

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 962 702**

(21) Número de solicitud: 202330901

(51) Int. Cl.:

A61K 41/00	(2010.01)
A61K 36/9066	(2006.01)
A61K 31/12	(2006.01)
A61K 9/51	(2006.01)
A61P 31/04	(2006.01)
A61K 47/00	(2006.01)
B82B 1/00	(2006.01)
B82Y 5/00	(2011.01)

(12)

SOLICITUD DE PATENTE

A1

(22) Fecha de presentación:

03.11.2023

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

20.03.2024

(71) Solicitantes:

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
(90.0%)
Camí de Vera, s/n
46022 Valencia (Valencia) ES y
CONSORCIO CENTRO DE INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA EN RED M.P. (10.0%)

(72) Inventor/es:

TRIGO GUTIERREZ, Jeffersson Krishan;
MEDAGLIA, Serena;
AZNAR GIMENO, Elena;
MARTINEZ MAÑEZ, Ramón y
GARCIA DE OLIVEIRA MIMA, Ewerton

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

(54) Título: **NANOPARTÍCULAS PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE CURCUMINA, PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN Y USO DE LAS MISMAS**

(57) Resumen:

Nanopartículas para la liberación controlada de curcumina, procedimiento de preparación y uso de las mismas.

La presente invención se refiere a nanopartículas para la liberación controlada curcumina que comprenden: un núcleo formado por agregación de nanopartículas de oro donde dicho agregado presenta forma de nanoestrella; un primer recubrimiento formado por una capa de sílice mesoporosa donde la curcumina se encuentra encapsulada o embebida; un segundo recubrimiento que recubre la capa de sílice porosa, donde dicho segundo recubrimiento está formado octadeciltrimetoxisilano; un tercer recubrimiento que recubre la capa de octadeciltrimetoxisilano, donde dicho tercer recubrimiento está formado por un compuesto termosensible.

La presente invención también se refiere al procedimiento de preparación de dichas nanopartículas y a su uso.

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas para la liberación controlada de curcumina, procedimiento de preparación y uso de las mismas

5

La presente invención se refiere a nanopartículas para la liberación controlada de un agente antibacteriano como es la curcumina mediante la aplicación de luz en el rango del IR cercano, así como al procedimiento de preparación de dichas nanopartículas y a su uso.

- 10 La presente invención se puede enmarcar en el campo de la medicina, especialmente en el tratamiento de infecciones microbianas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

- 15 Debido a la creciente resistencia antimicrobiana a las terapias medicamentosas convencionales, la Terapia Fotodinámica antimicrobiana (aPDT, por sus siglas en inglés, *antimicrobial Photodynamic Therapy*) ha sido propuesta como alternativa para el tratamiento de infecciones microbianas (Hamblin, MR. "Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes." Curr Opin Microbiol, 2016 67-73). En la aPDT, un compuesto denominado fotosensibilizador (FS) interactúa con la luz de una longitud de onda adecuada, que, en presencia de oxígeno, genera especies reactivas de oxígeno (EROS) que provocan el daño oxidativo a los microorganismos. La curcumina (CUR) es un FS natural utilizado con éxito en la aPDT y se ha evaluado *in vitro* contra células microbianas libres (cultivos planctónicos) y biopelículas (Abrahamse, 20 25 H, et al. "New photosensitizers for photodynamic therapy." Biochem J, 2016, 347-64); así como en modelos de infección *in vivo* (Dovigo, LN, et al. "Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis." Med Mycol, 2013, 243-251).
- 30 Sin embargo, el uso clínico de CUR como FS sigue siendo limitado debido a su hidrofobicidad, inestabilidad y baja biodisponibilidad. De esta forma para su vehiculación y aplicación se requieren disolventes orgánicos como el dimetilsulfóxido (DMSO), que presenta efectos citotóxicos (Sakima, VT, et al. "Antimicrobial Photodynamic Therapy Mediated by Curcumin-Loaded Polymeric Nanoparticles in a Murine Model of Oral 35 Candidiasis." Molecules, 2018, 23, 2075; Hanslick, JL, et al. "Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system." Neurobiol

Dis, 2009, 1-10;).

Una alternativa para mejorar estos inconvenientes es a través de sistemas de liberación de fármacos, como nanopartículas poliméricas, micelas, ciclodextrinas, nanopartículas mesoporosas.

Entre los posibles nanomateriales, las nanopartículas mesoporosas de sílice (MSN) tienen una gran capacidad de carga, estabilidad química y biocompatibilidad (Hernández-Montoto, A, et al. "Gold Nanostars Coated with Mesoporous Silica Are Effective and Nontoxic Photothermal Agents Capable of Gate Keeping and Laser-Induced Drug Release." *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 27644-27656; Aznar, E, et al. "pH- and Photo-Switched Release of Guest Molecules from Mesoporous Silica Supports." *J Am Chem Soc*, 2009, 6833–6843). Anteriormente se desarrollaron estudios sobre CUR en MSN (Wang, J, et al. "Rational design of multifunctional dendritic mesoporous silica nanoparticles to load curcumin and enhance efficacy for breast cancer therapy." *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 26511–26523; Gangwar, RK, et al. "Curcumin conjugated silica nanoparticles for improving bioavailability and its anticancer applications." *J Agric Food Chem*, 2013, 9632–9637), pero la mayoría de ellos se utilizaron contra células cancerosas. En un estudio reciente, nanopartículas de sílice cargadas con CUR (CUR-SNp) en concentración de 1 mg/mL asociado a 20 J/cm² de irradiación de luz azul promovieron disminución casi 6 log₁₀ en cultivos planctónicos de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Mirzahosseiniipour, M, et al. "Antimicrobial photodynamic and wound healing activity of curcumin encapsulated in silica nanoparticles. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2020, 101639). Además, estos parámetros de dosis de luz y CUR cargada en nanopartículas se utilizaron contra biopelículas (biofilmes) monoespecies de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, promoviendo reducción del recuento de colonias microbianas de 3 log₁₀ para *S. aureus* y 5 log₁₀ para *P. aeruginosa* en comparación con el grupo de control no tratado. Además de la acción del CUR como FS, el compuesto transportado en nanopartículas de sílice, en comparación con la forma libre de CUR, mostró un mayor efecto cicatrizante tras 24 horas en contacto con fibroblastos dérmicos *in vitro*.

A pesar de haber sido reportada eficacia fotodinámica antimicrobiana de CUR en MSN, la liberación prolongada de algunos sistemas podría comprometer el uso clínico de CUR en nano cargadores.

Una posible alternativa para mejorar la eficacia de la aPDT podría ser la modificación de la superficie externa de la MSN mediante el uso de puertas moleculares (Garcia-Fernandez, A, et al. "New Advances in In Vivo Applications of Gated Mesoporous Silica as Drug Delivery Nanocarriers." Small, 2020, 16 (3)), que ofrecen una liberación espacio-temporal del compuesto cargado, a fin de tener el control de la cantidad de FS liberado y de evitar la degradación del FS antes de la entrega en el sitio albo. Este concepto ha permitido el diseño de nanodispositivos para la administración a demanda que pueden activarse mediante sustancias químicas (como moléculas redox, aniones seleccionados y cambios de pH), físicos (como luz, temperatura y campos magnéticos) y bioquímicos (como enzimas, anticuerpos y ADN).

De esta forma, la presente invención tiene como ventajas la liberación controlada de CUR de MSN, las mismas que a su vez están recubiertas por una puerta molecular que evita la posible degradación del FS hasta su entrega en el sitio de acción.

15

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención describe nanopartículas útiles para la liberación de compuestos activos, tales como la curcumina, que permiten la liberación controlada espacio-temporal de dichos compuestos en presencia de irradiación en el infrarrojo cercano (NIR).

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a nanopartículas para la liberación controlada de curcumina (en adelante, las nanopartículas de la presente invención), que 25 comprenden:

- un núcleo formado por agregación de nanopartículas de oro donde dicho agregado presenta forma de nanoestrella,
- un primer recubrimiento del núcleo, donde dicho primer recubrimiento está formado por una capa de sílice mesoporosa donde la curcumina se encuentra encapsulada o 30 embebida,
- un segundo recubrimiento formado por octadeciltrimetoxisilano, el cual se encuentra recubriendo la capa de sílice porosa,
- un tercer recubrimiento que recubre la capa de octadeciltrimetoxisilano, donde dicho tercer recubrimiento está formado por un compuesto termosensible seleccionado de 1-35 tetradecanol, poli(N-isopropilacrilamida), ADN y heneicosano, preferiblemente heneicosano. Este recubrimiento actúa como puerta molecular termosensible.

El término “nanoestrella” se refiere a una agregación de nanopartículas donde la superficie exterior del agregado presenta estructuras conoidales terminadas en punta, dando lugar a una estructura de forma estrellada de tamaño nanométrico. En una realización preferida, el núcleo en forma de nanoestrella presenta una dimensión mayor promedio (distancia máxima entre dos extremos, o puntas más alejadas, de la nanoestrella) de entre 50 y 80 nm, medido por microscopía electrónica de transmisión (TEM).

El término “sílice mesoporosa” se utiliza con su significado ordinario en la técnica, es decir, un material de sílice (también llamado dióxido de silicio o SiO₂) que comprende mesoporos, que son poros en el rango de 2-50 nanómetros (tamaño de diámetro promedio del poro). La técnica utilizada para la medida de diámetro de poro promedio se denomina porosimetría, determinada por isotermia de adsorción-desorción de N₂.

- Las nanopartículas de la invención (núcleo y tres recubrimientos) presentan un diámetro promedio entre 400 y 500 nm determinado por dispersión dinámica de luz (DLS), dicho experimento es realizado dispersando 1 mg de las nanopartículas en 1 mL de agua deionizada, a pH neutro (7,0) a temperatura de 25°C.
- En una realización preferida, el núcleo en forma de nanoestrella recubierto de una capa de sílice presenta un diámetro promedio de entre 100 y 150 nm, medido por TEM.

En una realización preferida, el potencial zeta de las nanopartículas de la presente invención es negativo y está entre -19,2 y -23,8 mV. Dicho valor podría disminuir la interacción con los microorganismos (A.P. Ribeiro, et al. Antimicrobial photodynamic therapy against pathogenic bacterial suspensions and biofilms using chloro-aluminum phthalocyanine encapsulated in nanoemulsions. *Lasers Med Sci.* 2015;30: 549–559).

El término "potencial zeta (Z)" hace referencia a una medida de la carga superficial de las nanopartículas. El potencial zeta se determina para las nanopartículas en suspensión en un electrolito. En dicha suspensión se produce una distribución de iones del electrolito alrededor de la superficie de la nanopartícula. La determinación del potencial zeta permite estimar la carga superficial, esta técnica se puede utilizar para comprobar la estabilidad física de las nanopartículas (J. Jiang, G. Oberdörster, A. Elder, R. Gelein, P. Mercer, and P. Biswas, "Does nanoparticle activity depend upon size and

crystal phase?," Nanotoxicology, vol. 2, no. 1, pp. 33–42, 2008.). Un gran valor positivo o negativo del potencial zeta de las nanopartículas indica una buena estabilidad física de las nanopartículas, debido a la repulsión electrostática de las partículas individuales.

- 5 El potencial Z se midió mediante dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés de "Dynamic light Scattering"). La medida se realizó en una suspensión acuosa de las partículas (1 mg/mL) a pH neutro (pH=7), a temperatura de 25°C en un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) usando una cubeta de transmisión. La técnica consiste en someter la suspensión a un campo eléctrico y medir la velocidad de
10 desplazamiento de las partículas, bajo el efecto del campo eléctrico. El potencial zeta es una magnitud de atracción o repulsión de carga entre las partículas, exhibida por cualquier partícula en suspensión. En otras palabras, se trata de la diferencia de potencial a través de los límites de fase entre los sólidos y los líquidos. Al aplicar una diferencia de potencial eléctrico, se aplica un campo eléctrico controlado por medio de
15 electrodos inmersos en una muestra en suspensión; esto provoca que las partículas cargadas se muevan a través del electrodo de polaridad opuesta.

En un segundo aspecto, la invención se refiere al procedimiento de preparación de las nanopartículas descritas en el primer aspecto de la invención. Dicho procedimiento
20 comprende las siguientes etapas:

- a) sintetizar nanopartículas de oro (AuNsds),
- b) sintetizar nanoestrellas de oro (AuNST) a partir de las nanopartículas de oro
sintetizadas en la etapa a),
- c) recubrir las nanoestrellas de oro obtenidas en b) con sílice mesoporosa,
- 25 d) encapsular curcumina en el recubrimiento de sílice mesoporosa y recubrimiento de las nanopartículas que comprenden la curcumina encapsulada con octadeciltrimetoxisilano,
- e) recubrir las nanopartículas obtenidas en d) con un compuesto termosensible seleccionado de 1-tetradecanol, poli(N-isopropilacrilamida), ácido
30 desoxirribonucleico (ADN) y heneicosano, preferiblemente heneicosano.

Las AuNsds que se preparan en la etapa a) tienen un tamaño de diámetro promedio de entre 20 y 40 nm, medido por TEM . Para ello, ,en una realización preferida, las AuNsds se preparan en la etapa a) poniendo en contacto ácido cloroauríco HAuCl₄ y citrato sódico en agua a reflujo durante un tiempo de entre 15 a 20 minutos, preferiblemente
35

15 min. Seguidamente las AuNp se ponen en contacto con polivinilpirrolidona (PVP) a fin de obtener AuNP esféricas y se mantiene en agitación a temperatura ambiente (18-25°C) durante un tiempo entre 16 y 20h, preferiblemente 18h. Las AuNsds sintetizadas de recogen por centrifugación de la mezcla resultante de la reacción. Las proporciones más preferidas entre reactivos para esta etapa son las siguientes:

- 5
- 70 µL de HAuCl₄ en 100 mL de agua destilada
 - 15 mL de una solución acuosa de citrato sódico al 1%
 - 1 mL de solución acuosa de PVP a 500 mg/mL en 20 mL de una de suspensión de AuNsds.

10

En una realización preferida, las AuNST se preparan en la etapa b) poniendo en contacto PVP con una solución acuosa de HAuCl₄ y posterior adición de las AuNp obtenidas en la etapa a), manteniendo la mezcla bajo agitación a temperatura ambiente (18-25°C) durante un tiempo entre 20 y 26h, preferiblemente 24 h. Transcurrido este tiempo, las 15 AuNST se recogen por centrifugación. Las proporciones preferidas entre reactivos para esta etapa son las siguientes:

- 45 mL de una solución de DMF conteniendo 30 de PVP, con 150 µL de una solución acuosa de HAuCl₄
- Se añaden 5 mM de AuNsds en solución acuosa

20

En una realización preferida, para formar el recubrimiento de sílice mesoporosa en la etapa c), se pone en contacto una solución acuosa de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) con etanol bajo atmósfera de Argon (Ar), seguido de la adición de amoníaco y AuNST obtenidas en la etapa anterior. Posteriormente, se añadea la mezcla de reacción 25 ortosilicato de tetraetilo (TEOS) y la mezclas de reacción de mantiene en atmósfera inerte durante un tiempo entre 20 y 26h y una temperaturea de entre 23 y 28°C, preferiblemente, 24 horas a 25 °C. Transcurrido este tiempo, las nanopartículas recubiertas de sílice se centrifugan y se lavan con etanol. Preferiblemente, se realiza a continuación un proceso de extracción utilizando una solución etanólica de nitrato 30 amónico (NH₄NO₃) para eliminar las moléculas de CTAB restantes.Las proporciones preferidas entre reactivos:

- A 50 mL de una solución acuosa de CTAB a 6,6 mM se añaden 20 mL de etanol,
- 50 µL de una solución acuosa de amoniaco al 32% y 5 mM de AuSt,
- 40 µL de TEOS a la reacción.

35

En una realización preferida, a fin de incluir curcumina en la capa de sílice mesoporosa, se suspenden las nanopartículas obtenidas en la etapa c) en acetonitrilo (ACN) y se añade curcumina a la mezcla de reacción que se mantien bajo agitación durante un tiempo entre 50 minutos a 1h a una temperatura entre 23 y 25°C, preferiblemente, 5 durante 1 h a 25°C bajo agitación. Posteriormente, se añade octadeciltrimetoxisilano (OCT) a la solucioná fin de formar el recubrimiento de OCT. La mezcla con OCT se mantiene durante un tiempo entre 10 y 14h y a una temperatura de 23 a 28°C, preferiblemente 12 horas a 25 °C, bajo agitación. Transcurrido este tiempo, las partículas se centrifugan, se laven con con una solución acuosa de ACN y se secan al 10 vacío. Las proporciones preferidas entre reactivos:

- una solución madre de CUR diluida en acetonitrilo 1 mg/mL con 1 mg/mL de AuNst@mSiO₂
- 20 µL de OCT en 2 mL de solución CUR: AuNst@mSiO₂.

15 En una realización preferida, la etapa e) se lleva a cabo poniendo en contacto las nanopartículas obtenidas en la etapa d) con el compuesto termosensible, preferiblemente utilizando n-hexano como disolvente, y la mezcla se sometió a ultrasonidos durante un tiempo entre 40s y 1 min, preferiblemente 1 min y posterior agitación en una agitador tipo vórtex durante un tiempo ente 10 y 30s, preferiblemente 20 20s. La etapa de ultrasonidos y agitación en un agitador vórtex puede repetirse varias veces. Las proporciones preferidas entre reactivos:

- las nanopartículas cargadas con CUR en 10 mL de n-hexano.
- 1 mL de heneicosano o del compuesto termoestable de que se trate (20 mg/mL diluido en n-hexano).

25

La presente invención también se refiere a nanopartículas obtenidas mediante el procedimiento descrito anteriormente.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende las 30 nanopartículas descritas en el primer aspecto de la invención.

En una realización preferida, la composición es una composición farmacéutica.

La composición farmacéutica incluye preferentemente al menos un excipiente y/o 35 vehículo farmacéuticamente aceptable.

El “vehículo” o portador, es preferiblemente una sustancia inerte. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Por tanto, el vehículo es una sustancia que se emplea en el medicamento para diluir cualquiera de

5 los componentes de la composición farmacéutica de la presente invención hasta un volumen o peso determinado; o bien que aún sin diluir dichos componentes es capaz de permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma al medicamento. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacéuticamente aceptable es el diluyente.

10

El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de cualquiera de los componentes de la composición de la presente invención, estabiliza dichos componentes o ayuda a la preparación de la composición farmacéutica en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues,

15 los excipientes podrían tener la función de mantener los componentes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como, por ejemplo, el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora

20 para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo. Por tanto, el término “excipiente” se define como aquella materia que, incluida en las formas galénicas, se añade a los principios activos o a sus asociaciones para posibilitar su preparación y estabilidad, modificar sus propiedades organolépticas o determinar las propiedades

25 físicas-químicas de la composición farmacéutica y su biodisponibilidad. El excipiente “farmacéuticamente aceptable” debe permitir la actividad de los compuestos de la composición farmacéutica, es decir, que sea compatible con dichos componentes.

Además, como entiende el experto en la materia, el excipiente y el vehículo deben ser 30 farmacológicamente aceptables, es decir, que el excipiente y el vehículo estén permitidos y evaluados de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

Otro aspecto de la invención se refiere a las nanopartículas de la invención, o de una 35 composición que las comprende, para su uso como medicamento.

Otro aspecto de la invención se refiere a las nanopartículas de la invención, o de una composición que las comprende, para su uso en la liberación controlada de curcumina en presencia de radiación de luz en el infrarrojo cercano (NIR) de entre 180-3000nm de longitud de onda, preferiblemente de entre 600 y 900nm, más preferiblemente, 808 nm.

- 5 En presencia de esta radiación, las AuNSt transforman la luz en calor que es capaz de fundir el compuesto termosensible o cambiar la estructura en el caso del ADN, produciéndose así la liberación de la curcumina contenida en el interior de los poros.

Un último aspecto se refiere a las nanopartículas de la invención, o de una composición
10 que las comprende, para su uso en Terapia Fotodinámica antimicrobiana (aPDT), preferiblemente frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. La curcumina actúa como fotosensibilizador (FS). Una vez liberada la curcumina mediante irradiación de luz NIR, se lleva a cabo una irradiación con longitud de onda entre 410 a 466nm, preferiblemente 450nm (azul) que, en presencia de oxígeno, da lugar a la
15 producción de Especies Reactivas de Oxígeno capaces de producir muerte microbiana.

La terapia fotodinámica antimicrobiana combina el uso de un fármaco fotosensibilizante, la luz y el oxígeno para erradicar microorganismos patógenos

20 La principal ventaja de este sistema es la liberación controlada de curcumina bajo irradiación de luz NIR (permite liberar hasta alrededor del 89% de la curcumina presente en las nanopartículas en 30 min) y la posibilidad de usarlo en Terapia Fotodinámica antimicrobiana. Además, el compuesto termosensible también actúa como barrera protectora de la curcumina hasta que llega a las células microbianas, evitando su
25 degradación.

Las nanopartículas de la presente invención han demostrado tener ventajas de liberación controlada bajo irradiación NIR y entrega del FS en microorganismos.

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
35 que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1: Microscopía TEM (a) y Espectro de absorción UV-visible (b) de AuNsds

Fig. 2: Microscopía TEM (a) y Espectro de absorción UV-visible (b) de AuNSt

5 **Fig. 3:** Microscopía TEM (a) y Espectro de absorción UV-visible (b) de AuNSt@mSiO₂.

Fig. 4: Microscopía TEM (a) y Espectro de absorción UV-visible (b) de AuNSt@mSiO₂@CUR@paraffin.

Fig. 5: Espectro de absorción de curcumina.

Fig. 6: Fotoliberación de CUR de AuNSt@mSiO₂@CUR@paraffin, gráfico de dispersión

10 indica porcentaje de liberación de CUR en función del tiempo de radiación.

Fig. 7: Valores medios de UFC/mL de culturas planctónicas de (a) *S. aureus* y (b) *P. aeruginosa*. Barras de error: desvío estándar (n=12). Cantidad de UFC/mL en función de los grupos evaluados.

15 **EJEMPLOS**

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores.

20 **Materiales y Métodos**

Polivinil pirrolidona (PVP-MW 10000), citrato, oro auric-III-(HAuCl₄), citrato de sodio 1%, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), N,N-dimetilformamida (DMF), curcumina, tetraetil ortosilicato (TEOS), acetonitrilo (ACN), octadeciltrimetoxisilano (OCT) fueron
25 adquiridos por Sigma Aldrich.

Para la caracterización de las nanopartículas, se han utilizado los siguientes equipos:

Espectrofotómetro UV-Visible (JASCO V-630 Spectrophotometer, JASCO, Easton, USA), Fluorímetro (JASCO FP-8300, JASCO, Easton, EE.UU.), centrífuga (Eppendorf 5810 R) Láser NIR (desarrollado por el departamento de ingeniería de la Universitat

30 Politècnica de València), Luz LED azul a ~450 nm con potencia de 30 mW/cm² (Bulbs lighting. Co. Shenzhen, China).

Ejemplo 1: La síntesis de nanopartículas fotosensibles de la presente invención

El procedimiento de síntesis de las nanopartículas de la presente invención incluye cinco
35 pasos principales.

En el primer paso, se sintetizaron nanopartículas de oro (AuNp), también llamadas *nanoseeds*, mezclando 100 mL de agua deionizada con 70 μ L de ácido cloroaurico al 30% (HAuCl₄ 1,444 M). La mezcla se realizó en un matraz de doble cuello y fondo redondo utilizando un sistema de reflujo, que fue calentado a 100 °C, con agitación magnética 1200 rpm. Tras la ebullición de la mezcla, se añadieron 15 mL de una solución acuosa de citrato sódico (1%) añadidos por el lateral del matraz de dos bocas, la temperatura (100° C) y agitación magnética se mantuvieron durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se mantuvo la agitación magnética hasta que la mezcla se enfrió a temperatura ambiente.

10

Posteriormente, en otro matraz de fondo redondo, se añadieron 20 mL de AuNp y 1 mL de una solución acuosa de 500 mg/mL de polivinilpirrolidona (PVP, M=10.000 g/mol). La solución se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente. Finalmente, las AuNp se centrifugaron a 10.000 rpm durante 20 minutos a 25 °C, el precipitado -pellet- (AuNp) se resuspendió en 1,5 mL de etanol 99%. Las AuNp producidas con tamaño de 31,1 nm (Figura 1a), se observó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). La dispersión dinámica de luz (DLS) mostró AuNp con un rango de tamaño de 48,1 a 75,57 nm. En la caracterización del espectro de absorción UV-visible, se observó un máximo de absorción a 520 nm (Figura 1b).

20

En el segundo paso, se realizó el crecimiento de nanoestrellas de oro (AuNSt) utilizando una solución concentrada de 45 g de PVP diluida en 150 mL de dimetilformamida, en la que se mezclaron 750 μ L de una solución acuosa de HAuCl₄ (166 mM). Despues de 5 minutos, se añadieron 50 μ L del AuNp en concentración de 6,5 mM sintetizado previamente. La reacción se mantuvo 24 horas sin agitación y a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, las AuNSt se lavaron 5 veces por centrifugación (9.500 rpm durante 20 minutos) y resuspensión en agua deionizada. Las AuNSt observadas por TEM mostraron la formación de estructuras con tamaños comprendidos entre 55,1 y 74 nm (Figura 2a). El tamaño determinado por DLS osciló entre 124 y 175,5 nm. En el espectro de absorción, la banda de las nanoestrellas se situaba entorno a 803 nm (Figura 2b).

En el tercer paso, se sintetizaron las nanopartículas de sílice mesoporosa (AuNSt@mSiO₂). Para ello, en un matraz de doble cuello y fondo redondo se utilizaron 50 mL de solución acuosa de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB 6,6 mM) con 20 mL

de etanol. En esta solución, se burbujeó gas argón (Ar) durante 1 hora bajo agitación magnética a 400 rpm y 25 °C. Después de este tiempo, se añadieron al matraz redondo 50 µl de amoníaco al 32% y 3 mL de suspensión de AuNSt (5mM). Después de 5 minutos, se gotearon 40 µL de ortosilicato de tetraetilo (TEOS) en la mezcla. La reacción 5 se mantuvo en atmósfera inerte durante 24 horas a 25 °C y agitación magnética a 400 rpm. Transcurrido este tiempo, las nanopartículas se centrifugaron (10 minutos, 9.500 rpm) y se lavaron dos veces con etanol (99%). Por último, se realizó un proceso de extracción utilizando una solución etanólica de nitrato amónico (-NH₄NO₃- 10 mg/mL) y se eliminaron las moléculas de CTAB restantes. Las nanopartículas se lavaron 10 veces 10 utilizando la disolución etanólica de NH₄NO₃ y se secaron al vacío y a temperatura ambiente. El tamaño de las AuNSt@mSiO₂ observado por TEM fue de 122 nm (Figura 3a). Por DLS el tamaño de las nanopartículas oscilaba entre 216,4 y 338,2 nm y el valor 15 del índice de polidispersión (PDI) osciló entre 0,049 y 0,385 unidades arbitrarias (u.a.). El potencial zeta de la formulación se evaluó antes de la extracción con CTAB (rango de +29,2 a +47,8 mV) y después de la extracción con CTAB (de -25,7 a -32,9 mV). Además, se observó el espectro de absorción máximo alrededor de 803 nm (Figura 3b).

En la etapa 4, se cargó la curcumina (CUR) en las nanopartículas. Para ello se suspendieron 2 mg de AuNSt@mSiO₂ en 2 mL de acetonitrilo (ACN). A continuación, se 20 añadió 1 mg de CUR y la mezcla se mantuvo durante 1 h a 25°C bajo agitación magnética a 400 rpm. Posteriormente, se añadieron 20 µL de octadeciltrimetoxisilano (OCT) a la solución. La mezcla se mantuvo durante 12 horas a 25 °C bajo agitación magnética a 400 rpm. Transcurrido este tiempo, las partículas se centrifugaron y se lavaron dos veces con una solución acuosa de ACN al 0,5%. Por último, las partículas 25 se secaron al vacío.

En el paso 5, se incluyó la puerta de heneicosano (también denominado parafina) en el sistema. Para ello, las nanopartículas se diluyeron en 10 mL de *n*-hexano, seguido de 1 mL de una solución de heneicosano diluida en *n*-hexano (20 mg/mL). Las 30 nanopartículas se dispersaron 1 minuto en ultrasonidos y se agitaron en un "vórtex" durante 20 segundos; este procedimiento se repitió durante 30 minutos. Las imágenes TEM mostraron que el tamaño de las nanopartículas aumentó hasta 131 nm (Figura 4a).

Este aumento de tamaño también se verificó mediante DLS, que mostró que el tamaño 35 de las nanopartículas oscilaba entre 402 y 484,4 nm. Los valores de PDI observados en

esta fase de la síntesis oscilaron entre 0,092 y 0,192, mientras que el potencial zeta osciló entre -19,2 y -23,8 mV. Por último, el espectro de absorción se situó en torno a 803 nm (Figura 4b).

5 **Ejemplo 2: Evaluación de la capacidad de las nanopartículas de la invención para cargar la CUR**

Se evaluó la capacidad de esta formulación para cargar la CUR. Para ello, se calentó una solución acuosa de 500 mg/mL de AuNSt@mSiO₂@CUR@parafina (sintetizadas en el ejemplo 1) mediante agitación magnética a 60 °C y 1200 rpm durante 60 horas.

10 Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5 minutos a 5 °C, el *pellet* (CUR) fue solubilizado en ACN y su absorción fue determinada utilizando un espectrofotómetro UV-visible a 425 nm. Los valores observados se situaron entre 0,218 y 0,265 u.a. (figuras 5a y b), correspondientes a 2,3 µg/mL y 2,7 µg/mL de CUR en el interior de las nanopartículas de mSiO₂.

15

Ejemplo 3: Fotoliberación de CUR de las nanopartículas

La fotoliberación de CUR de las nanopartículas sintetizadas en el ejemplo 1 se llevó a cabo utilizando un aparato de luz láser con una longitud de onda de 808 nm fabricado por el Instituto de Investigación Molecular de la Universitat Politècnica de València. Las

20 muestras de nanopartículas (500 mg/mL) cargadas con CUR se irradiaron con el aparato de luz durante 0,5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos. Tras cada periodo de irradiación, las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5 minutos a 5°C, y la fluorescencia del sobrenadante se leyó a 498 nm. Las muestras no irradiadas permanecieron en la oscuridad como grupo de control. La figura 6 muestra que la liberación máxima de CUR

25 de las nanopartículas fue del 89,1%.

Ejemplo 4: Uso de las nanopartículas de la presente invención como fotosensibilizador (FS) en Terapia Fotodinámica antimicrobiana

Las nanopartículas sintetizadas en el ejemplo 1 se utilizaron como fotosensibilizador (FS) en Terapia Fotodinámica antimicrobiana (aPDT) contra cultivos planctónicos de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Cada microorganismo se cultivó en un medio de cultivo específico (caldo Müller Hinton Broth y Luria Bertoni para *S. aureus* y *P. aeruginosa*, respectivamente) y se estandarizó el inóculo en 4,72x10⁷(±3,9x10⁶) y 6,97x10⁷(±7,52x10⁶) unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

Para cada microorganismo en cultivos planctónicos, se evaluaron tres concentraciones diferentes (500, 50 y 5 µg/mL) de AuNSt@mSiO₂@CUR@parafina, para lo cual 100 µL de FS y 100 µL de suspensión microbiana se mantuvieron en la oscuridad durante 5 minutos. A continuación, cada muestra se irradió con luz láser de 808 nm durante 20 5 minutos, inmediatamente, se realizó una segunda irradiación, sin embargo, esta segunda irradiación se realizó utilizando un dispositivo de diodo emisor de luz azul (~450 nm) (LED, potencia de 30 mW/cm², Illumination Bulbs. Co. Shenzhen, China) durante 20 minutos, correspondiente a 36 J/cm² para generar especies reactivas de oxígeno responsables de la fotoinactivación microbiana (grupos aPDT).

10

Las muestras de control incluían: suspensiones bacterianas sometidas únicamente a irradiación láser con y sin nanopartículas cargadas con CUR (grupos PS- L+ y PS+ L+, respectivamente). Otro grupo fue tratado únicamente con luz láser sin AuNSt@mSiO₂@CUR@parafina (grupo L+).

15

El efecto de AuNSt@mSiO₂@CUR@paraffin se evaluó con la irradiación LED azul (LED+ PS+). También se evaluó el efecto de la luz LED sin ningún tipo de nanopartícula (grupo LED+). Por último, el grupo de control general del crecimiento bacteriano no recibió ningún tratamiento (grupo de control).

20

Las muestras sometidas a aPDT con 500 µg/mL del FS mostraron reducciones medias de 3,15 y 2,18 log₁₀(UFC/mL) de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, respectivamente, en comparación con las muestras sin tratar (control). Las muestras sometidas a aPDT con 50 µg/mL de FS demostraron una reducción de 1,5 log₁₀ (UFC/mL) para *S. aureus*, 25 mientras que para *P. aeruginosa* no se observó ninguna disminución en el recuento de colonias. La aPDT con 5 µg/mL de PS no fue eficaz para ninguno de los dos microorganismos.

30

No se observó ninguna disminución de la viabilidad microbiana en los grupos tratados únicamente con láser o LED, así como en las muestras tratadas con nanopartículas iluminadas únicamente con láser o LED, ya que estos grupos mostraron valores de UFC/mL similares a los del grupo de control (sin ningún tratamiento). Las figuras 7a y 7b muestran los resultados encontrados para *S. aureus* y *P. aeruginosa* respectivamente.

35

REIVINDICACIONES

1. Nanopartículas para la liberación controlada de curcumina que comprenden:

- un núcleo formado por agregación de nanopartículas de oro donde dicho agregado
5 presenta forma de nanoestrella,

- un primer recubrimiento del núcleo, donde dicho primer recubrimiento está formado
por una capa de sílice mesoporosa donde la curcumina se encuentra encapsulada o
embebida,

-un segundo recubrimiento formado por una capa de octadeciltrimetoxisilano, el cual se
10 encuentra recubriendo la capa de sílice porosa,

- un tercer recubrimiento que recubre la capa de octadeciltrimetoxisilano, donde dicho
tercer recubrimiento está formado por un compuesto termosensible seleccionado de 1-
tetradecanol, poli(N-isopropilacrilamida), ácido desoxirribonucleico (ADN) y
heneicosano.

15

2. Nanopartículas, según reivindicación 1, cuyo diámetro promedio está entre 400 y 500
nm, determinado por dispersión dinámica de luz (DLS).

3. Nanopartículas, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada

20 porque presentan un potencial zeta negativo entre -19,2 y -23,8 mV.

4. Procedimiento para la preparación de las nanopartículas descritas en cualquiera de
las reivindicaciones 1 a 3, que comprende:

a) sintetizar nanopartículas de oro,

25 b) sintetizar nanoestrellas de oro a partir de las nanopartículas de oro sintetizadas
en la etapa a),

c) recubrir las nanoestrellas de oro obtenidas en la etapa b) con una capa de sílice
mesoporosa,

d) encapsular curcumina en la capa de sílice mesoporosa de la etapa c) y recubrir
30 la capa que comprende la curcumina encapsulada con octadeciltrimetoxisilano,

e) recubrir la capa obtenida en d) con un compuesto termosensible seleccionado
de 1-tetradecanol, poli(N-isopropilacrilamida), ADN y heneicosano.

5. Procedimiento, según reivindicación 4, donde las nanopartículas de oro se preparan

35 en la etapa a) poniendo en contacto ácido cloroauríco (HAuCl_4) y citrato sódico en agua
a reflujo durante un tiempo de entre 15 y 20 min; seguidamente las nanopartículas de

oro se ponen en contacto con polivinilpirrolidona (PVP) y se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante un tiempo entre 16y 20h.

6. Procedimiento, según reivindicación 4 o 5, donde las nanoestrellas de oro se preparan
5 en la etapa b) poniendo en contacto polivinilpirrolidona con una solución acuosa de HAuCl₄ y posterior adición de las nanopartículas de oro obtenidas en la etapa a), manteniendo la mezcla bajo agitación a temperatura ambiente durante un tiempo entre 20 y 26h.
- 10 7. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, donde, para preparar el recubrimiento de sílice mesoporosa en la etapa c), se pone en contacto una solución acuosa de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) con etanol bajo atmósfera de Argon, seguido de la adición de amoníaco y AuNSt obtenidas en la etapa b), seguidamente se añade a la mezcla de reacción ortosilicato de tetraetilo (TEOS) y la mezcla de reacción
15 se mantiene en atmósfera inerte durante un tiempo entre 20 y 26h y una temperatura de entre 23 y 28°C.
- 20 8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, donde la curcumina se encapsula poniendo en contacto las nanopartículas obtenidas en la etapa c) con curcumina utilizando acetonitrilo como disolvente y manteniendo la mezcla de reacción bajo agitación durante un tiempo entre 50 minutos a 1h a una temperatura entre 23 y 25°C; posteriormente, se añade octadeciltrimetoxisilano (OCT) a la solución para formar el recubrimiento de OCT, la mezcla con OCT se mantiene durante un tiempo entre 10 y 14h y a una temperatura de 23 a 28°C.
25
- 25 9. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, donde el rebrimiento de la etapa e) se lleva a cabo poniendo en contacto las nanopartículas obtenidas en la etapa d) con el compuesto termosensible, preferiblemente utilizando n-hexano como disolvente, y la mezcla se somete a ultrasonidos durante un tiempo entre 40s y 1 min, y
30 posterior agitación en una agitador tipo vórtex durante un tiempo entre 10 y 30s.
10. Composición que comprende las nanopartículas descritas en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 35 11. Nanopartículas descritas en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una

composición que las comprende descrita en la reivindicación 10, para su uso como medicamento.

12. Nanopartículas descritas en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una
5 composición que las comprende descrita en la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento y/o prevención de una infección bacteriana.

13. Nanopartículas o composición para su uso, según reivindicación 12, donde el tratamiento y/o la prevención se realiza mediante la liberación controlada de curcumina
10 por irradiación con luz en el IR cercano.

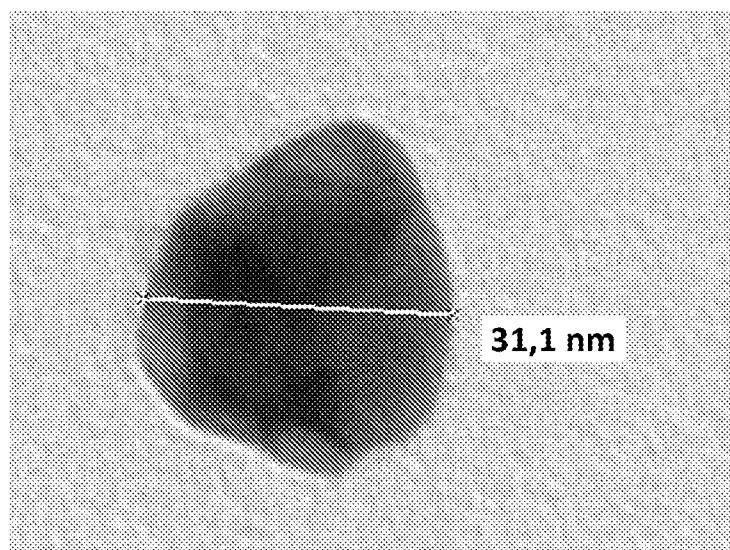
14. Nanopartículas descritas en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una composición que las comprende descrita en la reivindicación 10, para su uso en Terapia Fotodinámica antimicrobiana (aPDT).

15
15. Nanopartículas o composición para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, frente a infecciones de *Staphylococcus aureus* o *Pseudomonas aeruginosa*.

16. Nanopartículas o composición para su uso, según reivindicación 14 o 15, donde la
20 aPDT que comprende la irradiación de las nanopartículas con luz de longitud de onda de IR cercano para liberar la curcumina y, una vez liberada la curcumina, posterior irradiación con luz de longitud de onda de entre 410 a 466 en presencia de oxígeno para da lugar a la producción de especies reactivas de oxígeno capaces de producir muerte microbiana.

25

a)



b)

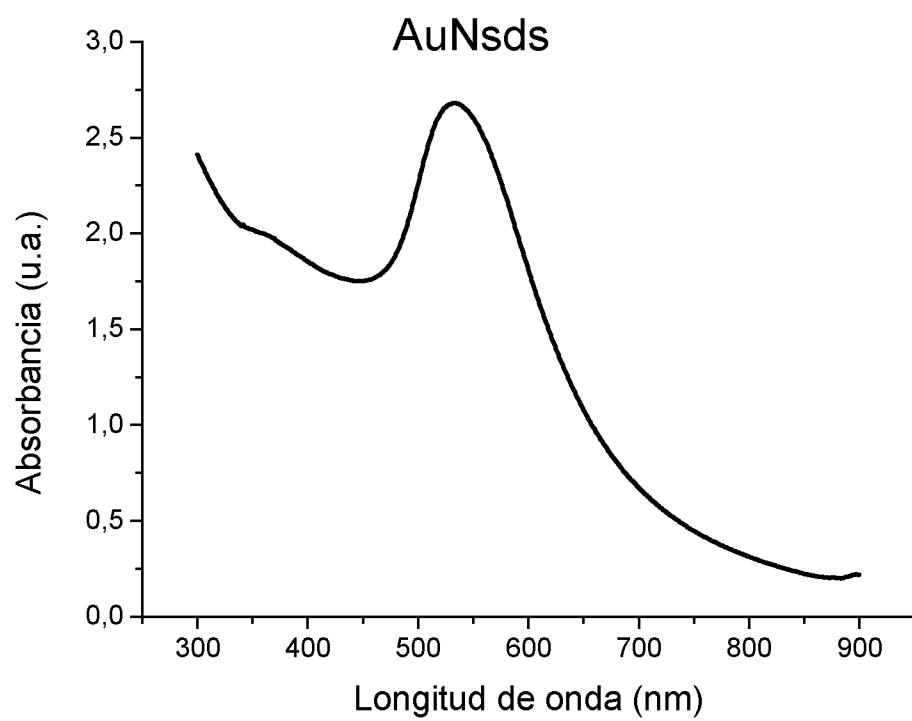
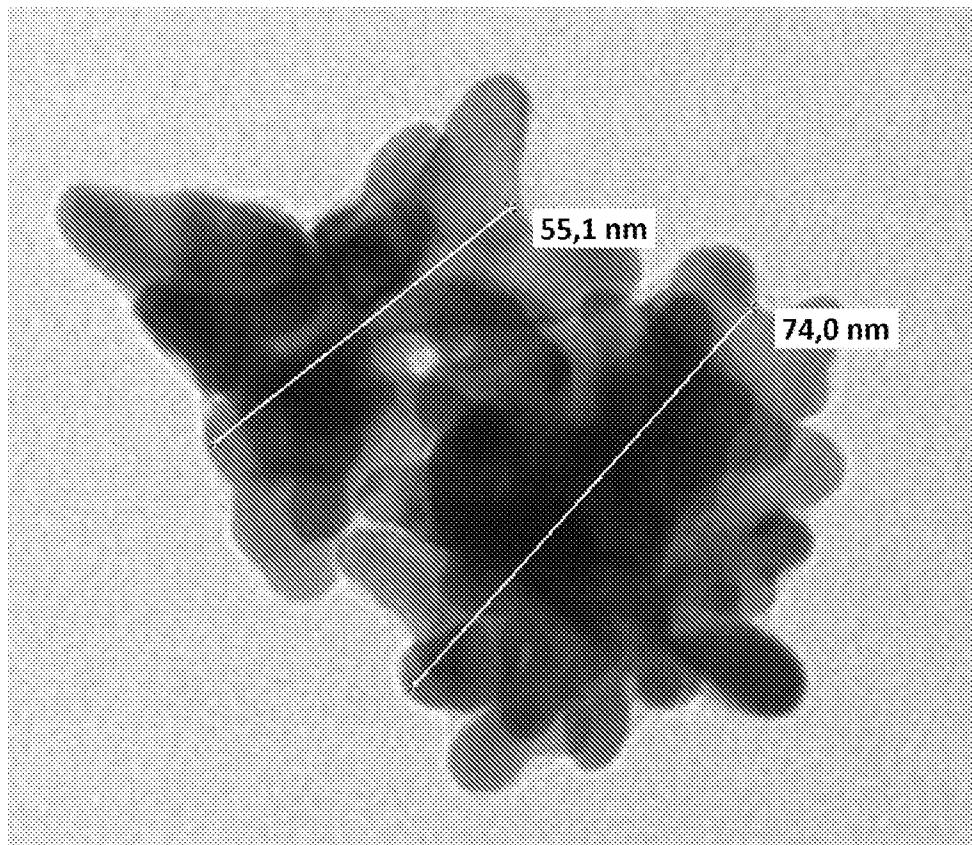


Fig. 1

a)



b)

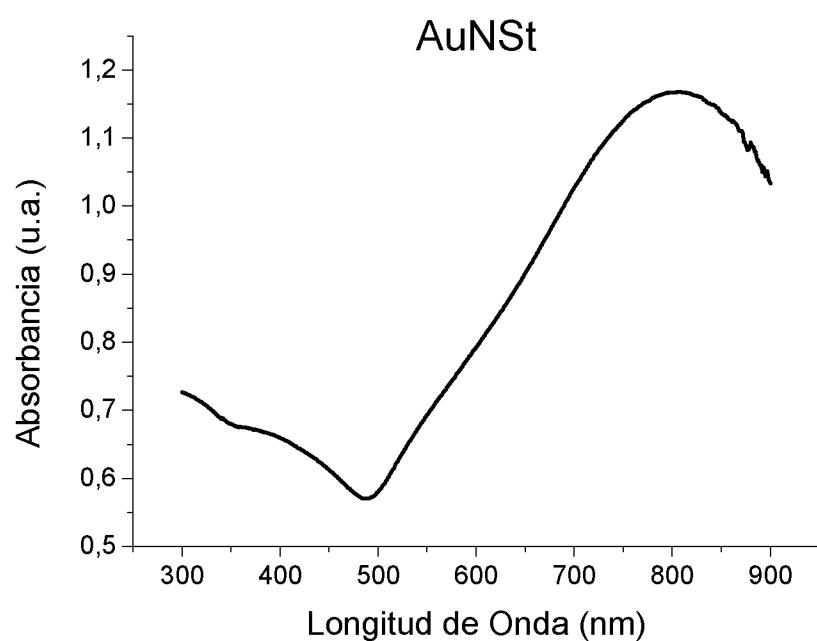
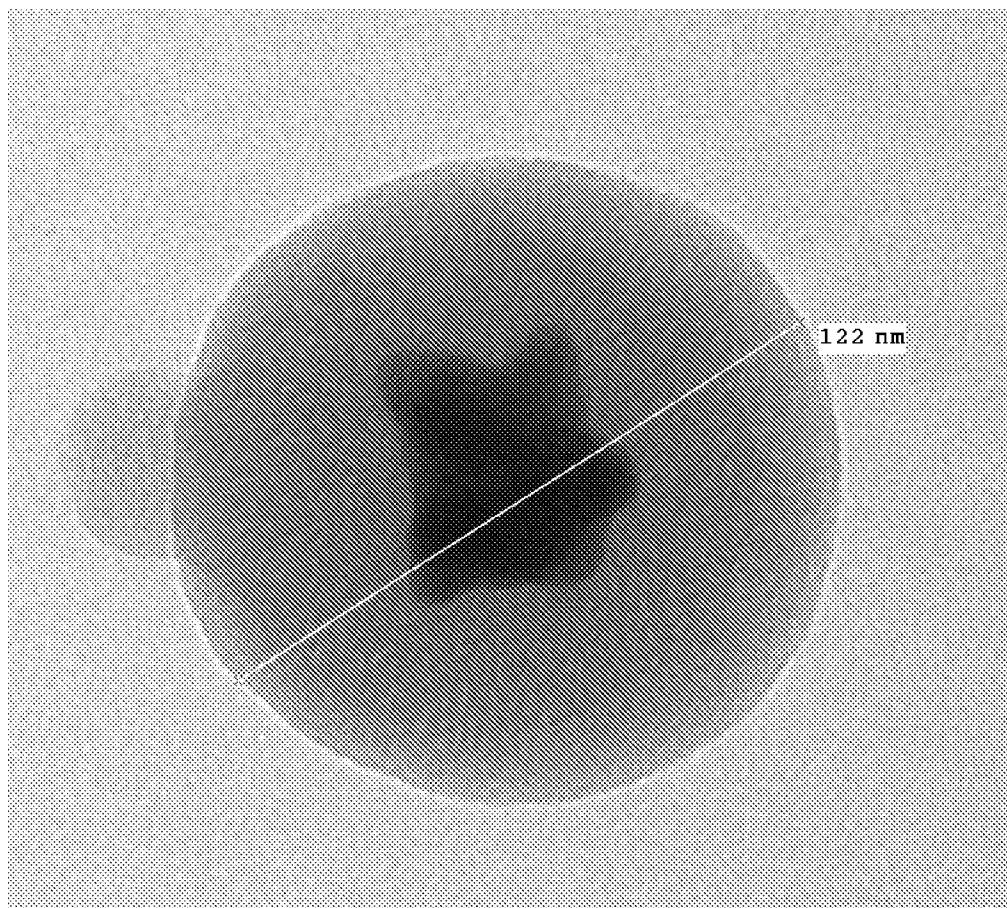


Fig. 2

a)



b)

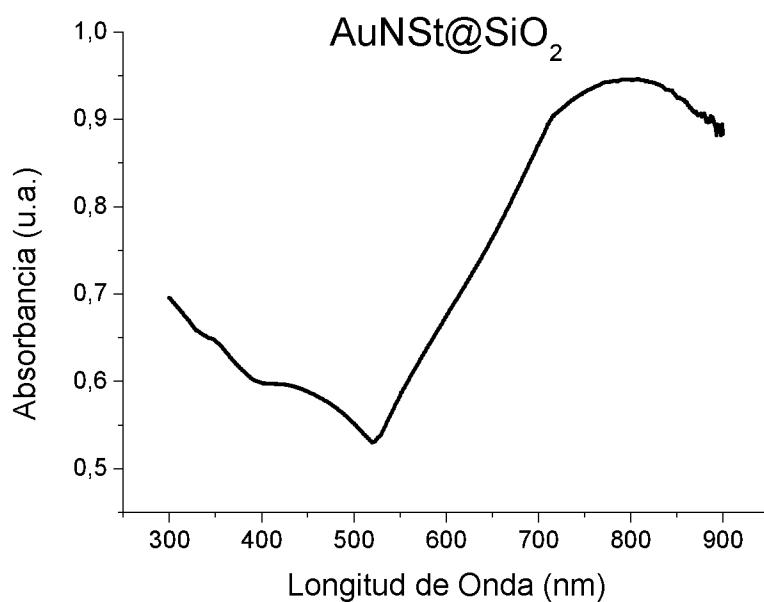
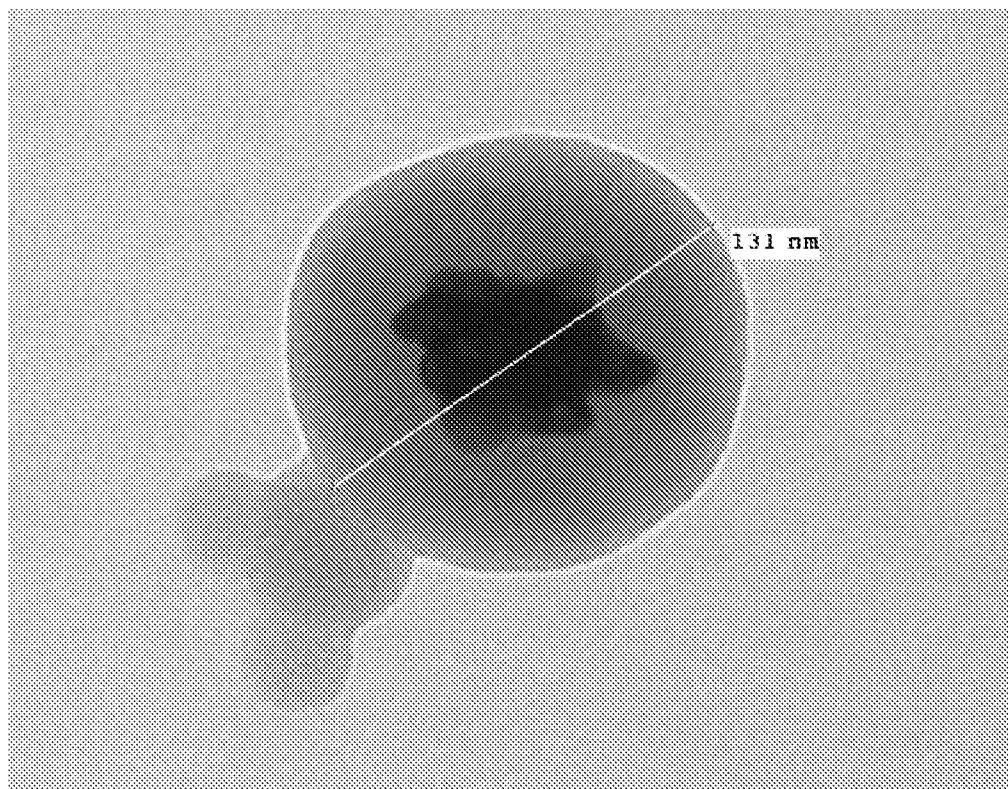


Fig. 3

a)



b)

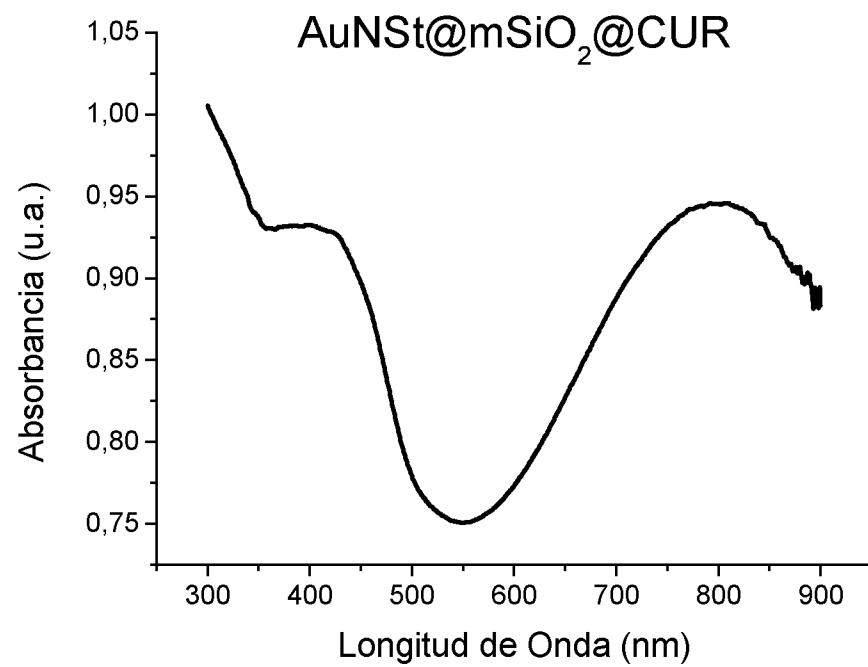


Fig. 4

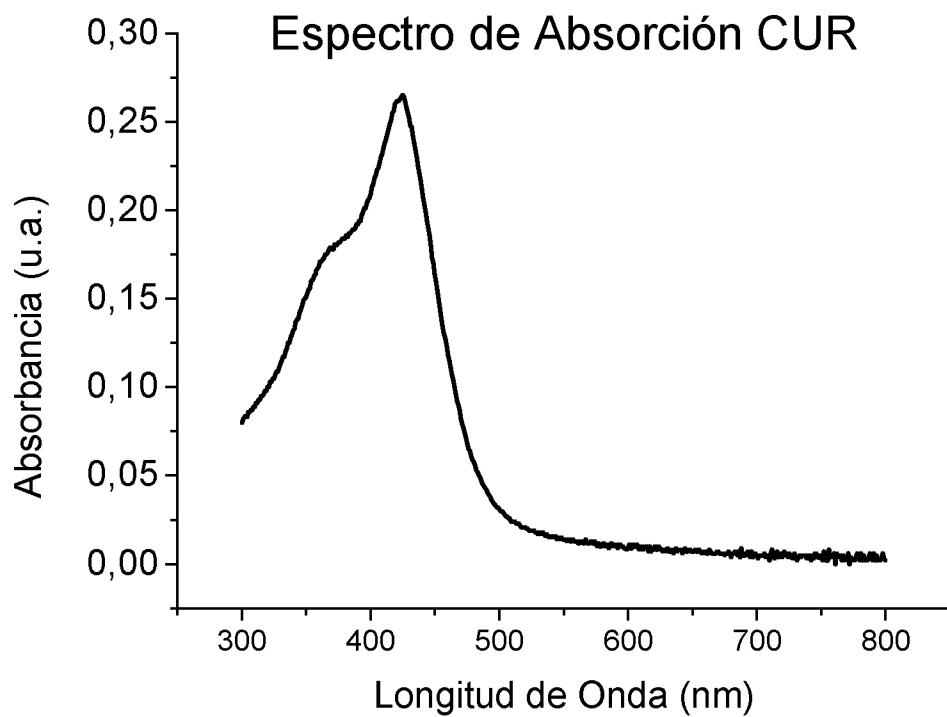


Fig. 5

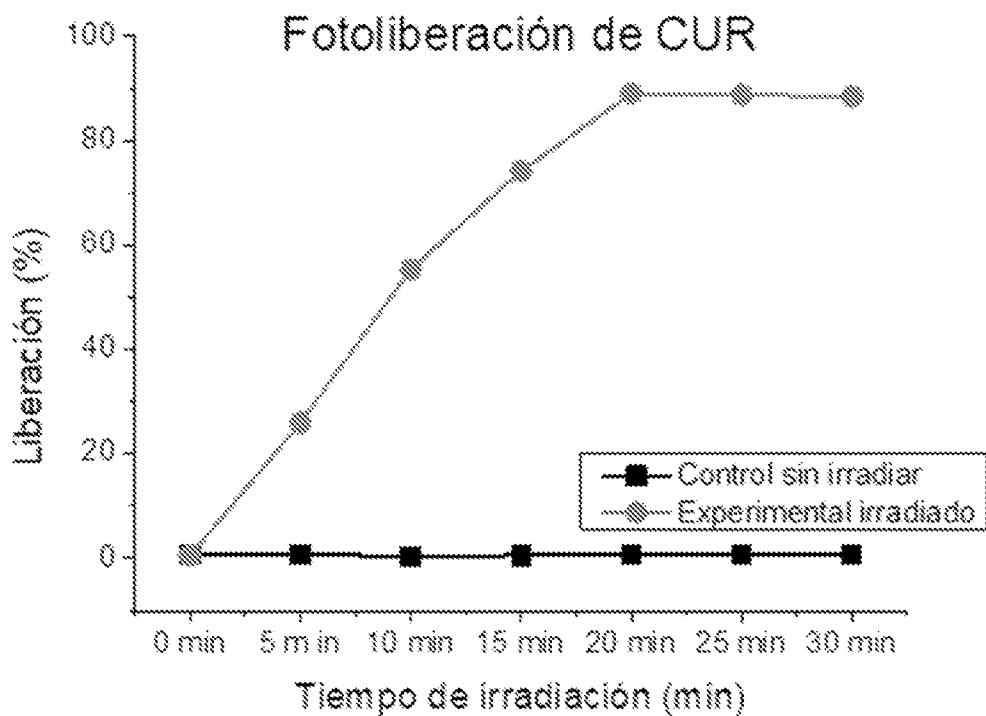
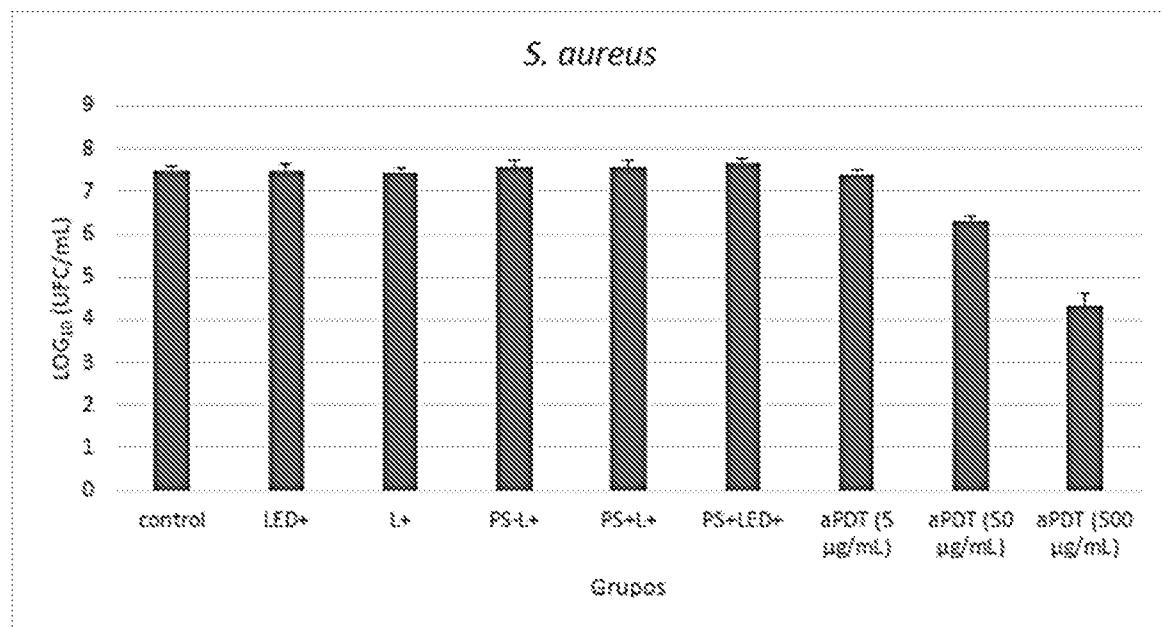


Fig. 6

a)



b)

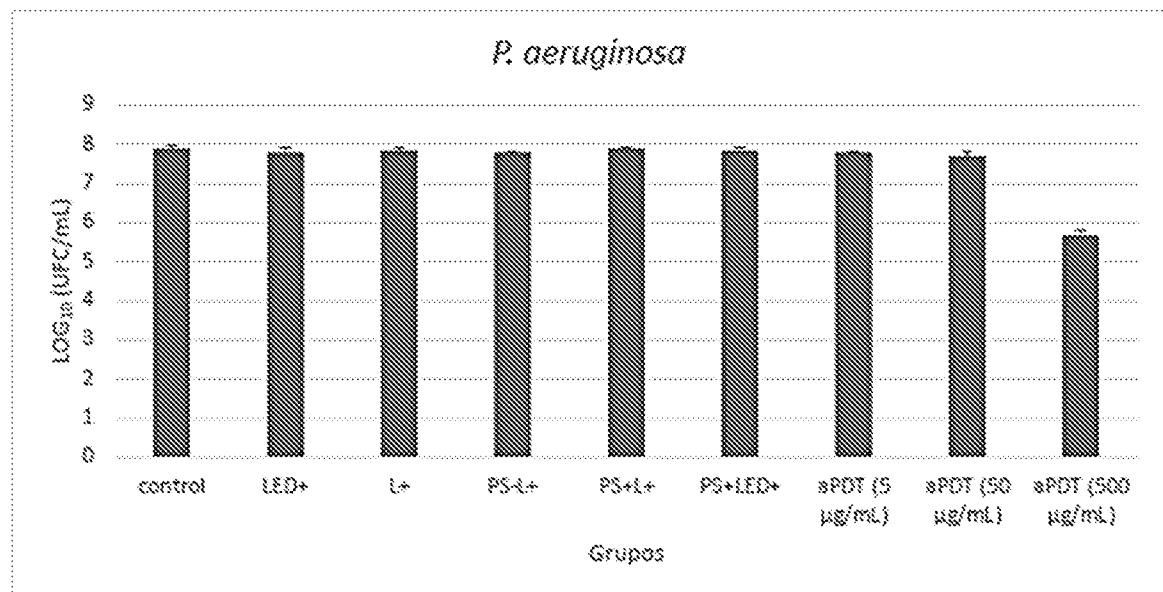


Fig. 7



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 202330901

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 03.11.2023

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(5) Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	66) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MIRZAHOSEINIPOUR MAHTAB et al. Antimicrobial photodynamic and wound healing activity of curcumin encapsulated in silica nanoparticles... Photodiagnosis and photodynamic therapy Netherlands Mar 2020. , 29/02/2020, Vol. 29, Páginas 101639, ISSN 1873-1597 (Electronic), <DOI: doi:10.1016/j.pdpdt.2019.101639 pubmed: 31899378>. Todo el documento	1-16
A	TRIGO GUTIERREZ JEFFERSSON KRISHAN et al. Encapsulation of curcumin in polymeric nanoparticles for antimicrobial Photodynamic Therapy. PLoS One NOV 6 2017. , 06/11/2017, Vol. 12, Nº 11, Páginas Article No.: e01 87418, ISSN 1932-6203(print) ISSN 1932-6203(electronic). <DOI: doi:10.1371/journal.pone.0187418>. todo el documento	1-16
A	TRIGO-GUTIERREZ JEFFERSSON KRISHAN et al. Antimicrobial Activity of Curcumin in Nanoformulations: A Comprehensive Review. International journal of molecular sciences Switzerland 01 Jul 2021. , 01/07/2021, Vol. 22, Nº 13, ISSN 1422-0067 (Electronic), <DOI: doi: 10.3390/ijms22137130 pubmed: 34281181>. Apartado "3.8. CUR with Metallic Nanoparticles" página 32. Apartado "3.9. CUR in Mesoporous Particles"	1-16
A	SAKIMA VINICIUS TATSUYUJI et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy Mediated by Curcumin-Loaded Polymeric Nanoparticles in a Murine Model of Oral Candidiasis. Molecules (Basel, Switzerland) Switzerland 19 Aug 2018., 19/08/2018, Vol. 23, Nº 8, ISSN 1420-3049 (Electronic), <DOI: doi:10.3390/molecules23082075 pubmed:30126245>. todo el documento	1-16
A	HERNANDEZ MONTOTO ANDY et al. Gold Nanostars Coated with Mesoporous Silica Are Effective and Nontoxic Photothermal Agents Capable of Gate Keeping and Laser-Induced Drug Release. ACS applied materials & interfaces United States 22 Aug 2018. , 22/08/2018, Vol. 10, Nº 33, Páginas 27644 - 27656, ISSN 1944-8252 (Electronic), <DOI: doi:10.1021/acsami.8b08395 pubmed: 30040374>. todo el documento	1-16
A	HOU J et al. Fabrication of mesoporous silica-covered gold nanostars for chemophototherapy. Journal of Industrial and Engineering Chemistry 20221025 Korean Society of Industrial Engineering Chemistry kor. , 25/10/2022, Vol. 114, Páginas 115 - 125, ISSN 1226-086X (print) ISSN 2234-5957 (electronic), <DOI: doi:10.1016/j.jiec.2022.06.037>. todo el documento	1-16

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 08.03.2024	Examinador E. Albarrán Gómez	Página 1/2
--	---------------------------------	---------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K41/00 (2020.01)
A61K36/9066 (2006.01)
A61K31/12 (2006.01)
A61K9/51 (2006.01)
A61P31/04 (2006.01)
A61K47/00 (2006.01)
B82B1/00 (2006.01)
B82Y5/00 (2011.01)

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

A61K, A61P, 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, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, NPL, COMPENDEX, INSPEC