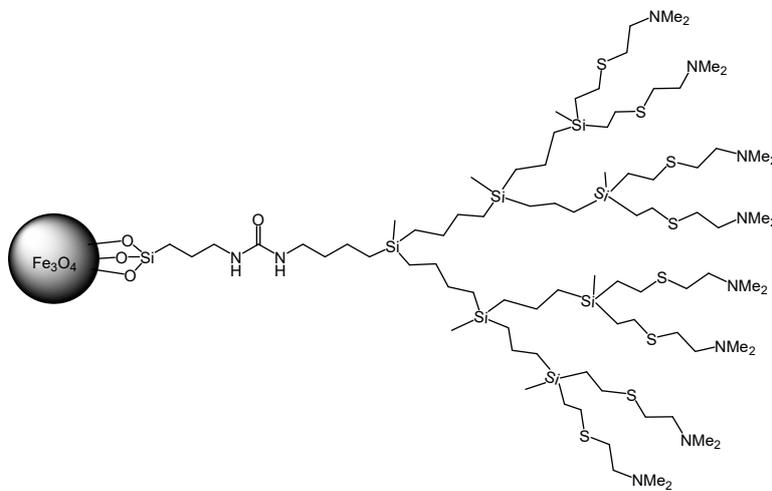


FIG. 7

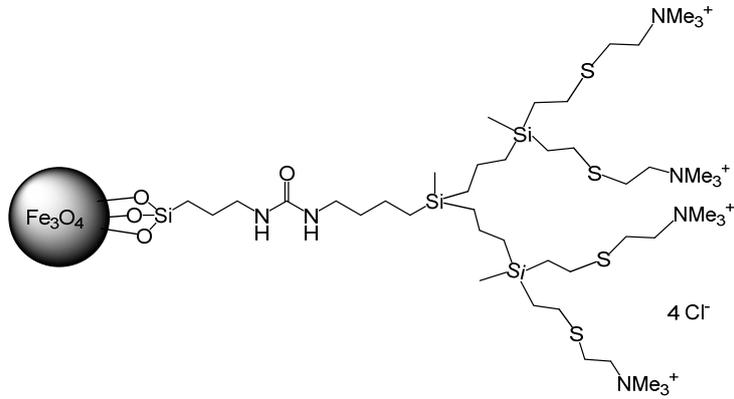


FIG. 8

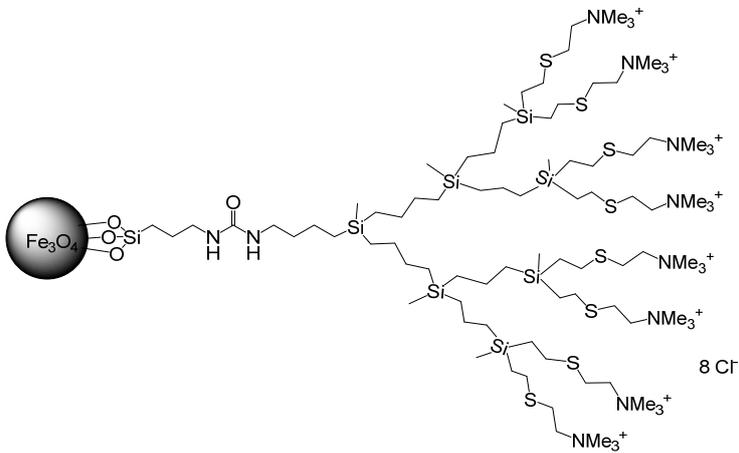


FIG. 9

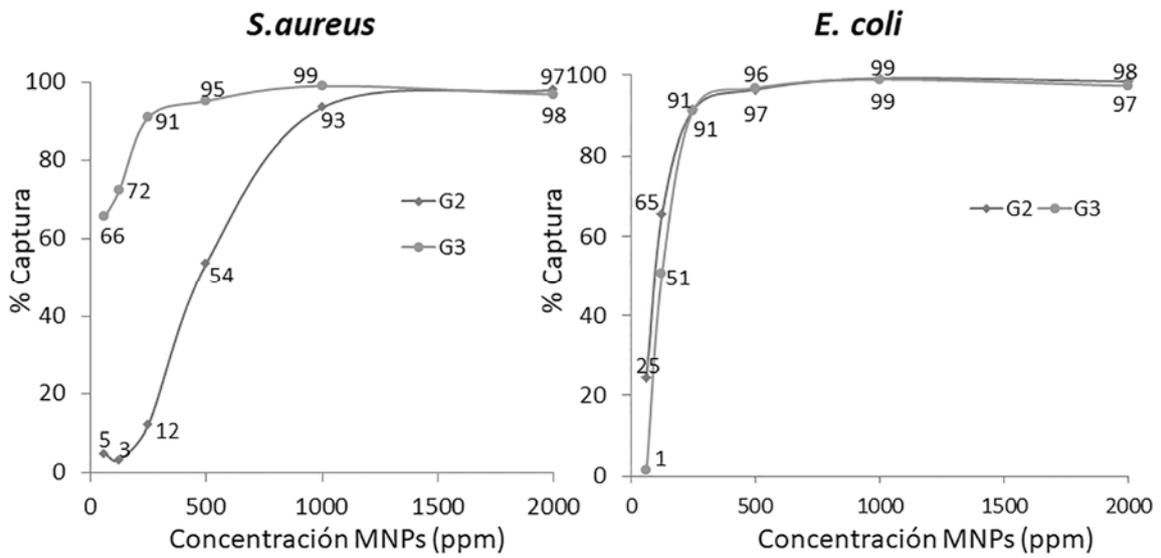


FIG. 10

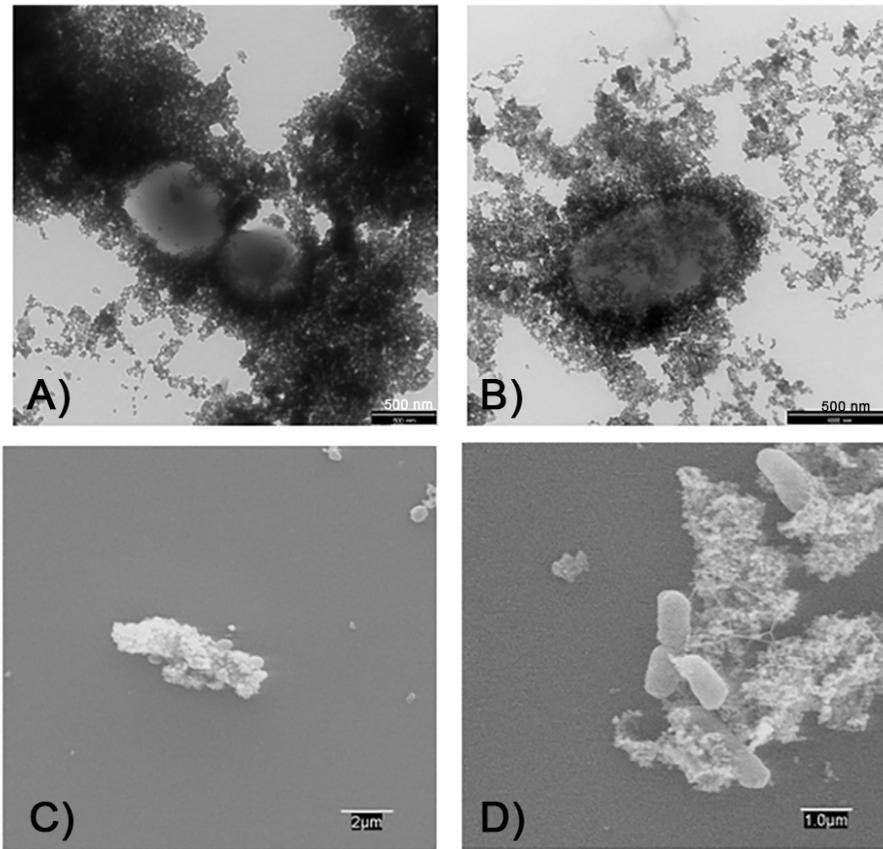
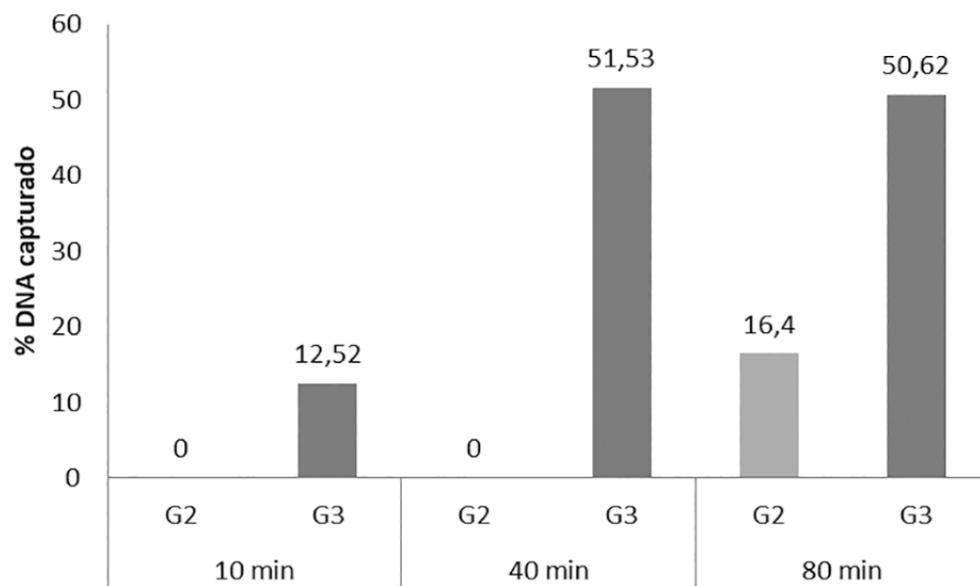


FIG. 11





- ②① N.º solicitud: 201931077  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 04.12.2019  
②③ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	GONZALEZ, B. et al. "Covalently bonded dendrimer-maghemite nanosystems: Nonviral vectors for in vitro gene magnetofection". Journal of Materials Chemistry, 2011, Vol. 21, Páginas 4598-4604, <DOI: 10.1039/C0JM03526B>. Ver resumen; página 4599, columna 1; esquema 1; experimental.	1, 4-15
Y	ABU-REZIQ, R. et al. "Magnetically Separable Base Catalysts: Heterogeneous Catalysis vs. Quasi-Homogeneous Catalysis". Applied Sciences, 2012, Vol. 2, Páginas 260-276, <DOI: 10.3390/app2020260 >. Ver resumen; apartado 3.1.	1, 4-15
Y	XU, M. et al. "Surface modified Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> nanoparticles as a protein delivery vehicle". Colloids and Surfaces. A Physicochemical and Engineering Aspects, 2009, Vol. 350, Páginas 8-12, <DOI: 10.1016/j.colsurfa.2009.08.022>. Ver resumen; figura 1.	1, 4-15
A	WO 2017046433 A1 (FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL HOSPITAL GREGORIO MARAÑÓN et al.) 23/03/2017, reivindicaciones 1-45.	1-15
A	MARTINEZ, A. et al. "Mesoporous Silica Nanoparticles Decorated with Carbosilane Dendrons as New Non-viral Oligonucleotide Delivery Carriers". A European Journal, 21/04/2017, Vol. 21, Páginas 15651-15666, ISSN 0947-6539 . Ver resumen; esquemas 1 y 2.	1-15

#### 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  
09.03.2020

Examinador  
N. Martín Laso

Página  
1/2

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07F7/02** (2006.01)

**C07F7/08** (2006.01)

**A61K9/56** (2006.01)

**A61K31/295** (2006.01)

**B82Y5/00** (2011.01)

**A61P33/00** (2006.01)

**A61P31/04** (2006.01)

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

C07F, A61K, B82Y, A61P

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXT-DB, NPL, XPESP, CAS