

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 915**

21 Número de solicitud: 201031493

51 Int. Cl.:

B82B 1/00 (2006.01)

B82B 3/00 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

B82Y 15/00 (2011.01)

B82Y 40/00 (2011.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **07.10.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **07.05.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
07.05.2012

71 Solicitante/s:
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC)
SERRANO 117
28006 MADRID, ES**

72 Inventor/es:
**PIÑOL LACAMBRA, RAFAEL;
MILLÁN ESCOLANO, ÁNGEL;
PALACIO PARADA, FERNANDO y
GABILONDO UGARTE, LIERNI**

74 Agente/Representante:
Pons Ariño, Ángel

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA EL RECUBRIMIENTO Y FUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS
MEDIANTE REACCIÓN DE MICHAEL.**

57 Resumen:

Procedimiento para el recubrimiento y funcionalización de nanopartículas mediante reacción de Michael.

La presente invención describe un procedimiento para el recubrimiento de nanopartículas para conseguir dispersiones estables de dichas partículas en un medio líquido y de su funcionalización superficial con grupos que poseen actividad física, como luminiscencia, actividad química, como capacidad catalítica, y/o actividad biológica, como capacidad de unión selectiva con un ente biológico.

ES 2 379 915 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para el recubrimiento y funcionalización de nanopartículas mediante reacción de Michael.

La presente invención se refiere a un procedimiento para el recubrimiento de nanopartículas para conseguir dispersiones estables de dichas partículas en un medio líquido y de su funcionalización superficial con grupos que poseen actividad física, como luminiscencia, actividad química, como capacidad catalítica, y/o actividad biológica, como capacidad de unión selectiva con un ente biológico.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Las aplicaciones de las nanopartículas se extienden a muchas áreas en la industria, dado que presentan muchas y diversas ventajas respecto a materiales macroscópicos y microscópicos. En materiales estructurales, como cerámicas y composites, mejoran las prestaciones mecánicas. En materiales funcionales ofrecen prestaciones únicas y capacidad de modulación basadas en el hecho de que las propiedades físicas de los materiales (eléctricas, magnéticas, ópticas, químicas, biológicas, estéricas, etc.) cambian cuando su tamaño entra en la escala nanométrica y esta variación se produce de forma gradual al ir disminuyendo el tamaño. En sus aplicaciones las nanopartículas se presentan en forma masiva, en películas, en polvos, dispersas en un fluido o en aerosoles. Una de las primeras aplicaciones en el campo de la biomedicina fue en el área de la biotecnología en los años 70 como transportadores de enzimas y luego en separación, purificación, análisis, biocatálisis y bioprocesado (Magnogel, Dynabeads y Estapor). Sobre los años 80 empezaron a usarse como agentes de contraste en imagen por resonancia magnética (MRI). Y más recientemente se han descrito una gran variedad de utilidades tales como administración dirigida de drogas, inmunoensayos, biología molecular, purificación de ácidos nucleicos ADN, separación celular, terapia mediante hipertermia, y otras. En cuanto a sus aplicaciones industriales de suspensiones de nanopartículas, se ha descrito su utilidad en impresión magnética, tintas magnéticas, lubricación y sellado en sistemas de vacío, sistemas de amortiguación, sensores magnéticos, actuadores, recuperación de metales y purificación de aguas, y otras. Estas aplicaciones se basan en su alta superficie específica, en su capacidad para atravesar barreras biológicas, capacidad de adsorción de iones, y principalmente en sus exclusivas propiedades magnéticas, ópticas y eléctricas que sólo aparecen en el nivel nanométrico tales como superparamagnetismo, magnetoresistencia, anisotropía magnética, luminiscencia, etc.

Existen varios tipos de suspensiones de nanopartículas orgánicas e inorgánicas con aplicaciones tecnológicas. En los últimos tiempos se ha despertado un gran interés por el uso de suspensiones acuosas de nanopartículas magnéticas y entre ellas las de óxidos de hierro son altamente atractivas por su biocompatibilidad y por su utilidad en aplicaciones biomédicas [Laurent, S. *Chem. Rev.* 2008, 108, 2064]. El primer requisito en la fabricación de estas suspensiones es lograr la estabilidad de las mismas. Un segundo punto es la incorporación de una o varias funcionalidades en la superficie de las partículas. Para ambas cosas es necesario recubrir las nanopartículas con el material adecuado. Existen varias estrategias para el recubrimiento de nanopartículas que se pueden clasificar según el tipo de compuestos usados en el recubrimiento como sigue:

- 1) Recubrimientos que contienen silicio. Es la técnica más utilizada, se basa en el uso de precursores organosilanos y consiste en la adsorción de estos en la superficie y su posterior hidrólisis para formar capas de silicio u organo-sílice, que a su vez se pueden activar por reacción con compuestos alcoxisilanos funcionalizados [WO2008/058678]. En [US6514481, Prasad] se describen nanopartículas de óxido de hierro recubiertas de sílice a la que se une un péptido mediante un espaciador y en la solicitud de patente WO2006/055447 se describe un procedimiento similar para realizar recubrimientos de organo-sílice funcionalizados con oligonucleótidos. Un sistema muy utilizado en el recubrimiento de partículas que consiste en realizar la hidrólisis de los precursores organosilanos en el seno de micelas [US2007110816].
- 2) Recubrimientos poliméricos. En esta técnica el recubrimiento se realiza bien por combinación de las nanopartículas con polímeros solubles en el medio líquido, y sintetizados previamente, que contienen grupos funcionales capaces de interaccionar con la superficie de las partículas de forma que las partículas quedan encapsuladas en el interior del polímero; o bien por adsorción de monómeros o de iniciadores de polimerización y posterior polimerización in situ, normalmente en el seno de sistemas micelares. Polímeros ampliamente usados en recubrimiento de nanopartículas son el dextrano [US4452773], proteínas [US2010/0029902], alginatos; y polímeros sintéticos como poliestirenos funcionalizados, polipirrol, polímeros fenólicos, polímeros de ácidos carboxílicos [WO2005/112758], copolímeros bloque [Sohn et al. *J. Appl. Polym. Sci.* 2004, 91, 3549], polietileniminas [WO2009/135937] y otros. Una de las técnicas preferidas para aumentar la estabilidad del recubrimiento consiste en el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas [WO2003/005029]. También se han descrito procedimientos para recubrir nanopartículas con una doble capa orgánica en los que la unión entre las dos capas se realiza mediante enlaces amida [US2008/0226895]. La funcionalización se puede llevar a cabo por absorción física de un segundo polímero como en [US2003185757], en un primer polímero, el carboxidextrano, se utiliza como estabilizador y un segundo polímero, carboxidextrano funcionalizado con enzimas, se usa para añadir la funcionalidad. Un procedimiento que permite el recubrimiento biocompatible y la funcionalización de nanopartículas consiste en el uso de proteínas barnase y barstar, pero su alto coste puede limitar su aplicación [Nikitin et al. *Proc. Nat. Acad. Sci.* USA 2010 (/doi/10.1073/pnas.1001142107)]. También se han descrito procedimientos de

recubrimientos de nanopartículas con polímeros en aerosoles [US2009/0252965] y en fluidos supercríticos [WO2004/091571].

- 3) Otra estrategia utiliza compuestos de bajo peso molecular con grupos capaces de unirse a la superficie de la partícula unidos a residuos con afinidad por el solvente. Por ejemplo, en la patente WO 03/016217 se recubren nanopartículas metálicas y en particular de óxidos metálicos con derivados de ácido fosfórico, ácido fosfónico o fosfinas. Sin embargo es más habitual utilizar como recubrimiento moléculas anfífilas que pueden disponerse en forma de capas sencillas o dobles, como por ejemplo en [Shen et al. *Langmuir*, 2000, 16, 9907] aunque en este caso las suspensiones solo son estables a pH superior a 7,4.

Por otra parte, también se han descrito métodos mecánicos para recubrir nanopartículas [WO2008/074087], aunque el control de la estructura y espesor del recubrimiento que permiten estas técnicas es insuficiente para algunas aplicaciones.

La funcionalización de nanopartículas, es decir el anclaje de agentes activos, se realiza, en la mayoría de los procedimientos existentes, sobre la superficie de la capa estabilizadora una vez recubierta la nanopartícula con dicha capa. Esta estrategia acarrea algunos inconvenientes como procesos de purificación y limitaciones en las condiciones de reacción para evitar la agregación o el deterioro de la capa estabilizadora o de la propia funcionalidad a añadir. La funcionalización se puede llevar a cabo por adsorción electrostática [Wang et al. *IEEE Trans. Nanotech* 2009, 8, 142] pero es preferible realizarla mediante enlaces covalentes a través de un espaciador que conecta la superficie de la partícula con el agente activo [Georgelin et al. *J Nanopart Res* 2010, 12, 675]. Un procedimiento versátil se basa en la unión específica entre streptavidina y biotina, aunque su coste es elevado y requiere el uso de agentes activos biotinados.

Por otro lado, la reacción de Michael se ha utilizado en la preparación de materiales masivos como en la hidrofiliación de superficies de artículos poliméricos, en especial lentes de contacto [US2008/0003259], en la fabricación de hidrogeles, en el curado de silanos [WO2006/087079], en la fabricación de materiales laminados, en la síntesis de productos farmacéuticos [US2008/0213249], y en la producción de lacas, y adhesivos.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un procedimiento de obtención de nanopartículas recubiertas y funcionalizadas, al uso de dichas nanopartículas obtenidas por dicho procedimiento para formar dispersiones estables en un medio líquido, proporciona también las dispersiones estables y además el uso de dichas dispersiones en biomedicina.

El procedimiento de la invención se basa en la utilización de la reacción de Michael. En esta invención la reacción de adición de Michael se utiliza para recubrir nanopartículas con capas solvables por un líquido de forma que sean estables en suspensión en dicho líquido y para añadir agentes activos en la superficie de dichas nanopartículas.

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de nanopartículas recubiertas y funcionalizadas mediante reacción de Michael que comprende las etapas:

- reacción de al menos una nanopartícula con un reactivo que comprende un donador (B) o un aceptor (C) de Michael, y
- reacción del producto obtenido en (a) con un reactivo que comprende un aceptor (C) o donador (B) de Michael.

Si en la etapa (a) el reactivo es un donador (B) en la etapa (b) el reactivo es un aceptor (C) o viceversa.

El término "reacción de Michael" en la presente invención engloba los conceptos de reacción de Michael, adición de Michael, y reacción tipo Michael conocidos por cualquier experto en la materia. Por tanto, se entiende por "reacción de Michael" en la presente invención a la adición 1, 4 de un carbanión estabilizado por resonancia o de nucleófilos de nitrógeno, azufre u oxígeno (donador de Michael, B) a un sistema insaturado conjugado con un grupo atractor de electrones (aceptor de Michael, C).

Se entiende por "nanopartículas" en la presente invención a partículas orgánicas, inorgánicas o híbridas orgánico-inorgánicas que tienen un tamaño entre 1 nm y 100 nm.

Preferiblemente la nanopartícula se selecciona de entre metal óxido de metal o cualquiera de sus combinaciones, más preferiblemente el óxido de metal es un óxido de hierro.

En una realización preferida el reactivo de la etapa (a) además comprende un espaciador R₁, siendo en una realización más preferida R₁ un compuesto orgánico.

En otra realización preferida el reactivo de la etapa (b) además comprende un espaciador R₂. En una realización más preferida R₂ es un compuesto orgánico que comprende grupos solvables en un líquido.

- 5 Preferiblemente el reactivo de la etapa (a) de la invención además comprende un grupo de unión (A) que se selecciona de entre un catión, un anión, precursor alcoxilano, tiol, alcohol, alcóxido, carboxilato, anhídrido carboxílico, fosfato, polielectrolito, imina, nitrilo, azida, amina, amida, fosfina o cualquiera de sus combinaciones. Más preferiblemente el catión es una amina cuaternaria. Y más preferiblemente el anión se selecciona de entre un grupo carboxilato, sulfato, fosfato o cualquiera de sus combinaciones. Este grupo de unión (A) asegura la unión directa a la nanopartícula, de forma que no quede simplemente absorbido físicamente, confiriéndole mayor estabilidad.
- 10 En una realización preferida el reactivo donador de Michael (B) se selecciona de la lista que comprende: β -dicetona, éster malónico, β -cetoéster, β -cetonitrilo, nitro, amino, ácido malónico, enamina, amina primaria, amina secundaria, amina terciaria, imina, hidracina, guanadina, alcohol, tiol, fosfina, metileno, carbinol, organometálico, haluro y cualquiera de sus combinaciones.
- 15 En una realización preferida el reactivo aceptor de Michael (C) se selecciona de la lista que comprende: enón conjugado, carbonilo, ciano, carboxílico, carboxilato, sulfonilo, aldehído, éster, nitrilo, nitro insaturado, carboxilato, acrilato, acrilamida, metacrilato, metacrilamida, acrilonitrilo, vinilcetona, vinilsulfona y cualquiera de sus combinaciones.
- 20 Preferiblemente el reactivo de la etapa (b) del procedimiento de la invención además comprende al menos un residuo orgánico o inorgánico (D) con funcionalidad física, química o biológica.
- Más preferiblemente el residuo orgánico o inorgánico (D) con funcionalidad física se selecciona de entre fluoresceína, rodamina, complejo de tierra rara, puntos cuánticos ("quantum dots") o cualquiera de sus combinaciones.
- Más preferiblemente el residuo orgánico o inorgánico (D) con funcionalidad química se selecciona de entre un catalizador o un absorbente. Y aún más preferiblemente el catalizador es un compuesto de coordinación de rodio.
- 25 En una realización más preferida el residuo orgánico o inorgánico (D) con funcionalidad biológica se selecciona de entre un compuesto con capacidad catalítica, con capacidad de reconocimiento, con capacidad curativa o cualquiera de sus combinaciones. En una realización aún más preferida el compuesto con capacidad catalítica es una enzima. El compuesto con capacidad de reconocimiento puede seleccionarse de entre anticuerpos, oligonucleótidos o cualquiera de sus combinaciones. Y en otra realización aún más preferida el compuesto con capacidad curativa es un fármaco.
- 30 Preferiblemente las etapas (a) y/o (b) se llevan a cabo en condiciones de temperatura de entre 10 y 70°C.
- 35 El procedimiento propuesto en esta invención ofrece varias ventajas sobre los procedimientos preexistentes que en su conjunto suponen un gran avance sobre el estado de la técnica.
- La presente invención permite la estabilización de nanopartículas en un medio líquido mediante el recubrimiento de la superficie de las nanopartículas con residuos que son solvables en este medio. La unión de los residuos solvables a la superficie de las partículas se produce mediante enlaces covalentes lo que asegura una gran estabilidad del recubrimiento. Además, estos residuos pueden cumplir otra funcionalidad que la mera estabilización, como el control de la reactividad superficial de las nanopartículas. Este concepto se ejemplifica, sin limitar el alcance de esta invención, con la utilización de recubrimientos que contienen residuos de polietilenglicol, PEG, que además de permitir la estabilización de las nanopartículas en agua, reduce la adherencia de proteínas a las partículas.
- 40 En cuanto a la funcionalización, el procedimiento de la invención es una verdadera plataforma sintética de nanopartículas ya que permite añadir varias funcionalidades físicas, químicas y biológicas en una misma nanopartícula.
- Otra de las ventajas consiste en que permite una alta densidad de recubrimiento lo que confiere una mayor estabilidad a la suspensión.
- 45 Otra de las ventajas sobre el estado de la técnica que aporta esta invención es la capacidad de controlar la cantidad de grupos funcionales en la superficie de cada partícula de una forma sencilla mediante el uso de distintas proporciones de residuos funcionalizados y sin funcionalizar.
- Otra gran ventaja sobre otras técnicas que permiten el anclaje de funcionalidades mediante enlaces covalentes es que en esta invención la reacción de anclaje se lleva a cabo en condiciones muy suaves lo que permite realizar funcionalizaciones con agentes activos fácilmente degradables.
- 50 Otra gran ventaja sobre los métodos de funcionalización basados en compuestos biológicos es la sencillez de aplicación.
- Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a la nanopartícula recubierta y funcionalizada obtenible por el procedimiento de la invención.

En un tercer aspecto la presente invención se refiere al uso de las nanopartículas descritas anteriormente, para la fabricación de productos que se seleccionan de la lista que comprende: cosméticos, pinturas, tintes, catálisis, depuración de aguas y biomedicina. Ya que dichas nanopartículas pueden formar dispersiones estables.

5 El procedimiento de la invención permite la funcionalización sobre la partícula ya estabilizada con la capa protectora, pero va más allá al permitir la unión de la molécula funcional al residuo que compone la capa protectora previamente al recubrimiento. De esta forma se facilita la purificación y se eliminan las restricciones en las condiciones de reacción impuestas por la estabilidad de la suspensión.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una dispersión de las nanopartículas recubiertas y funcionalizadas según se ha descrito anteriormente en un medio líquido, también denominado líquido madre.

10 Se entiende por "líquido madre" en la presente invención a una disolución en un solvente de tipo acuoso u orgánico, que puede contener o no aditivos como compuestos iónicos, neutros o anfifílicos. El líquido madre puede ser agua o bien un líquido fisiológico.

En una realización preferida el medio líquido de dispersión se selecciona de entre acuoso, orgánico o cualquiera de sus combinaciones.

15 El procedimiento de la invención permite la preparación de dispersiones denominadas ferrofluidos, entendiendo como tales suspensiones estables de nanopartículas magnéticas. En una realización más preferida de esta invención, además, las nanopartículas son de óxido de hierro magnético y tienen propiedades superparamagnéticas, como se muestra en el ejemplo 6.

20 A su vez el procedimiento de la invención permite la preparación de suspensiones de nanopartículas multifuncionales.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la dispersión descrita anteriormente, para la fabricación de productos que se seleccionan de la lista que comprende: cosméticos, pinturas, tintes, catálisis, depuración de aguas y biomedicina.

25 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 dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30 **Fig. 1.** ^1H -RMN (D_2O , 400 MHz). Espectro correspondiente al producto final obtenido según el ejemplo 1. En la parte superior izquierda se muestra una ampliación de la zona del espectro correspondiente a 3,07-3,27 ppm. El triplete observado a 3,12 ppm pertenece a los protones denotados como H_1 en la figura $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2)$ y que corresponden a la amina de partida $\text{MeOPEG}_{350}-\text{NH}_2$. El triplete observado a 3,23 ppm se asigna a los protones denotados como H_1' en la figura $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_3)$ y que corresponden al producto de reacción entre el grupo amino de $\text{MeOPEG}_{350}-\text{NH}_2$ y metil acrilato mediante adición de tipo Michael. La relación de intensidades entre ambas señales indica una conversión del 50%.

Fig. 2. Distribución de diámetros hidrodinámicos de suspensiones de nanopartículas antes de recubrir (FFa) fabricadas según el ejemplo 2, después de recubrir con ácido acrílico (FFa@Acr) según el ejemplo 3, y después de un segundo recubrimiento con n-amino polietilenglicol (FFa@Acr@PEG-NH₂) según el ejemplo 3.

40 **Fig. 3.** ^1H -RMN (D_2O , 400 MHz). Espectro correspondiente a una muestra, fabricada según el ejemplo 4, extraída después de 20 horas de reacción a temperatura ambiente. En la parte superior izquierda se muestra una ampliación de la zona del espectro correspondiente a 4-4,35 ppm. El triplete observado a 4,27 ppm pertenece a los protones denotados como H_1 en la figura $(\text{CH}_2=\text{CH}(\text{O}=\text{C})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-)$ y que corresponden al acrilato de partida MPEGA_{454} . El singlete ancho observado a 4,21 ppm se asigna a los protones denotados como H_1' en la figura $(-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{O}=\text{C})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-)$ y que corresponden al producto de reacción entre los grupos amino del polímero y el acrilato de partida mediante adición de tipo Michael. La relación de intensidades entre ambas señales indica una conversión del 27%.

50 **Fig. 4.** La figura muestra el Espectro FT-IR correspondiente al producto obtenido mediante la adición de Michael entre PVam y MeOPEGA_{454} , fabricado según el ejemplo 4, tras 20 horas de reacción (línea continua) y el espectro del producto de partida MeOPEGA_{454} (línea discontinua). En la esquina inferior izquierda se presenta una ampliación de la zona correspondiente a 1050-750 cm^{-1} . En la ampliación se puede observar la desaparición de la banda a 810 cm^{-1} correspondiente a la vibración de flexión (fuera del plano) del grupo vinílico en el espectro del producto final y si presente en el espectro del producto de partida. La ausencia de esta banda confirma la reacción de adición entre los grupos amino del polímero y el acrilato.

Fig. 5. Distribución de diámetros hidrodinámicos de suspensiones de nanopartículas antes de recubrir (FFa) fabricadas según el ejemplo 2, después de recubrir con polivinilamina (FFa@PVAm) según el ejemplo 5, y después de un segundo recubrimiento con polietilenglicolacrilato (FFa@PVAm@PEG-A) según el ejemplo 5.

Fig. 6. Imágenes TEM de la suspensión de nanopartículas recubiertas con polivinilamina (FFa@PVAm) según el ejemplo 6, y después de un segundo recubrimiento con polietilenglicolacrilato metilfluoresceína (FFa@PVAm@MeFluPEG-A) en un tampón fisiológico a pH=7,40 (PBS) fabricadas en el ejemplo 6.

Fig. 7. Variación de la susceptibilidad ac, a) en fase (χ'), b) fuera de fase (χ'') en un campo magnético alterno de suspensiones de nanopartículas antes de recubrir (FFa) y c) y d) después de recubrir con polietilenglicolacrilato metilfluoresceína (FFa@PVAm@MeFluPEG-A) en un tampón fisiológico a pH=7,40 (PBS) fabricadas en el ejemplo 6.

Fig. 8. Imágenes de microscopía óptica de fluorescencia obtenidas mediante la técnica de imagen estructurada de una célula de musculatura lisa de aorta de rata cultivada en un medio que contiene el ferrofluido FFa@PVAm@MeFluPEG-A; (a) los puntos brillantes corresponden a las nanopartículas funcionalizadas y aparecen en verde en la imagen en color, (b) los puntos brillantes corresponden a los lisosomas marcados con lysotracker (Molecular Probes-Invitrogen) y aparecerían en rojo en la imagen en color, (c) imagen mezcla en la que los puntos brillantes, de mayor intensidad que en las imágenes (a) y (b) que corresponderían con coloración amarillo-naranja en la imagen en color, coinciden en el mismo campo visual de las nanopartículas internalizadas y de los lisosomas mostrados en las imágenes (a) y (b) respectivamente. Los núcleos aparecen en azul en las imágenes.

Fig. 9. Gráfica de dispersión de las emisiones de las nanopartículas funcionalizadas, eje x, y de los lisosomas marcados con una sustancia fluorescente, eje y, en el cultivo celular cuya imagen se muestra en la figura 8.

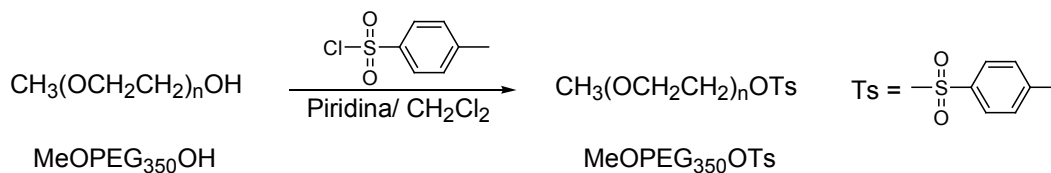
EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la especificidad y efectividad del procedimiento de la invención para la síntesis de nanopartículas recubiertas y funcionalizadas, así como la dispersión en medio líquido de dichas nanopartículas.

Ejemplo 1.

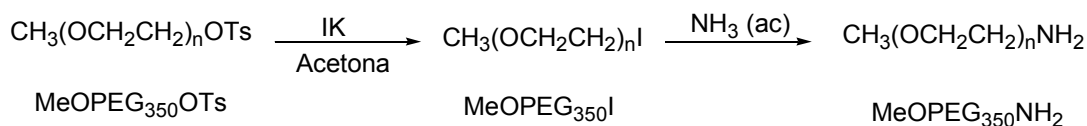
En este ejemplo se ilustra como un reactivo X que contiene un grupo de anclaje o unión A, en este caso un grupo carboxilato, y un aceptor de Michael C, en este caso un doble enlace conjugado con un carboxilato, es capaz de reaccionar mediante adición de Michael con un reactivo Y que contiene un donador de Michael B, en este caso un grupo $-NH_2$, y un residuo hidrofílico, en este caso polietilenglicol, a temperatura ambiente y en condiciones de pH suaves, próximas a pH fisiológico, pH: 7,53, con un rendimiento de al menos un 50%.

Síntesis de MeOPEG₃₅₀OTs



En un matraz de 3 bocas de 250 ml cargado con un agitador magnético se añaden 120 ml de diclorometano anhidro, 21,02 g de metoxipolietilenglicol (MeOPEG₃₅₀OH, Mn: 350 Da, Aldrich, 60 mmol) y 9,7 ml de piridina (120 mmol). Sobre la disolución resultante se añaden 23,34 g de cloruro de tosilo (120 mmol) lentamente, bajo atmósfera de argón y con agitación. La mezcla se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 70 horas, se filtra y se vierte sobre 60 ml de agua destilada fría. Se separa la fase orgánica y se lava sucesivamente con 60 ml de una disolución acuosa de piridina al 25% v/v, luego con 60 ml de agua destilada fría, posteriormente con dos fracciones de 60 ml de ácido clorhídrico 6N frío y finalmente con dos fracciones 60 ml de agua destilada fría. La fase orgánica se seca sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtra y finalmente se evapora el disolvente en el rotavapor obteniéndose 26,46 g (52,5 mmol) de aceite incoloro. Rendimiento: 88%.

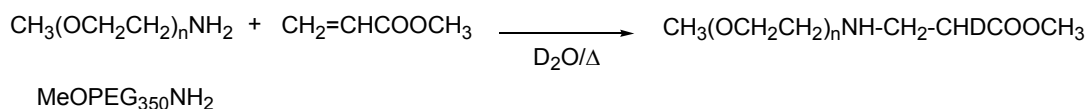
Síntesis de MeOPEG₃₅₀-NH₂.



En un matraz de tres bocas de 250 ml cargado con un agitador mecánico y equipado con un refrigerante se añaden 17,76 g de ioduro de potasio (107 mmol) sobre una disolución de 25,21 g de metoxipolietilenglicol tosilo (MeOPEG₃₅₀OTs, 50 mmol) obtenido en el ejemplo 1 en 90 ml de acetona. La mezcla se calienta a reflujo (70°C)

durante 24 horas. Tras enfriar a temperatura ambiente, se filtra y se evapora el disolvente en el rotavapor obteniéndose un aceite amarillo viscoso. El producto es utilizado en el siguiente paso sin purificación adicional. En un matraz de 1L de dos bocas cargado con un agitador magnético se añade el ioduro metoxipoli(etilenglicol) (MeOPEG₃₅₀I) obtenido en el paso anterior (aprox. 50 mmol) disuelto en 25 ml de agua destilada gota a gota mediante embudo de adición sobre 375 ml de amoníaco acuoso (25%, 6 moles) bajo atmósfera de argón. Tras 5 días de agitación a temperatura ambiente, la reacción se da por terminada. El producto de la reacción se extrae con 3 fracciones de 125 ml de diclorometano, las fases orgánicas combinadas se filtran a través de papel, se secan sobre sulfato de magnesio anhidro y el disolvente es evaporado en el rotavapor obteniéndose 19,05 g de un aceite amarillento. El crudo se disuelve en 50 ml de éter dietílico, tras añadir 50 ml de n-hexano y agitar la mezcla se guarda en el congelador. Al día siguiente la mezcla se separa por decantación separándose el aceite precipitado en el fondo del matraz y el disolvente sobrenadante. Tras evaporar el sobrenadante se obtienen 10,83 g de aceite incoloro (31 mmol).

Reacción de Acrilato y MeOPEG₃₅₀-NH₂ mediante adición de Michael



En un matraz de una boca de 20 ml se disuelven 316 mg de MeOPEG₃₅₀NH₂ (0,9 mmol) obtenido en el ejemplo 2 en 5 ml de D₂O, se ajusta el pD de la disolución a 7,53 mediante a adición de DCl diluido con D₂O en proporción 1:20 v/v. Sobre la disolución incolora y transparente se añaden 81 µl de acrilato de metilo (Aldrich, 0,9 mmol) y la mezcla se mantiene en agitación durante 88h a temperatura ambiente. Se analiza la disolución resultante mediante resonancia magnética nuclear de protones (¹H-RMN) calculándose una conversión del 50% (Figura 1). El FT-IR del sólido obtenido tras lavar la fase acuosa con 10 ml de diclorometano y evaporar en el rotavapor confirma que el producto obtenido corresponde al producto resultante de la adición de tipo Michael de los grupos amino del polímero con el acrilato.

Ejemplo 2. Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro

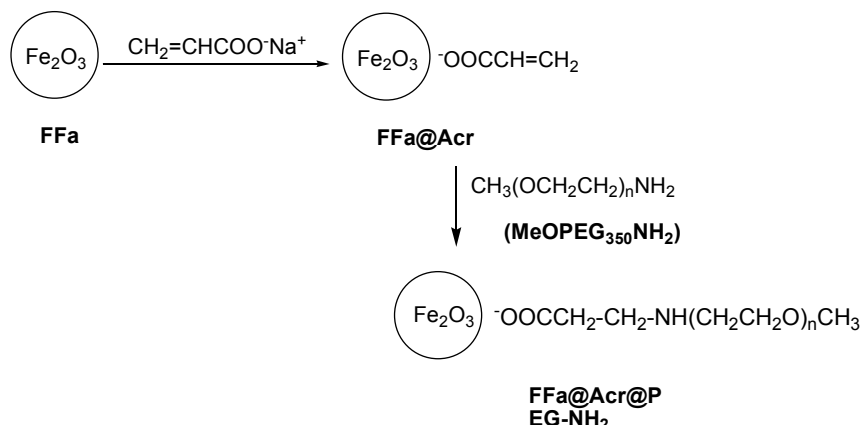
En este ejemplo se prepara una dispersión de nanopartículas en medio acuoso.

Las nanopartículas de óxido de hierro se prepararon por hidrólisis básica de una disolución de FeCl₂/FeCl₃ en agua siguiendo el procedimiento descrito en [Kang et al, *Chem. Mater.* 1996, 8, 2209] con algunas modificaciones, utilizando reactivos suministrados por Aldrich. A 25 ml de una disolución que contiene 3,137 g de FeCl₂·4H₂O, 5,200 g de FeCl₃ y 0,85 ml de HCl conc. se le añaden gota a gota 250 ml de una disolución de NaOH 1,5 M bajo agitación magnética. La suspensión resultante se mantiene bajo agitación durante 30 min, y se separa el precipitado por decantación magnética. Se lava el precipitado dos veces mediante dispersión en agua, centrifugación y redispersión; y luego se dispersa finalmente en 300 ml de una disolución de HCl 0,01 M para dar una suspensión estable con pH=1,6 y una concentración de 1,74 g/l en Fe₂O₃, que denominaremos **FFa**. La distribución de tamaños hidrodinámicos medida por dispersión dinámica de luz (DLS) con un equipo Nanosizer ZS de Malvern se muestra en la figura 2. El diámetro hidrodinámico promedio es de 13 nm.

Ejemplo 3.

En este ejemplo se ilustra el recubrimiento de nanopartículas dispersadas en agua con residuos hidrofílicos mediante adición de Michael y la obtención de suspensiones de nanopartículas estables a pH fisiológico (pH=7,4) mediante un proceso que incluye el recubrimiento de las partículas con un aceptor de Michael y la posterior reacción con un donador de Michael que contiene residuos hidrofílicos.

Recubrimiento de nanopartículas con Acrilato y MeOPEG₃₅₀-NH₂ y mediante adición de Michael

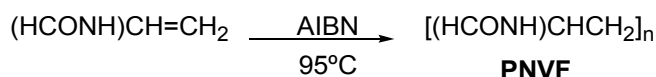


Sobre 10 ml de **FFa** sintetizada en el ejemplo 2 se añaden 72,71 mg de acrilato de sodio ($\text{CH}_2=\text{CHCOO}^-\text{Na}^+$, 0,75 mmol) con agitación. Tras agitar la mezcla durante 30 minutos se obtiene una suspensión de nanopartículas con pH: 4,17 que denominaremos ferrofluido **FFa@Acr**. Sobre esta suspensión se añaden 262 mg de metoxipoli(etilenglicol) amino ($\text{MeOPEG}_{350}\text{NH}_2$, Mn:349, 0,75 mmol) con lo que el pH de la suspensión alcanza el valor de 8,90. Tras agitar durante 30 minutos el pH de la suspensión se ajusta a pH: 7,42 añadiendo lentamente HCl 0,25 M. La suspensión se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora, se somete a ultrasonidos durante 4 minutos y se filtra a través de un filtro Millex®-GS MF (Millipore) de 0,22 μm para obtener una suspensión de nanopartículas que denominaremos ferrofluido **FFa@Acr@PEG-NH₂**. En la figura 2 se muestran las distribuciones de diámetros hidrodinámicos de los ferrofluidos **FFa@Acr** y **FFa@Acr@PEG-NH₂** medida por dispersión dinámica de luz (DLS) con un equipo Nanosizer ZS de Malvern. Se observa claramente un desplazamiento regular de la distribución de tamaños al pasar de **FFa** a **FFa@Acr** y luego a **FFa@Acr@PEG-NH₂**, que demuestra la realización del recubrimiento sobre toda la población de partículas en ambos casos.

Ejemplo 4

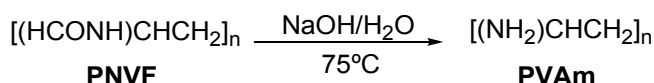
Al contrario que en el ejemplo 1, en este ejemplo se ilustra como un reactivo Y que contiene un grupo de anclaje A, en este caso un grupo amino, y un donador de Michael B, el propio grupo amino, es capaz de reaccionar mediante adición de Michael con un reactivo X que contiene un aceptor de Michael C, en este caso un doble enlace conjugado con un grupo carboxilato, y un residuo hidrofílico, en este caso polietilenglicol, a temperatura ambiente y en condiciones de pH suaves, próximas a pH fisiológico pH: 7,5, con un rendimiento de al menos un 27%.

Síntesis por vía radicalaria de poli N-vinilformamida ($[(\text{HCONH})\text{CHCH}_2]_n$). PNVF.



Una mezcla de 4 ml de N-vinilformamida ($(\text{HCONH})\text{CH}=\text{CH}_2$, 57,06 mmol) destilada y 50 ml de 2-propanol es introducida en un matraz de 100 ml de dos bocas equipado con refrigerante y un agitador mecánico. La mezcla es purgada borboteando argón a través de la disolución durante al menos 15 minutos. Tras añadir 187,40 mg de 2,2'-Azobisisobutironitrilo (AIBN, 1,14 mmol) bajo atmósfera de argón la disolución se introduce en un baño de aceite previamente termostatzado a 95°C. La mezcla se mantiene en agitación a 95°C durante 1 hora bajo atmósfera de argón. Tras abrir el matraz a la atmósfera la mezcla se enfría a temperatura ambiente. La mezcla de reacción es filtrada a través de una placa de vidrio poroso y el sólido blanco obtenido se lava sucesivamente con 2 fracciones de 25 ml de 2-propanol frío y 25 ml de acetona. El sólido obtenido se seca a vacío a 50°C obteniéndose 3,47 g de **PNVF** ($[(\text{HCONH})\text{CHCH}_2]_n$). Rendimiento: 86%

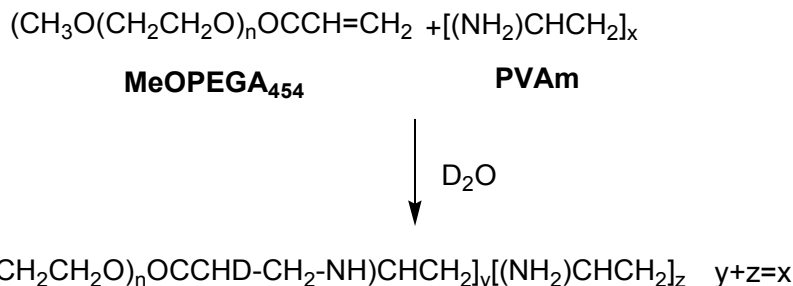
Hidrólisis de PNVF. Síntesis de polivinilamina ($[(\text{NH}_2)\text{CHCH}_2]_n$). PVAm



Sobre una mezcla de 3,20 g de **PNVF** (40 mmol, -NH-COH) en 30 ml de agua destilada se añaden 25 ml de una disolución de hidróxido de sodio 2M (50 mmol). La disolución resultante se mantiene en agitación a 75°C durante 60 horas. La disolución se concentra en el rotavapor hasta un volumen aproximado de 20 ml y el polímero obtenido se precipita en un exceso de acetona (250 ml) a temperatura ambiente. El polímero se disuelve en 120 ml de agua destilada y se purifica mediante diálisis contra agua destilada durante 3 días utilizando una membrana Spectra/Por®

con un corte de paso de 1000 Daltons. Finalmente el disolvente es evaporado en el rotavapor y el polímero es secado a vacío obteniéndose 1,47 g de **PVAm**. Rendimiento: 85%.

Reacción de PVAm con MeOPEGA₄₅₄ mediante adición de Michael



En un matraz de una boca de 20 ml se disuelven 53,84 mg de PVAm (1,25 mmol) en 10 ml de D₂O. Tras disolver el polímero completamente el pD de la disolución (pD: 10,57) se ajusta a pD: 7,53 añadiendo DCl diluido (1:20 v/v DCl (c)/D₂O) gota a gota y con agitación. Sobre la disolución incolora y transparente se añaden 0,57 g de metoxipolietilenglicol acrilato MeOPEGA₄₅₄ (Aldrich, Mn: 454Da, 1,25 mmol). Tras agitar durante 5 minutos a temperatura ambiente se toma una muestra y se analiza mediante resonancia magnética nuclear de protón (¹H-RMN) calculándose una conversión del 10%. La disolución se mantiene en agitación a temperatura ambiente tomando muestras a distintos tiempos y analizando el progreso de la reacción mediante ¹H-RMN. Tras 20 horas (ver figura 3) se obtiene una conversión cercana al 27%. El FT-IR del sólido obtenido tras lavar la fase acuosa con 10 ml de diclorometano y evaporar en el rotavapor confirma que el producto obtenido corresponde al producto resultante de la adición de tipo Michael de los grupos amino del polímero con el acrilato (ver figura 4)

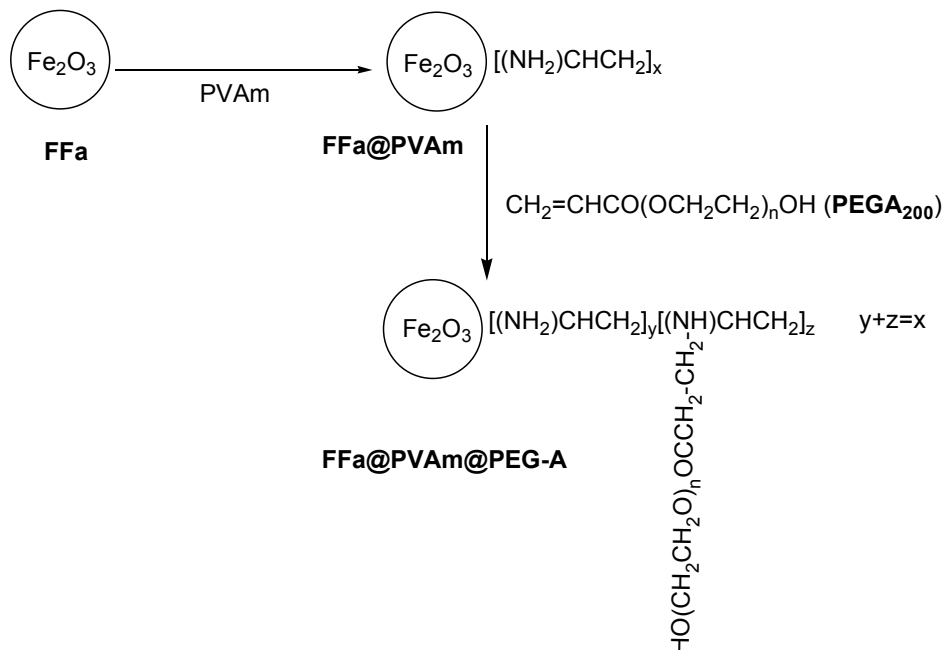
Ejemplo 5

Al contrario que en el ejemplo 3, en este ejemplo se ilustra el recubrimiento de nanopartículas dispersadas en agua con residuos hidrofílicos mediante adición de Michael y la obtención de suspensiones de nanopartículas estables a pH fisiológico (pH=7,4) mediante un proceso que incluye el recubrimiento de las partículas primero con un donador de Michael y luego por reacción con un aceptor de Michael que contiene residuos hidrofílicos.

Purificación de PEGA₂₀₀. CH₂=CHCO(OCH₂CH₂)_nOH

15 ml de polietilenglicol acrilato (Dajac Polymers, Mn:245 Da) previamente filtrado a través de placa porosa se disuelven en 45 ml de agua destilada obteniéndose una disolución amarillenta. La fase acuosa se extrae con 5 fracciones de 30 ml de éter dietílico. La fase acuosa se extrae posteriormente con 2 fracciones de 60 ml de una mezcla de diclorometano/n-hexano (3:1). Las fases orgánicas combinadas se filtran a través de papel de filtro y tras secar con sulfato de magnesio anhidro el disolvente es evaporado en rotavapor obteniéndose 5,56 g de un aceite de color amarillo oscuro.

Recubrimiento de nanopartículas con PVAm y PEGA₂₀₀ mediante adición de Michael

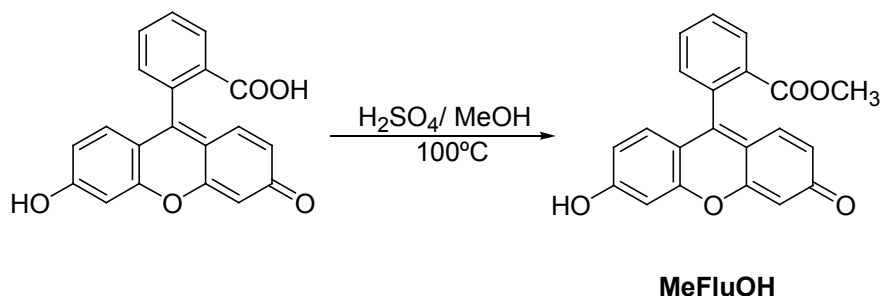


Sobre 10 mL de **FFa** sintetizada en el ejemplo 2 se añaden 32,3 mg de polivinilamina (PVAm, 0,75 mmol $-\text{NH}_2$) con agitación. Tras disolver completamente el polímero se obtiene una dispersión de nanopartículas, que denominaremos ferrofluido **FFa@PVAm**, con pH: 2,62. Sobre esta dispersión se añaden 190 mg de PEGA₂₀₀ previamente purificado (Mn:248; 0,77 mmol). El pH de la suspensión resultante se incrementa lentamente añadiendo gota a gota y con agitación una disolución de NaOH 0,5M. Tras alcanzar un pH:6,89 la mezcla se ajusta a pH:7,35 añadiendo Na_2HPO_4 0,1M. La suspensión se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente y finalmente es sometida a ultrasonidos durante 4 minutos y se filtra a través de un filtro de membrana Millex®-GS MF (Millipore) de 0,22 μm , resultando una suspensión transparente que denominaremos ferrofluido **FFa@PVAm@PEGA**. Las distribuciones de tamaños hidrodinámicos de las partículas medidas por DLS después de recubrirlas con PVAm y después de recubrirlas posteriormente con PEGA se muestran en la Fig. 5. Los diámetros hidrodinámicos son 33 nm y 43 nm. El aumento de tamaño con respecto al ferrofluido de partida (13 nm) indica la consecución del primer recubrimiento con PVAm y del segundo recubrimiento con PEGA por reacción de Michael.

Ejemplo 6

En este ejemplo se ilustra el recubrimiento de nanopartículas con residuos hidrofílicos, su funcionalización con tintes fluorescentes, sus propiedades superparamagnéticas, y su utilidad en estudios biomédicos, en particular en el seguimiento de procesos de endocitosis.

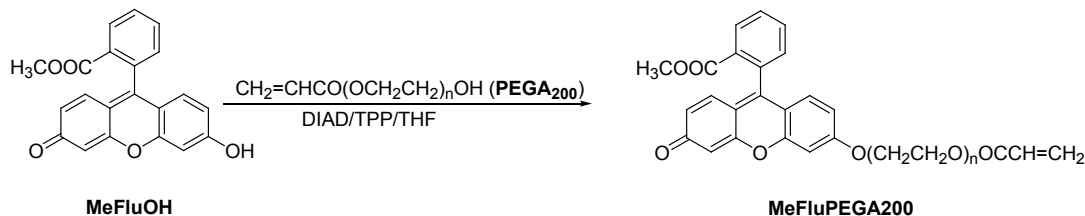
Síntesis de Metil-Fluoresceína (MeFluOH)



Sobre una suspensión de 25 g de Fluoresceína en 75 ml de metanol enfriada en baño de agua-hielo se añaden cuidadosamente 18,8 ml de ácido sulfúrico concentrado. La disolución de color rojo oscuro se calienta a reflujo (100°C) durante 15 horas. La suspensión se enfría a temperatura ambiente y se añade sobre 25 ml de agua muy fría en un vaso de precipitados de 500 ml. Sobre la mezcla anterior y con fuerte agitación se añaden cuidadosamente 75 g de bicarbonato de sodio. La mezcla se filtra sobre placa porosa y el sólido obtenido se lava con 150 ml de agua destilada. El sólido se resuspende en 600 ml de una disolución acuosa de bicarbonato sódico (2% en peso), tras agitar durante 15 minutos se filtra sobre placa porosa y se lava con 150 ml de agua destilada. El proceso de lavado con bicarbonato/agua se repite de nuevo utilizando los mismos volúmenes. Finalmente el sólido

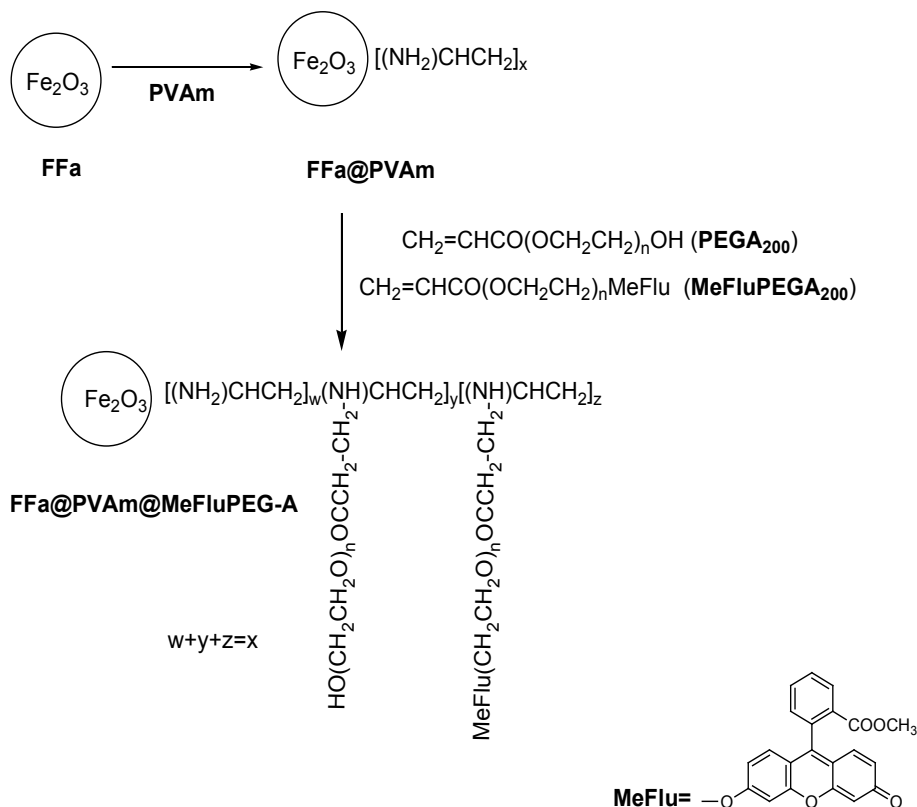
se resuspende en 300 ml de una disolución acuosa de ácido acético (1%), tras agitar durante 15 minutos se recupera por filtración sobre placa porosa y el sólido obtenido se lava con 150 ml de agua. El sólido rojizo obtenido se seca en la estufa durante dos horas a 125 °C. Tras secar se obtienen 14,87 g de un sólido de color naranja (42,9 mmol). Rendimiento: 57%.

5 Síntesis de Metil Fluoresceína-Polietilenglicol acrilato (MeFluPEGA₂₀₀)



Sobre una suspensión de 3,46 g **MeFluOH** (10 mmol) en 50 ml de tetrahidrofurano anhidro, se añaden bajo atmósfera de argón, 2,89 g de trifetilfosfina **TPP** (11 mmol) y 2,75 g de polietilenglicol acrilato **PEGA₂₀₀** (~ 11mmol, Mn: 248,27 Da) previamente purificado por extracción. Tras enfriar la mezcla en baño de agua-hielo se añaden 2,3 ml de diisopropil-azodicarboxilato **DIAD** (11 mmol) gota a gota vía jeringa bajo atmósfera de argón. Una vez terminada la adición y tras agitar a 0°C durante 15-20 minutos se elimina el baño de agua-hielo y la mezcla se mantiene en agitación a temperatura ambiente. Después de 66 horas en agitación se añade sobre la mezcla 0,25 ml de agua destilada y tras agitar durante 25 minutos la mezcla se filtra sobre papel. El disolvente es eliminado en el rotavapor y el crudo obtenido se disuelve en 50 ml de diclorometano. La fase orgánica se lava sucesivamente con 3 fracciones de 25 ml de carbonato potásico 1M, 25 ml de una disolución saturada de cloruro de sodio, se filtra a través de papel, se seca sobre sulfato de magnesio anhidro y el disolvente es evaporado en el rotavapor. El crudo se purifica dos veces por disolución en un pequeño volumen de tetrahidrofurano (1 ml x g de crudo) y precipitación en un exceso de éter dietílico frío (25 ml x g de crudo). El producto se purifica por cromatografía presión sobre gel de sílice utilizando inicialmente acetato de etilo como eluyente y aumentando progresivamente la polaridad del eluyente hasta terminar con una mezcla de acetato de etilo/metanol (9,5:0,5). 2,40 g de producto fueron obtenidos

Recubrimiento y funcionalización de nanopartículas con PVAm, PEGA₂₀₀ y MeFluPEGA₂₀₀ mediante adición de Michael



Sobre 7,5 ml de **FFa** sintetizada en el ejemplo 2 se añaden 25,90 mg de polivinilamina (PVAm, 0,60 mmol -NH₂) con agitación. Tras disolver completamente el polímero se añaden 111,60 mg de PEGA₂₀₀ previamente purificado (Mn:248, 0,45 mmol) y 86,43 mg de MeFluPEGA₂₀₀ (0,15 mmol, Mn:576,20 Da). El pH de la suspensión de

nanopartículas resultante se incrementa lentamente añadiendo gota a gota y con agitación una disolución de NaOH 0,5M. Tras alcanzar un pH:8,32 la suspensión es sometida a ultrasonidos durante 4 minutos, se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 60 horas, se somete nuevamente a ultrasonidos durante 4 minutos y se ajusta a pH: 7,43 añadiendo Na_2PHO_4 0,1M. Finalmente la suspensión se filtra a través de un filtro de membrana Millex®-GS MF (Millipore) de 0,22 μm para obtener una suspensión transparente que denominaremos **FFa@PVAm@MeFluPEGA**. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de la suspensión resultante se muestran en la figura 6. Se observan agrupaciones de algunas decenas de partículas que se generan probablemente al ser encapsuladas por las moléculas de polímero polivinilamina. El diámetro medio de las nanopartículas de óxido de hierro es de 5,9 nm y la desviación estándar de $\pm 1,3$ nm. Un análisis por difracción de electrones produce patrones que son compatibles con la estructura de la maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$).

Propiedades superparamagnéticas del ferrofluido FFa@PVAm@MeFluPEG-A

La variación con la temperatura de la susceptibilidad magnética ac en un campo magnético alterno de la muestra resultante se midió en un susceptómetro SQUID de "Quantum Design" en comparación con la de la suspensión ácida de nanopartículas antes de recubrir. Los gráficos obtenidos se muestran en la figura 7. Se puede observar que en las dos suspensiones existen sendos picos, que varían con la frecuencia de alternancia del campo, en la susceptibilidad en fase, χ' , y fuera de la fase, χ'' , que corresponden a un comportamiento superparamagnético. La temperatura del máximo a 117 Hz, habitualmente denominada como temperatura de bloqueo, es de 30 K en los dos casos, o sea que no varía en el proceso de recubrimiento. Esta temperatura de bloqueo se encuentra en el rango de lo esperado para partículas de su tamaño (5.9 nm). Sin embargo, se observa que con el recubrimiento el pico de susceptibilidad fuera de fase se hace más estrecho y más uniforme y la intensidad aumenta. Es decir que la suspensión de nanopartículas recubiertas posee unas propiedades superparamagnéticas mejoradas respecto a la original a la hora de su utilización en aplicaciones como la magnetotermia que dependen de la susceptibilidad fuera de fase.

Aplicación del ferrofluido FFa@PVAm@MeFluPEGA en estudios celulares

Se han realizado cultivos celulares de células de musculatura lisa de aorta de rata en presencia del ferrofluido multifuncional FFa@PVAm@MeFluPEGA. Las células se han observado mediante un microscopio de fluorescencia Axiovert 200M equipado con Apotome, que desarrolla la técnica de imagen estructurada, utilizando un objetivo 40x de inmersión en aceite. En estos experimentos se utilizan tintes con emisión azul para localizar los núcleos de las células y tintes lysotracker (Molecular Probes-Invitrogen) para marcar la localización de los lisosomas. Se observa que las nanopartículas se pueden localizar fácilmente por su emisión de luz verde. De esta forma se ha conseguido seguir el proceso de internalización de las partículas en el citoplasma de las células y su introducción en los lisosomas. En la figura 8 se muestran imágenes de este proceso que originalmente se tomaron en color y que en la figura se han convertido en blanco y negro. La figura 8a corresponde a una célula en la que han penetrado una cantidad apreciable de nanopartículas que se distinguen como puntos brillantes que aparecen en verde en la imagen original en color. En la imagen siguiente (Fig. 8b) los puntos brillantes, en rojo en la imagen original, muestran la localización de los lisosomas en el citoplasma celular y en la siguiente (Fig. 8c) se muestra la imagen mezclada en la que los puntos brillantes, más intensos que en las imágenes anteriores y que aparecen con color amarillo-naranja en la imagen original, coinciden en localización con los de las imágenes anteriores y resultan de la mezcla de emisiones rojas y verdes con lo que se demuestra la penetración de las nanopartículas dentro de los lisosomas. La figura 9 muestra el gráfico de dispersión en el que se representa la emisión del canal 1, correspondiente a las nanopartículas, en el eje x y la emisión del canal 2, correspondiente a la emisión del marcador de lisosomas en el eje y. Como se puede apreciar en la imagen las dos emisiones muestran una superposición total lo que demuestra la colocalización de nanopartículas y lisosomas de forma inequívoca.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la obtención de nanopartículas recubiertas y funcionalizadas mediante reacción de Michael que comprende las etapas:
 - a) reacción de al menos una nanopartícula con un reactivo que comprende un donador (B) o un aceptor (C) de Michael, y
 - b) reacción del producto obtenido en (a) con un reactivo que comprende un aceptor (C) o donador (B) de Michael.

Si en la etapa (a) el reactivo es un donador (B) en la etapa (b) el reactivo es un aceptor (C) o viceversa.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde la nanopartícula se selecciona de entre metal, óxido de metal o cualquiera de sus combinaciones.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, donde el óxido de metal es un óxido de hierro.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la nanopartícula tiene un tamaño de entre 1nm y 100nm.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el reactivo de la etapa (a) además comprende un espaciador R_1 .
6. Procedimiento según la reivindicación 5, donde R_1 es un compuesto orgánico.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el reactivo de la etapa (b) además comprende un espaciador R_2 .
8. Procedimiento según la reivindicación 7, donde R_2 es un compuesto orgánico que comprende grupos solvables en un líquido.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el reactivo de la etapa (a) además comprende un grupo de unión (A) que se selecciona de entre un catión, un anión, precursor alcoxilano, tiol, alcohol, alcóxido, carboxilato, anhídrido carboxílico, fosfato, polielectrolito, imina, nitrilo, azida, amina, amida, fosfina o cualquiera de sus combinaciones.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, donde el anión se selecciona de entre un grupo carboxilato, sulfato, fosfato o cualquiera de sus combinaciones.
11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el reactivo donador de Michael (B) se selecciona de la lista que comprende: β -dicetona, éster malónico, β -cetoéster, β -cetonitrilo, nitro, amino, ácido malónico, enamina, amina primaria, amina secundaria, amina terciaria, imina, hidracina, guanadina, alcohol, tiol, fosfina, metileno, carbinol, organometálico, haluro y cualquiera de sus combinaciones.
12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde el reactivo aceptor de Michael (C) se selecciona de la lista que comprende: enón conjugado, carbonilo, ciano, carboxílico, carboxilato, sulfonilo, aldehído, éster, nitrilo, nitro insaturado, carboxilato, acrilato, acrilamida, metacrilato, metacrilamida, acrilonitrilo, vinilcetona, vinilsulfona y cualquiera de sus combinaciones.
13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde el reactivo de la etapa (b) además comprende al menos un residuo orgánico o inorgánico (D) con funcionalidad física, química o biológica.
14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde el residuo orgánico o inorgánico (D) con funcionalidad física se selecciona de entre fluoresceína, rodamina, complejo de tierra rara, puntos cuánticos o cualquiera de sus combinaciones.
15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde el residuo orgánico o inorgánico (D) con funcionalidad química se selecciona de entre un catalizador o un absorbente.
16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde el residuo orgánico o inorgánico (D) con funcionalidad biológica se selecciona de entre un compuesto con capacidad catalítica, con capacidad de reconocimiento, con capacidad curativa o cualquiera de sus combinaciones.
17. Procedimiento según la reivindicación 16, donde el compuesto con capacidad catalítica es una enzima.
18. Procedimiento según la reivindicación 16, donde el compuesto con capacidad de reconocimiento se selecciona de entre anticuerpos, oligonucleótidos o cualquiera de sus combinaciones.
19. Procedimiento según la reivindicación 16, donde el compuesto con capacidad curativa es un fármaco.

- 20. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, donde las etapas (a) y/o (b) se llevan a cabo en condiciones de temperatura de entre 10 y 70°C.
- 21. Nanopartícula recubierta y funcionalizada obtenible por el procedimiento descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20.
- 5 22. Uso de las nanopartículas descritas según la reivindicación 21, para la fabricación de productos que se seleccionan de la lista que comprende: cosméticos, pinturas, tintes, catálisis, depuración de aguas y biomedicina.
- 23. Dispersión de las nanopartículas recubiertas y funcionalizadas según la reivindicación 21, en un medio líquido.
- 10 24. Dispersión según la reivindicación 23, donde el medio líquido de dispersión se selecciona de entre acuoso, orgánico o cualquiera de sus combinaciones.
- 25. Uso de la dispersión descrita según cualquiera de las reivindicaciones 23 ó 24, para la fabricación de productos que se seleccionan de la lista que comprende: cosméticos, pinturas, tintes, catálisis, depuración de aguas y biomedicina.

Fig. 1

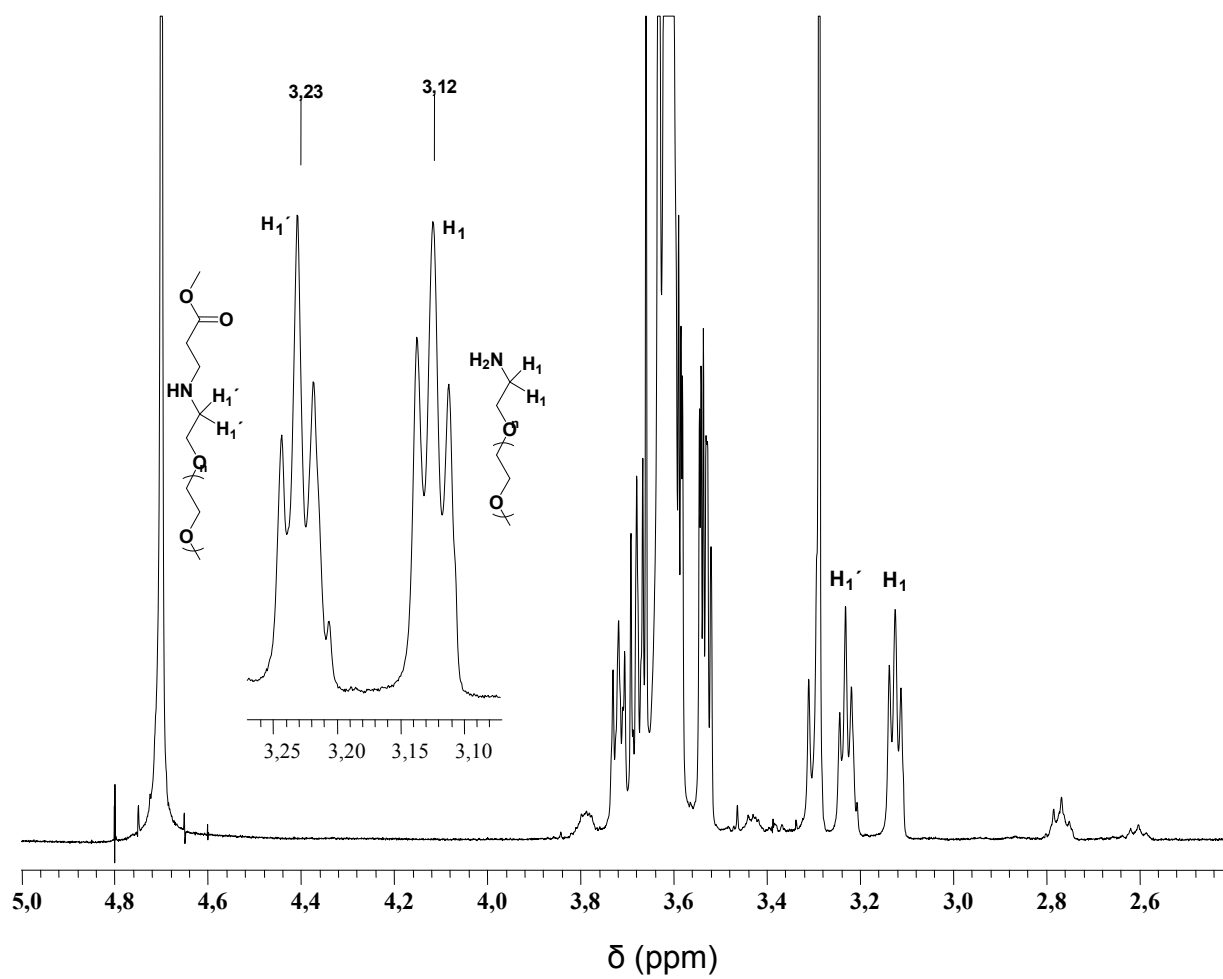


Fig. 2

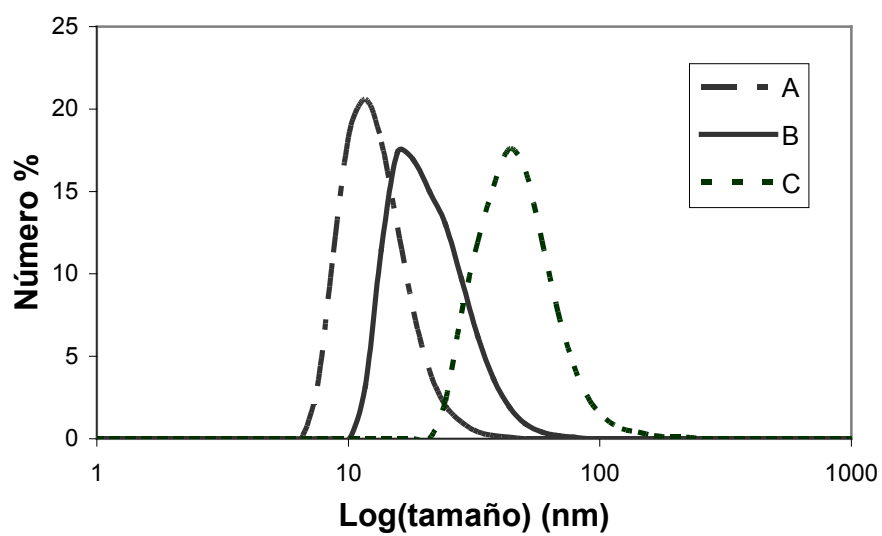


Fig. 3

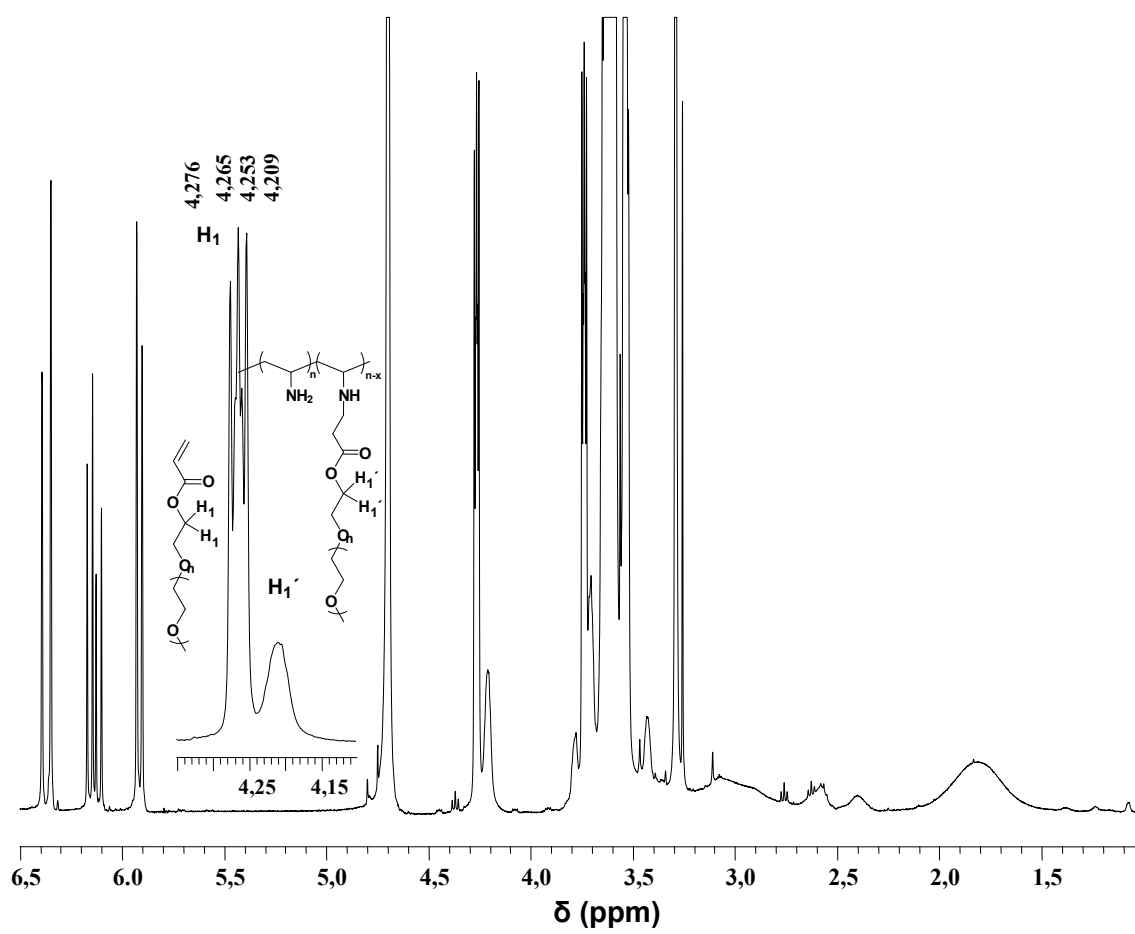


Fig. 4

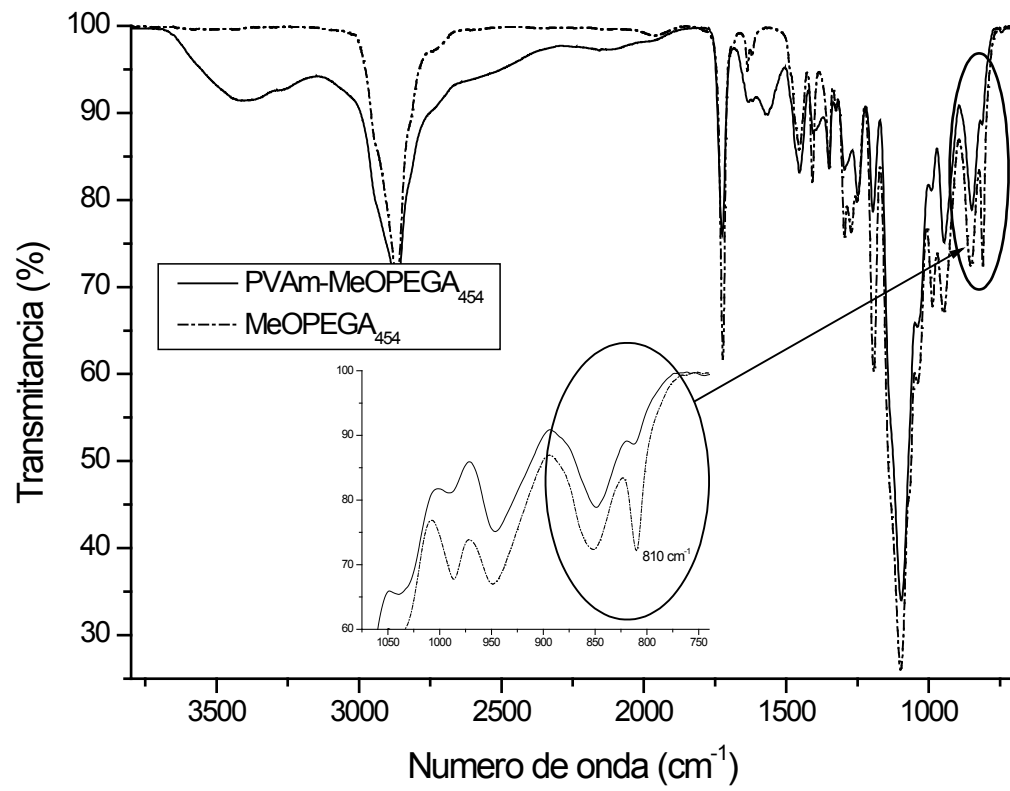


Fig. 5

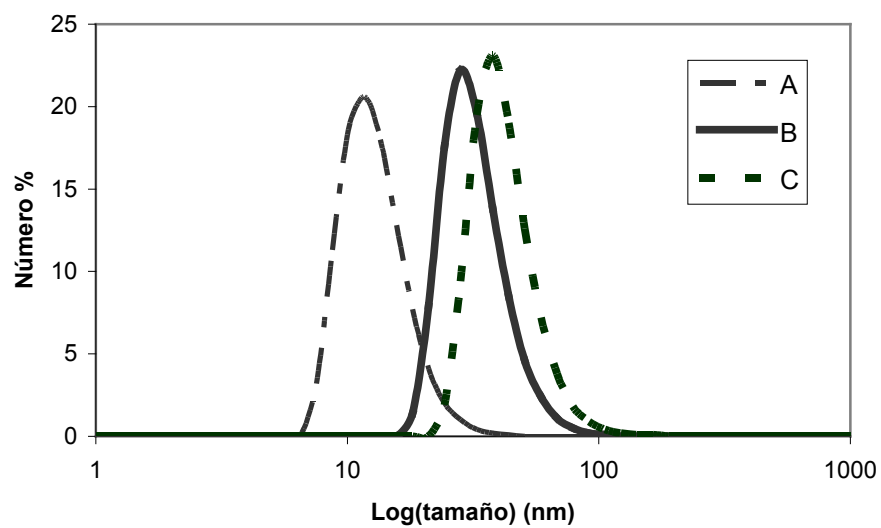


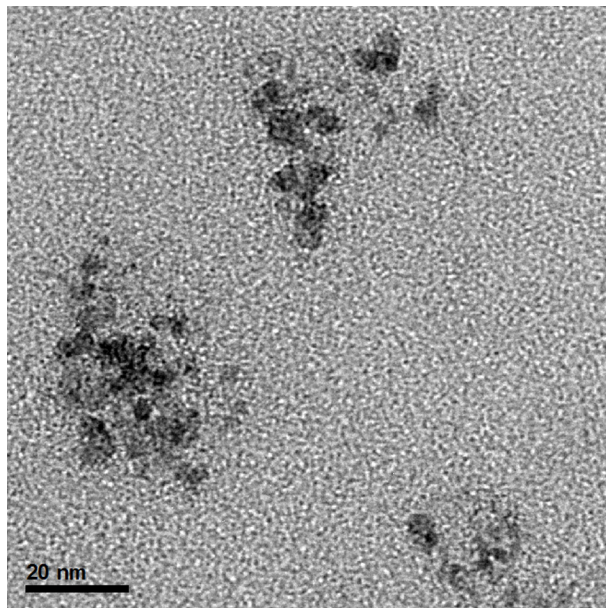
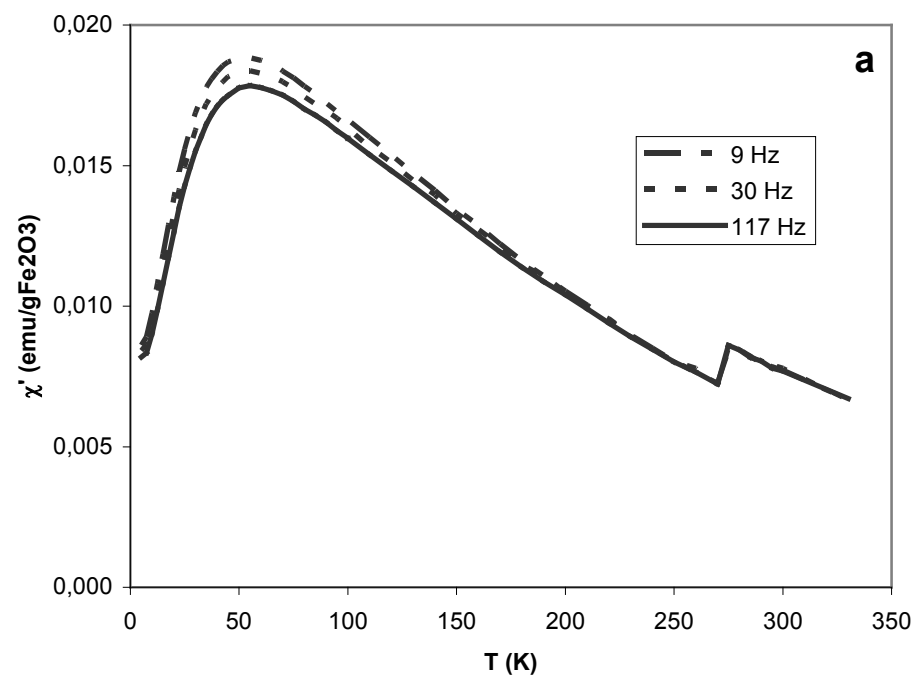
Fig. 6**Fig. 7**

Fig.7

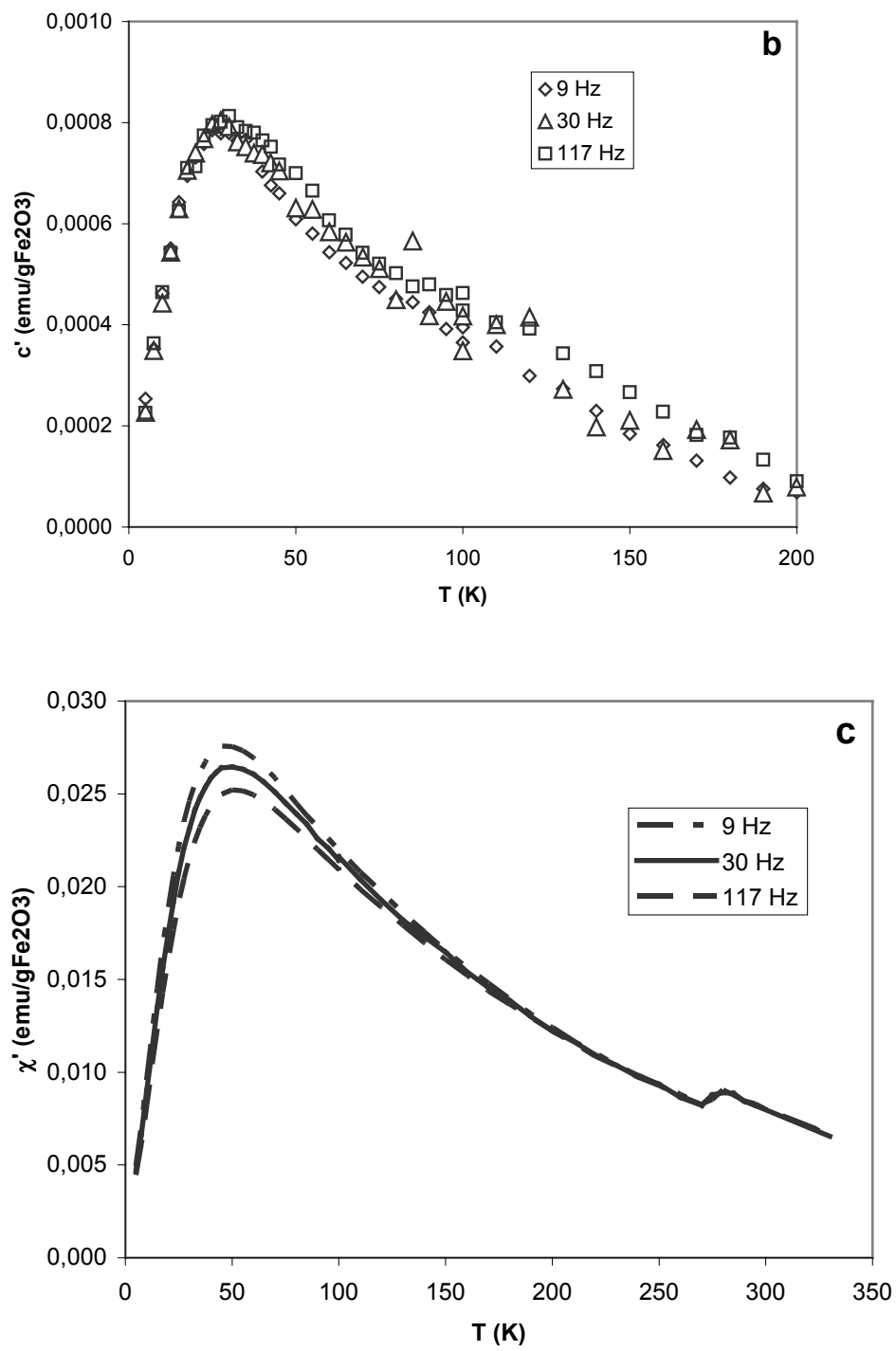
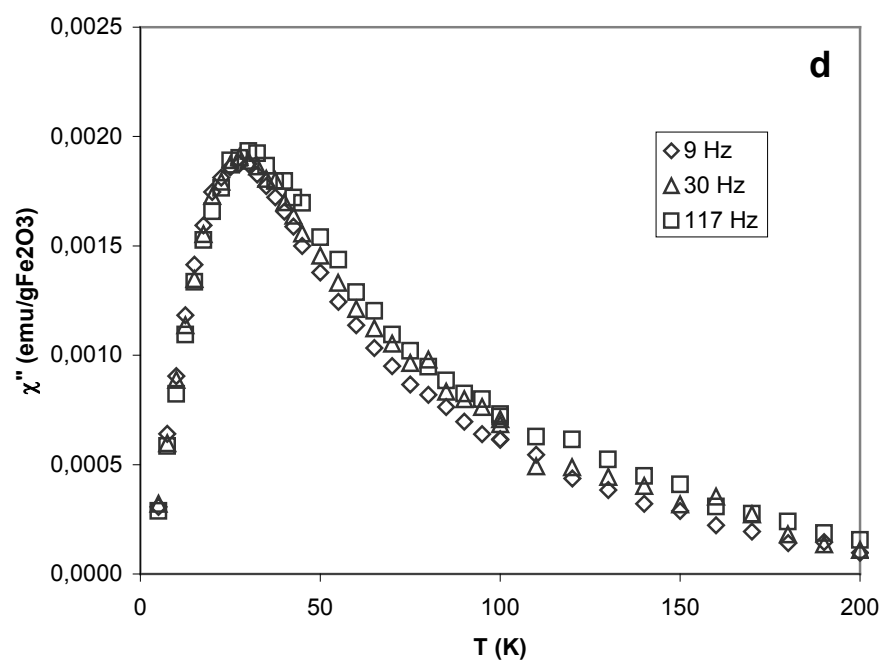
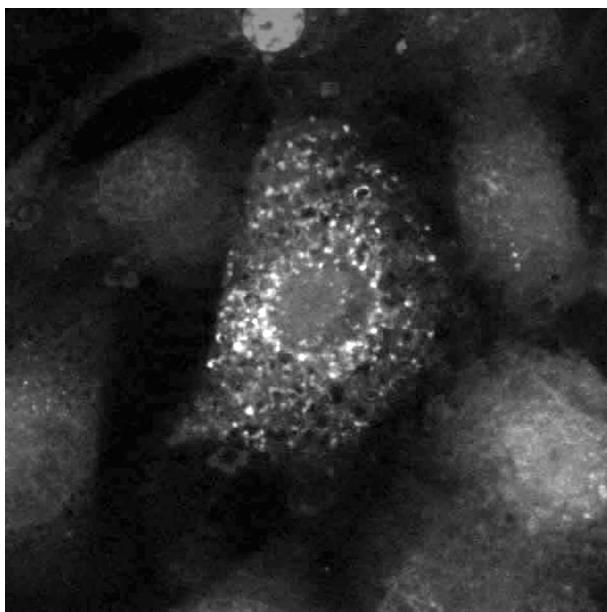


Fig. 7**Fig. 8****Fig 8a**

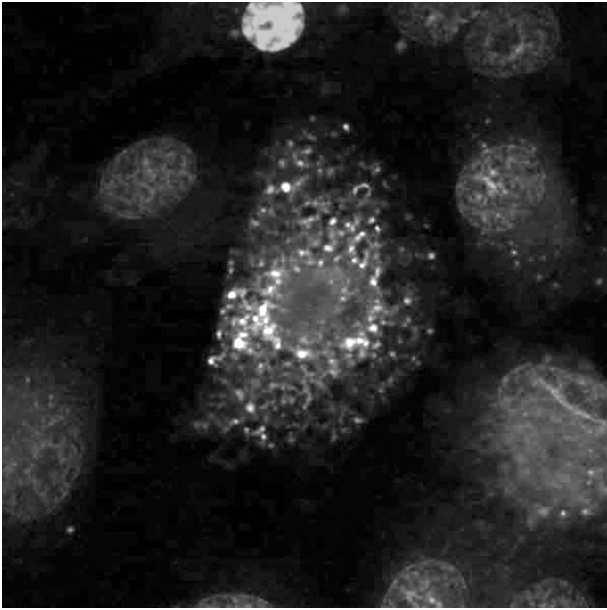


Fig 8b

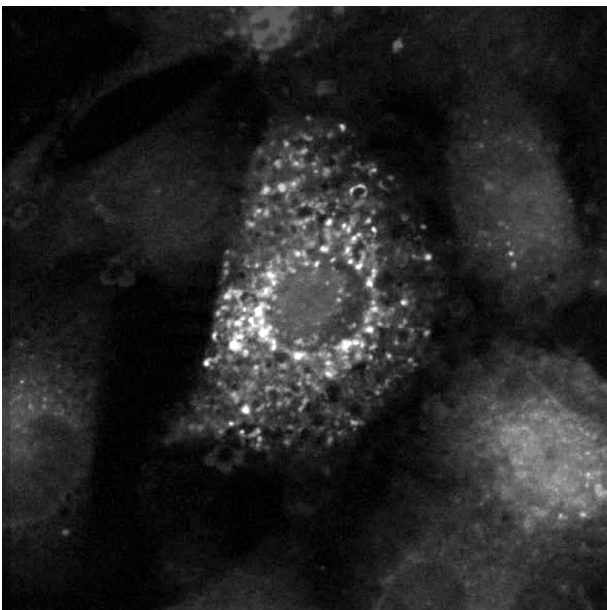
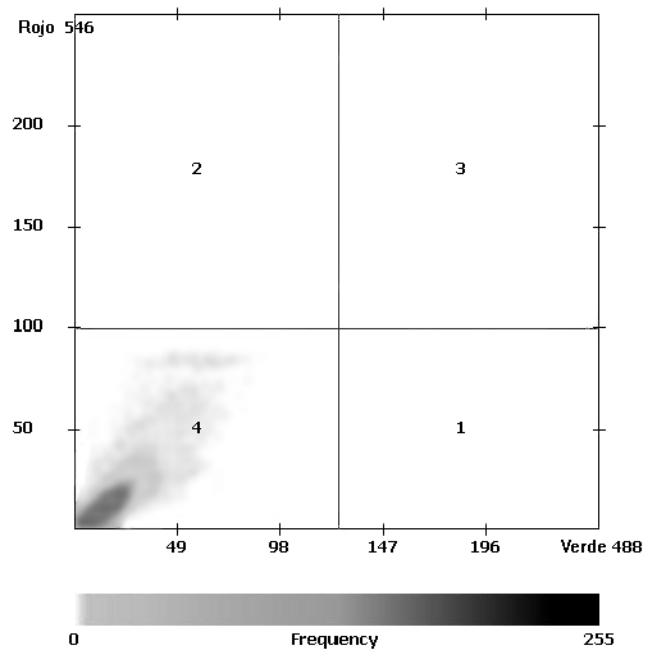


Fig 8c

Fig. 9





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031493

②② Fecha de presentación de la solicitud: 07.10.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2004045494 A2 (BARILAN UNIVERSITY) 03.06.2004, páginas 6,13,14; reivindicaciones 1-3,7,10-13.	1-13,16,19-25
X	US 6887517 B1 (R. L. COOK et al.) 03.05.2005, columna 3, líneas 34-60; columna 5, líneas 9-43; columna 6, líneas 38-40,46-55; columna 7, línea 12 – columna 8, línea 67; reivindicaciones 1,7-9,12,13,24,25,37,50.	1,2,4-12,21,23,24
X	G. SHAFIR et al., "Synthesis and characterization of recombinant factor VIIa-conjugated magnetic iron oxide nanoparticles for hemophilia treatment", J. Biomedical Material Res., 2009, vol. 91A, nº 4, páginas 1056-1064, ver páginas 1057-1059, Figura 1.	1-13,16,19-22
X	S. CHANDRA et al., "Dendritic magnetite nanocarriers for drug delivery applications", New J. Chem., 2010 [accesible en línea 12.02.2010], vol. 34, páginas 648-655, ver página 649.	1-13,16,19-25
A	C. BOYER et al., "The design and utility of polymer-stabilized iron-oxide nanoparticles for nanomedicine applications", NPG Asia Mater., 2010 [accesible en línea 21.01.2010], vol. 2, nº 1, páginas 23-30.	1-25
A	US 6514481 B1 (P. N. PRASAD et al.) 04.02.2003, columna 1, líneas 56-63; columna 2, líneas 4-10; columna 3, líneas 7-61.	1-25

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
01.02.2012

Examinador
E. Dávila Muro

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

B82B1/00 (2006.01)

B82B3/00 (2006.01)

B82Y5/00 (2011.01)

B82Y15/00 (2011.01)

B82Y40/00 (2011.01)

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

B82B, B82Y

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, XPESP, CAPLUS, BIOSIS, MEDLINE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 01.02.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 14,15,17,18	SI
	Reivindicaciones 1-13,16,19-25	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-25	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	WO 2004045494 A2	03.06.2004
D02	US 6887517 B1	03.05.2005
D03	G. SHAFIR et al., J. Biomed. Mat. Res., 2009, vol. 91A, nº 4, pgs. 1056-1064	
D04	S. CHANDRA et al., New J. Chem., 2010, vol. 34, pgs. 648-655	

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

El objeto de la invención es un procedimiento para la obtención de nanopartículas metálicas recubiertas y funcionalizadas mediante reacción de Michael. La invención también se refiere a las nanopartículas recubiertas y funcionalizadas, a las dispersiones de las mismas en un medio líquido y al uso de dichas nanopartículas para la fabricación de productos con aplicación en cosmética, pinturas, tintes, catálisis, depuración de aguas y biomedicina.

El documento D01 divulga la preparación de nanopartículas conjugadas con un residuo orgánico (trombina) que se utilizan para el tratamiento de trastornos asociados a la coagulación sanguínea. Las nanopartículas son de óxido de hierro tratadas previamente para formar sobre ellas un recubrimiento funcional (dextrano, gelatina) con los grupos reactivos necesarios para enlazar covalentemente las moléculas de trombina directamente a la superficie de las nanopartículas o bien a través de un espaciador orgánico (albúmina). Esta unión covalente se lleva a cabo mediante reacción de adición de Michael entre un primer grupo funcional amino primario del espaciador y un doble enlace activado de la superficie de la nanopartícula, y un segundo grupo funcional carboxilato que permite la unión covalente al residuo de trombina. En D01 también se divulga la preparación de dispersiones acuosas de estas nanopartículas conjugadas con trombina (ver páginas 4-6,9,13-14, reivindicaciones 1-3,7-13,18,20,25).

El documento D02 divulga nanopartículas recubiertas y funcionalizadas en la superficie mediante reacciones de adición de Michael en varias etapas. En este caso las nanopartículas son de oxihidróxido de aluminio o de hierro funcionalizadas en la superficie con grupos acrílicos (acrilato, metacrilato, acrilamida) para enlazar mediante uniones covalentes a través de distintos grupos funcionales (carboxilato, amino, amonio cuaternario, fosfato, fosfonato, sulfato, alcohol, tiol, etc.) con reactivos que actúan como aceptores/donadores de Michael en sucesivas etapas (ver columna 5, líneas 9-39, columna 6, líneas 38-40,46-48,52-55, columna 7, línea 12-columna 8, línea 6, 54-67, ejemplo 4, reivindicaciones 1,713,24-25,37,50).

El documento D03 divulga unas nanopartículas de óxido de hierro γ -Fe₂O₃ (maghemita) con una cubierta de gelatina, que se funcionalizan con dobles enlaces mediante interacción del recubrimiento de gelatina con divinil sulfona y a continuación los dobles enlaces activados se utilizan para enlazar covalentemente mediante adición de Michael con el factor recombinante VIIa o con albúmina como espaciador. El bloqueo de los dobles enlaces restantes se lleva cabo utilizando metoxi-PEG-amina (ver páginas 1057-1059 y figura 1). Estas nanopartículas conjugadas con el factor VIIa se utilizan en el tratamiento de la hemofilia y trastornos relacionados con la coagulación.

El documento D04 divulga la formación de unas nanopartículas de óxido de hierro modificadas en la superficie con una estructura dendrítica que se utilizan para aplicaciones biológicas. Son nanopartículas de Fe₃O₄ con un recubrimiento de 3-aminopropil-trimetoxisilano cuyos grupos amino primario se hacen reaccionar mediante adición de Michael con monómeros metilacrilato y a continuación con arginina hasta construir la estructura dendrítica (ver página 649). La presencia de bloques dendríticos en la superficie de las nanopartículas magnéticas permite su interacción con fármacos como doxorubicina.

En consecuencia, se considera que el objeto de las reivindicaciones 1,21,22,23 y 25 así como las dependientes 2-13,16,19,20 y 24 no presentan novedad ni actividad inventiva con respecto a lo divulgado en los documentos D01-D04 (Arts. 6. y 8.1 LP/1986).

Aunque no se ha encontrado divulgado en el estado de la técnica anterior la preparación de nanopartículas recubiertas mediante reacción de Michael que incorporen un residuo orgánico con una funcionalidad física (fluoresceína, rodamina, complejos de tierras raras, puntos cuánticos), o con una función catalítica (enzima) o de reconocimiento (anticuerpos, oligonucleótidos) como se recoge en las reivindicaciones 14,15,17,18, a la vista de lo descrito en D01-D04 ésta sería una mera variación estructural sobre todo teniendo en cuenta que es conocida la preparación de nanopartículas con un recubrimiento que permita el anclaje en su superficie de estructuras con una funcionalidad determinada, como pueda ser un fármaco o un compuesto con actividad biológica, y que dicho recubrimiento se lleve a cabo mediante adición de Michael.

Consecuentemente, la invención recogida en las reivindicaciones 14,15 y 17,18 se considera que carece de actividad inventiva (Art. 8.1 LP/1986).