

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 464**

21 Número de solicitud: 201500669

51 Int. Cl.:

A61K 47/10 (2007.01)

A61K 9/51 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

C08K 3/10 (2006.01)

C08L 83/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

16.09.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

20.04.2017

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

22.03.2018

Fecha de concesión:

25.05.2018

45 Fecha de publicación de la concesión:

01.06.2018

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2016/070642

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ (70.0%)

Plaza de San Diego, s/n

28801 Alcalá de Henares (Madrid) ES y

FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN

BIOMEDICA DEL HOSPITAL GREGORIO

MARAÑON (30.0%)

72 Inventor/es:

DE LA MATA DE LA MATA, Francisco Javier;

GÓMEZ RAMÍREZ, Rafael;

SÁNCHEZ-NIEVES FERNÁNDEZ, Javier;

PEÑA GONZÁLEZ, Cornelia E.;

COPA PATIÑO, José Luis;

SOLIVERI DE CARRANZA, Juan;

PÉREZ SERRANO, Jorge;

MUÑOZ FERNÁNDEZ, M. Ángeles;

JIMÉNEZ FUENTES, José Luis y

GARCÍA BRONCANO, Pilar

54 Título: **Nanopartículas metálicas esestabilizadas con dendrones carbosilano y sus usos**

57 Resumen:

Nanopartículas metálicas estabilizadas con dendrones carbosilano y sus usos.

La invención se refiere a nanopartículas metálicas, preferentemente de oro y plata, estabilizadas con dendrones, de estructura carbosilano y funcionalizadas en su periferia con grupos aniónicos o catiónicos, que dan a la nanopartícula una carga neta negativa o positiva, respectivamente. Estas nanopartículas han sido sintetizadas por reducción de un precursor metálico en presencia de cuñas dendríticas o por sustitución de ligandos ya presentes en nanopartículas metálicas por dendrones carbosilano. Además, la invención se refiere a su procedimiento de obtención y sus usos en biomedicina.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP 11/1986.

ES 2 609 464 B2

DESCRIPCIÓN

NANOPARTÍCULAS METÁLICAS ESTABILIZADAS CON DENDRONES
CARBOSILANO Y SUS USOS

La presente invención se refiere a nanopartículas metálicas, principalmente de oro y
 5 plata, recubiertas en su superficie con moléculas dendríticas, particularmente dendrones,
 de estructura carbosilano y funcionalizados en su periferia con grupos funcionales que
 preferiblemente están en forma aniónica o catiónica. La presente invención también se
 refiere al procedimiento de obtención de las nanopartículas a partir de los precursores
 metálicos y los correspondientes dendrones carbosilano o a partir de nanopartículas con
 10 ligandos estabilizadores y dendrones carbosilano. Además, la invención se refiere a los
 usos de dichos compuestos en biomedicina.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

15 Las nanopartículas (NP) de metales exhiben propiedades físicas, químicas y biológicas,
 intrínsecas a su tamaño nanométrico. Pueden ser producidas con distintos tamaños y
 formas y ser fácilmente funcionalizadas con un amplio abanico de sistemas para su
 aplicación en el campo de la biomedicina (A. El-Ansary, S. Al-Daihan. *J. Toxicol.* **2009**,
 2009, 754810:1). Entre ellas destacan de manera especial las de oro (AuNP) (C. M.
 20 Cobley, J. Chen, E. C. Cho, L. V. Wang, Y. Xia. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 44) y en
 menor medida las de plata (AgNP) (Z. Huang, X. Jiang, D. Guo, N. Gu. *J. Nanosci.*
Nanotechnol. **2011**, 11, 9395; A. Haider, I.-K. Kang. *Adv. Mat. Sci. Eng.* **2015**, 165257).

El oro es básicamente inerte y menos citotóxico que otros metales y sus NP se han
 25 utilizado en diferentes aplicaciones como transporte de fármacos y material genético (D.
 Pissuwan, T. Niidome, M. B. Cortie. *J. Contr. Release* **2009**, 149, 65). Para ello, es
 importante recubrir la NP adecuadamente para que de lugar a una interacción idónea con
 el material a transportar, así como facilitar su circulación in vivo o dirigirlas a su zona de
 acción (R. A. Petros, J. M. DeSimone. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, 9, 615).

30 Respecto a las nanopartículas de plata (AgNP), éstas presentan un amplio espectro
 como agentes antibacterianos (M. E. Quadros, L. C. Marr. *Environ. Sci. Technol.* **2011**,
 45, 10713; T. Faunce, A. Watal. *Nanomedicine (London, U.K.)* **2010**, 5, 617) y se
 emplean en la actualidad en diversos productos médicos y de consumo general como

pulverizadores antisépticos y recubrimientos antimicrobianos, estando presentes incluso en tejidos con propiedades bactericidas (<http://www.nanotechproject.org/cpi/>).

Las NP metálicas de oro y plata, son estabilizadas de manera habitual con ligandos que contienen una función tioéter que se une directamente a la superficie metálica, mientras que la función adicional se encontraría en el otro extremo de la molécula. Otras funciones empleadas en la estabilización pueden ser aminas y fosfinas. La síntesis de NPs (Au y Ag) con funciones activas se realiza siguiendo dos protocolos principales, aunque en ambos se lleva a cabo la reducción de los precursores metálicos. En el primero de ellos, la reducción con un agente reductor se realiza en presencia de ligandos estabilizadores como citrato o tiolalcanos (estas NPs son comerciales), y a continuación se produce la sustitución de estos ligandos estabilizadores por los de interés. En el segundo, la reducción del precursor se lleva a cabo en presencia del ligando de interés. De esta manera, se simplifica el proceso.

Un tipo de moléculas que se ha utilizado recientemente para estabilizar NP, y que además tiene un atractivo específico para aplicaciones biomédicas, son las moléculas dendríticas (G. R. Newkome, C. D. Shreiner. *Polymer* **2008**, 49, 1; J. M. J. Fréchet, D. A. Tomalia. *Dendrimers and Other Dendritic Polymers VCH, Weinheim* **2002**). Las moléculas dendríticas, dendrímeros y dendrones, son moléculas hiperramificadas de construcción arborescente, de tamaño y estructura tridimensional bien definidos y que poseen unas propiedades químicas uniformes debidas en parte a su baja polidispersidad como consecuencia de su síntesis controlada. Los dendrímeros presentan una topología molecular esférica, principalmente en generaciones mayores, mientras que los dendrones su topología es de cono o cuña. En ambos casos, se encuentra una superficie que contiene los grupos activos de estas moléculas. Además, en el caso de los dendrones, éstos presentan una posición adicional denominada punto focal, que puede servir para introducir una nueva función activa o como anclaje a otros sistemas, como por ejemplo a NPs. Como se ha comentado anteriormente, la presencia de un grupo tiol en dicho punto focal sería de interés para la funcionalización de estas NPs.

Tanto dendrímeros (E. Boisselier, D. Astruc. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 1759) como dendrones (T. J. Cho, R. A. Zangmeister, R. I. MacCuspie, A. K. Patri, and V.A. Hackley. *Chem. Mat.* **2011**, 23, 2665) se han empleado para estabilizar NPs metálicas mediante

los grupos de la periferia o el punto focal. Las principales funciones presentes para conseguir la estabilización son grupos tiol, amino o fosfinas

Los dendrímeros y dendrones por sí mismos pueden tener actividad biológica, actuando así por ejemplo como agentes antibacterianos, antivirales o antiprionicos. También pueden actuar como agentes de transporte de ácidos nucleicos o fármacos. Esta actividad depende principalmente de las funciones periféricas, y parece estar relacionada con la multivalencia que presentan los dendrímeros, que permite la presencia de un número elevado de funcionalidades sobre una misma molécula, y su tamaño nanoscópico. Las moléculas dendríticas descritas en la bibliografía y potencialmente útiles como agentes antivirales presentan en su periferia algunas de los siguientes funciones: carbohidratos, péptidos y aniones.

Por otra parte, dendrímeros y dendrones con grupos catiónicos se emplean como transportadores de ácidos nucleicos en terapias frente al VIH, cáncer, etc, a través de la formación de nanoconjugados denominados dendriplexes; o bien tienen propiedades microbicidas.

En lo que respecta al transporte de fármacos, la naturaleza de este último (catiónico o aniónico) determina en cierto modo el tipo de dendrímero a emplear cuando se busca una interacción electrostática. Sin embargo, si se realiza una unión covalente del fármaco la presencia de grupos adicionales catiónicos o aniónicos servirán para favorecer la solubilidad del fármaco o generar sinergias con la actividad propia de los grupos iónicos de la molécula dendrítica.

Otro aspecto a tener en cuenta en la formación de moléculas dendríticas es su estructura interna. Se han descrito diferentes esqueletos dendríticos, entre los que se encuentra el esqueleto carbosilano, caracterizado por la presencia de enlaces C-C y Si-C, muy estables y de baja polaridad. Con este tipo de esqueleto, se han preparado moléculas dendríticas carbosilano de naturaleza tanto catiónica como aniónica (WO2011/101520 A2).

Las primeras han mostrado su capacidad para interaccionar con oligonucleótidos o pequeños ARN de interferencia y transportarlos hasta el interior de las células, por lo que

se pueden considerar como vectores no virales para la transfección de material nucleico al interior de varios tipos de líneas celulares en procesos de terapia génica (N. Weber, P. Ortega, M. I. Clemente, D. Shcharbin, M. Bryszewska, F. J. de la Mata, R. Gómez, M. A. Muñoz-Fernández. *J. Control. Released.* **2008**, 132, 55). Estos sistemas son capaces
 5 incluso de superar la barrera hematoencefálica. También, dendrímeros y dendrones carbosilano catiónicos presentan actividad antimicrobiana tanto frente a bacterias Gram positivas como frente a bacterias Gram negativas (B. Rasines, J. M. Hernández-Ros, N. de las Cuevas, J. L. Copa-Patiño, J. Soliveri, M. A. Muñoz-Fernández, R. Gómez, F. J. de la Mata. *Dalton Transactions*, **2009**, 40, 8704; ES2265291). Además, moléculas
 10 dendríticas carbosilano catiónicas no generaron resistencias en las bacterias tratadas con ellos.

En cuanto a sistemas carbosilano aniónicos, la presencia en estos de grupos carboxilato, sulfonato y sulfato, les han conferido una actividad muy importante frente al VIH. La
 15 importancia de su capacidad antiviral se debe a que evita la infección de células epiteliales y también reduce la infección en células ya infectadas.

El procedimiento sintético de sistemas carbosilano utiliza diversas aproximaciones. Para obtener sistemas catiónicos se han empleado reacciones de hidrosililación de alilaminas
 20 (ej. $C_3H_5NH_2$, $C_3H_5NMe_2$) con dendrímeros y dendrones con enlaces terminales Si-H y posterior cuaternización, por ejemplo con HCl y MeI. También se han empleado reacciones de alcoholisis de dendrímeros con enlaces Si-Cl, aunque en este caso se obtienen dendrímeros inestables en atmósfera húmeda. Finalmente, más recientemente se ha documentado la adición tiol-eno de tioles que soportan grupos amonio, permitiendo
 25 obtener dendrímeros y dendrones catiónicos de manera más sencilla. Por otra parte, para obtener dendrímeros carbosilano aniónicos se han realizado adiciones tipo Michael de acrilato de metilo o vinil sulfonato sobre sistemas con funciones terminales $-NH_2$. También para este tipo de sistemas, la adición tiol-eno de tioles que soportan grupos ésteres o sulfonato permite de manera más sencilla llegar a los dendrímeros o dendrones
 30 con grupos aniónicos o sus precursores.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona nanopartículas metálicas (NP) recubiertas de dendrones de estructura carbosilano que están funcionalizados en su periferia con grupos aniónicos (como carboxilato, sulfonato o sulfato), que dotan a la macromolécula de una carga neta negativa, o catiónicos (amonio), que dotan al dendrímero de una carga neta positiva. Preferentemente, las nanopartículas son de oro y plata y los dendrones carbosilano se han funcionalizado por adición tiol-eno.

El procedimiento de obtención de las NPs de la invención permite, mediante un proceso sencillo, la síntesis de sistemas catiónicos o aniónicos, y además la posibilidad de sintetizar NPs heterofuncionalizadas, que consisten en introducir además algún dendrón con una o varias de sus ramas sustituidas por grupos diferentes, como pueden ser grupos cromóforos. Además la invención proporciona sus usos en biomedicina.

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

-Un núcleo compuesto por átomos metálicos, principalmente átomos de oro o plata, de tamaño nanoscópico. Este núcleo puede tener una disposición de sus átomos esférica, cilíndrica, de prisma u otras, con al menos una dimensión entre 1 y 1000 nm.

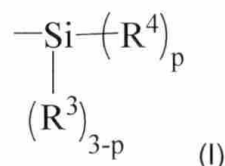
-La superficie metálica de la nanopartícula está recubierta por un compuesto dendrítico. Por "compuesto dendrítico" se refiere en la presente invención a una macromolécula muy ramificada donde las unidades, ramas o ramificaciones de crecimiento tienen esqueleto carbosilano. Este compuesto dendrítico es preferentemente un dendrón, también denominado este último como cuña dendrítica que se refiere a una macromolécula muy ramificada con forma de cono y que está definida por un punto focal, las unidades, ramas o ramificaciones de crecimiento, que parten de dicho punto focal y la capa externa, superficie o periferia de dichas ramificaciones que incorpora grupos funcionales. Además, a través del punto focal se enlaza a la superficie metálica de la nanopartícula.

El punto focal se puede seleccionar del grupo $-(CH_2)_z-R^1$; donde:

z es un número entero que varía de 1 a 10, preferiblemente z varía de 1 a 5 y más preferiblemente z es 4; y R^1 es grupo seleccionado de la lista que comprende

preferentemente un grupo de tipo $-\text{SR}^2$, $-\text{NH}_2$; donde R^2 puede ser preferentemente H, $-\text{C}(\text{O})\text{Me}$, o alguna de sus sales.

La capa externa del dendrímero o dendrón consiste, total o parcialmente, en unidades
5 iguales o diferentes del grupo de fórmula (I):



donde: R^3 es un grupo alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$), preferiblemente R^3 es un grupo metilo;

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

10 R^4 es el siguiente grupo $-(\text{CH}_2)_x\text{-S-}(\text{CH}_2)_y\text{-R}^5$;

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

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

15 R^5 es un grupo $-\text{OH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{OSO}_3\text{H}$, $-\text{COOR}'$ o $-\text{NR}''\text{R}'''$, donde R' , R'' y R''' ,
representan de manera independiente un grupo alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$) o un hidrógeno; o
cualquiera de sus sales.

Cuando R^5 es $-\text{NR}''\text{R}'''$, preferiblemente R'' y R''' , representan de manera independiente
20 un grupo alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$) o hidrógeno, más preferiblemente un grupo alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_2$) o
hidrógeno, aún más preferiblemente R^5 es un grupo $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ o un grupo $-\text{NH}_2$. Aún más
preferiblemente x es 2 y aún más preferiblemente y es 2. En una realización más
preferida, cuando R^5 es $-\text{NR}''\text{R}'''$, R^4 es el grupo $-(\text{CH}_2)_2\text{-S-}(\text{CH}_2)_2\text{-N}(\text{CH}_3)_2$ o $-(\text{CH}_2)_2\text{-S-}$
 $(\text{CH}_2)_2\text{-NH}_2$.

25

Cuando R^5 es un grupo $-\text{CO}_2\text{R}'$, o cualquiera de sus sales, preferiblemente R' es H o
 CH_3 , más preferiblemente x es 2 o 3, y aún más preferiblemente y es 1 o 2.

Cuando R^5 es un grupo $-\text{SO}_3\text{H}$ o $-\text{OSO}_3\text{H}$, o cualquiera de sus sales, preferiblemente x es
30 2 o 3, y más preferiblemente y es 2 o 3.

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

5

El compuesto de la presente invención además puede ser catiónico, formando grupos amonio (por ejemplo -NH_3^+ o -NMe_3^+), es decir, cuando R^5 es un grupo amino, o aniónico, formando los grupos carboxilato, sulfato o sulfonato, para el resto de grupos R^5 descritos anteriormente.

10

Por lo tanto, la presente invención no solo incluye los compuestos por sí mismos, sino cualquiera de sus sales, por ejemplo, sales de metal alcalino ó metal alcalinotérreo, por ejemplo se pueden seleccionar entre sales de sodio, potasio ó calcio. Preferiblemente las sales son de sodio o sales de halógenos, que se pueden seleccionar entre sales de cloruro, bromuro, ioduro; o triflato. Preferiblemente las sales son de ioduro y cloruro.

15

En otra realización preferida el compuesto de la invención comprende además, en la capa externa, al menos un grupo funcional $\text{R}^{5'}$ ($\text{R}^{5'} = \text{OR}^6$, NHR^6 , CO_2R^6) de diferente naturaleza al resto de los grupos R^5 que forman parte de dicha capa externa. Estos grupos R^6 se pueden seleccionar entre una molécula etiqueta, un grupo director o un principio activo.

20

El término "molécula etiqueta" se refiere en esta descripción a cualquier sustancia biorreconocible, cromóforo, fluoróforo o cualquier otro grupo detectable por técnicas espectrofotométricas, fluorométricas, de microscopía óptica, fluorescencia o confocal y/o RMN, y que permite fácilmente la detección de otra molécula que por sí sola es difícil de detectar y/o cuantificar. Por ejemplo, y sin limitarnos, el fluoróforo se selecciona de una lista que comprende fluoresceína, rodamina y dansilo.

25

Por "grupo director" se entiende a una molécula o grupo funcional capaz de dirigir al compuesto dendrítico específicamente hacia un tipo de células o hacia una zona concreta de una célula, por ejemplo pero sin limitarse a ácido fólico, grupos manosa, un péptido señal o un anticuerpo, entre otros conocidos por cualquier experto en la materia. Dicho grupo director se puede previamente funcionalizar para unirse al compuesto dendrítico.

30

Por "principio activo" o "fármaco" se entiende en la presente invención a toda sustancia química purificada utilizada en la prevención, diagnóstico, tratamiento, mitigación o cura de una enfermedad; para evitar la aparición de un proceso fisiológico no deseado; o para modificar condiciones fisiológicas con fines específicos. Preferiblemente, dicho principio activo es capaz de unirse a una amina o que contiene un grupo amino por el que se une al compuesto dendrítico, o es capaz de unirse al compuesto dendrítico mediante los grupos funcionales que contiene o con una funcionalización previa, por ejemplo, pero sin limitarse a penicilina, o donde el principio activo es capaz de unirse a un grupo alquino a través de grupos azida, por ejemplo AZT (zidovudina).

En una realización preferida, la NP está dendronizada con un dendrón de primera, segunda, tercera, cuarta o sucesivas generaciones. El término "generación" se refiere al número de ramificaciones iterativas que son necesarias para la preparación del compuesto.

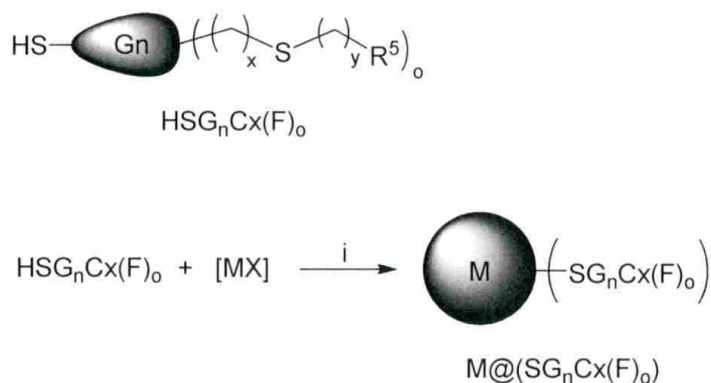
Otro aspecto de la presente invención se refiere al procedimiento de obtención de los compuestos de la invención, que comprende una reacción de reducción del precursor metálico en presencia de un compuesto dendrítico. Este compuesto dendrítico puede ser un dendrón carbosilano que presenta un grupo tiol en el punto focal o similar (método directo). Alternativamente, el compuesto dendrítico utilizado para la síntesis puede corresponder a un dendrímero con un núcleo de tipo $-(CH_2)_z-S-S-(CH_2)_z-$, donde z es un número entero que varía de 1 a 10, preferiblemente z varía de 1 a 5 y más preferiblemente z es 4; y una periferia como la descrita para los dendrones mencionados anteriormente en la presente invención.

Otro aspecto de la presente invención, se refiere al procedimiento de obtención de los compuestos de la invención, a partir de la sustitución de ligandos estabilizadores ya presentes en las NPs metálicas por los respectivos compuestos dendríticos (método de intercambio).

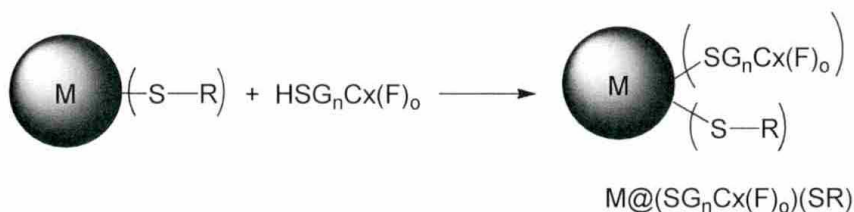
En una realización preferida del procedimiento de la invención, la reacción se lleva a cabo en presencia de un disolvente polar, preferentemente agua, y un agente reductor, preferentemente $NaBH_4$. También, la invención puede llevarse a cabo por sustitución a partir de NPs que presenten en su superficie tiolatos, realizando este proceso en una

mezcla de disolventes H₂O/tolueno u otros disolventes orgánicos no miscibles con agua.

Así por ejemplo, se pueden sintetizar las NPs aniónicas con grupos terminales como por ejemplo carboxilato, sulfonato, sulfato; o bien, a partir de NPs con grupos precursores
 5 aniónicos como son los éster o ácido carboxílico que tras su introducción al compuesto se transforman en el correspondiente anión por tratamiento con una base, como pueden ser NaOH, KOH, K₂CO₃ u otras que cumplan esta misma función. Los compuestos de la invención obtenidos son estables y solubles en agua en sus formas iónicas y además se consiguen aislar con buenos rendimientos. La síntesis de estas NPs dendronizadas
 10 iónicas y neutras puede representarse, de manera general, por el esquema 1, método directo, o por el esquema 2, método indirecto o de intercambio:



Esquema 1. Síntesis de NPs por el método directo. [MX] = [AuCl₄]⁻, AgNO₃. i) agente
 15 reductor; M = Au, Ag.



Esquema 2. Síntesis de NPs por intercambio.

20

Donde: Las nanopartículas metálicas se representan como M@ (SG_nCx(F)_o), estando formadas preferentemente por átomos metálicos de oro y plata. M@

indica la naturaleza de nanopartícula, siendo M Au ó Ag, mientras que entre paréntesis se indica el ligando estabilizador de la NP.

Los dendrones aniónicos, catiónicos o neutros se representan como $XGnC_x(F)_o$, donde:

n indica el número de la generación G.

X, indica la naturaleza del punto focal; X = SH para derivados con una función tiol.

C_x , indica la longitud de la cadena carbonada entre el átomo de Si y S. Por ejemplo, cuando partimos del compuesto $XGnVo$ (V=vinilo), C_x es C2, o cuando partimos de $XGnAo$ (A=alilo), C_x es C3 y así sucesivamente. Los compuestos

$XGnVo$ y $XGnAo$ de los siguientes ejemplos están descritos en: J. Sánchez-Nieves, P. Ortega, M. A. Muñoz-Fernandez, R. Gómez, F. J. de la Mata. *Tetrahedron* **2010**, 66, 9203; A. W. van der Made, P.W. N. M van Leeuwen. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**,1400; E. Fuentes-Paniagua, C. E. Peña-González, M. Galán, R. Gómez, F. J. de la Mata, J. Sánchez-Nieves. *Organometallics* **2013**, 1789.

F, indica la naturaleza de los grupos funcionales) situados en la periferia del dendrímero ($R^5 = CO_2^-$, SO_3^- , OSO_3^- , SO_3H , OSO_3H , CO_2Me , CO_2H , OH, NH_3^+ , NMe_2H^+ , NMe_3^+ , NH_2 , NMe_2) y "o" el número de estos grupos funcionales, que va a depender del número de generaciones.

S-R se corresponde con un ligando estabilizador descrito en la literatura, principalmente con R = alquilo o ácido carboxílico de cadena alquílica.

Por otro lado, la obtención de compuestos catiónicos con grupos amonio terminales, por ejemplo NMe_3^+ , se puede producir mediante una reacción de cuaternización del correspondiente grupo amino utilizando un derivado RX, sulfatos de alquilo (C_1-C_5), triflato de metilo, o cualquiera de sus combinaciones como agente cuaternizante (donde R se selecciona de entre hidrógeno, alquilo (C_1-C_{24}), alcohol (C_1-C_{24}) o un arilo, preferiblemente bencilo; y X es un halógeno, preferiblemente Cl, Br o I), como por ejemplo yoduro de metilo (MeI), HCl, cloruro de metilo, bromuro de metilo, cloruro de etilo, bromuro de etilo, cloruro de propilo, cloruro de hexilo, cloruro de dodecilo, cloruro de bencilo, bromuro de bencilo, bromuro de etanol, yoduro de etanol ($HO-CH_2CH_2-I$) o cualquiera de sus combinaciones. También, en el caso de compuestos funcionalizados con grupos amonio del tipo $NR_2 \cdot HCl$, se neutralizan con medio básico y posteriormente se pueden cuaternizar con otros agentes alquilantes como los descritos anteriormente. La

síntesis de estas NPs dendronizadas catiónicas o neutras puede representarse, de manera general, por el esquema 1, método directo, o por el esquema 2, método indirecto o de intercambio.

- 5 La presente invención se refiere también a los usos en biomedicina de las NPs dendronizadas descritas anteriormente que presentan grupos terminales catiónicos o aniónicos. Entre ellos destacan la utilización de los derivados catiónicos como agentes de transporte no virales para la transfección o internalización de material nucleico en el interior de diferentes líneas celulares en procesos de terapia génica o también el uso de
10 estos compuestos catiónicos o aniónicos como agentes terapéuticos "*per se*", por ejemplo como agentes antibacterianos, antivirales o antipríónicos.

Además, dichas NPs pueden ser heterofuncionales, con la ventaja de poder desempeñar más de una función simultáneamente. Así por ejemplo, las NPs aniónicas además de
15 tener capacidad antiviral por su carga negativa, pueden estar marcadas para facilitar su seguimiento o pueden tener además grupos directores que dirijan los dendrímeros específicamente hacia su lugar de actuación. De la misma forma, las NPs catiónicas heterofuncionales pueden tener simultáneamente por ejemplo cargas positivas para el transporte de ácidos nucleicos o fármacos aniónicos y grupos directores como por
20 ejemplo un anticuerpo para dirigir estos dendrímeros a un lugar específicos, o también fluoróforos u otros fármacos.

En otra realización preferida los compuestos de la invención, principalmente los catiónicos, se utilizan como agentes antimicrobianos. Por tanto, pueden utilizarse para la
25 prevención y/o el tratamiento de infecciones bacterianas.

También los compuestos de la invención, principalmente los aniónicos, presentan actividad antiviral. Debido a ello, pueden utilizarse para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades de origen vírico, como SIDA, Herpes, Gripe u otras.

30

Teniendo en cuenta la actividad biocida de los compuestos de la invención, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de estos compuestos como agentes biocidas para aplicaciones no terapéuticas, como por ejemplo, pero sin limitarse a ellas, impedir la aparición de microorganismos en superficies o tratamiento de aguas.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los compuestos de la invención, tanto catiónicos como aniónicos, para la elaboración de un medicamento. Más preferiblemente, el medicamento se utiliza para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades causadas por microorganismos, como por ejemplo virus, bacterias, protozoos u hongos. Más preferiblemente la prevención y/o el tratamiento son para enfermedades causadas por el VIH o infecciones bacterianas.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos una NP dendronizada según se ha descrito anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Además, esta composición farmacéutica puede comprender otro principio activo, preferiblemente un material nucleico, un antibiótico, antiviral o antiinflamatorio. El antibiótico puede ser del grupo de los betalactámicos, como por ejemplo la penicilina, u otros como eritromicina. El antiinflamatorio puede ser por ejemplo ibuprofeno y el antiviral AZT.

Los "vehículos farmacéuticamente aceptables" que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por un experto en la materia. Como ejemplos de preparaciones farmacéuticas se incluye cualquier composición sólida (comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, etc.) o líquida (geles, soluciones, suspensiones o emulsiones) para administración oral, nasal, tópica o parenteral. Para los compuestos aniónicos preferiblemente la administración será tópica y aún más preferiblemente en forma de gel. En el caso de los catiónicos, preferiblemente la administración será vía oral, parenteral (inyectable), o tópica.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de tratamiento o prevención de enfermedades causadas por microorganismos, como por ejemplo virus, bacterias, protozoos u hongos en un mamífero, preferiblemente un humano, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende al menos un compuesto dendrítico de la invención. Preferiblemente, la administración de la composición se puede realizar por vía oral, nasal, tópica o parenteral. Para los compuestos aniónicos preferiblemente la administración será tópica y aún más preferiblemente en forma de gel. En el caso de los catiónicos, preferiblemente la administración será vía oral, parenteral (inyectable) o tópica.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de la composición calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de la composición, la edad, estado y antecedentes del paciente, la severidad de la enfermedad, y de la vía y frecuencia de administración.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los compuestos catiónicos de la invención como vector no viral. Preferiblemente, el vector se utiliza para la transfección o internalización de material nucleico en procesos de terapia génica, es decir, los compuestos de la invención pueden actuar como agentes de transfección en terapia génica.

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

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del vector no viral de la invención, para la elaboración de un medicamento. Más preferiblemente, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la infección por VIH o del cáncer en terapia génica.

La posibilidad de síntesis y fácil manipulación de estos compuestos y la posibilidad de agregar a este tipo de NPs metálicas ligandos que permitan su direccionamiento hacia un lugar específico de acción, supone una gran ventaja frente a otros vectores utilizados en terapia génica.

La mayor ventaja de los complejos NP/material nucleico formulados en la presente invención, reside en que poseen una estructura uniforme y flexible permitiendo la posibilidad de modificar de manera versátil el esqueleto y la superficie de los mismos. Además, la dendronización directa de la NP permite estimar el peso molecular y el número de cargas de estos sistemas.

También es posible el uso de los compuestos de la invención como vehículos de transporte de moléculas, preferiblemente moléculas con actividad farmacológica (principios activos), y más preferiblemente moléculas aniónicas o catiónicas, dependiendo

si el compuesto es catiónico o aniónico respectivamente, el principio activo puede ser un antibiótico, un antiinflamatorio o un antiviral, entre ellos por ejemplo y sin limitarse a un antibiótico del grupo de los betalactámicos, como puede ser la penicilina, a un antiinflamatorio como puede ser ibuprofeno o un antiviral como puede ser AZT.

5

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

10

que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15

Figura 1. Imagen TEM (izquierda) e histograma de distribución (derecha) de la NPs **Au@(G2C2(NMe₂)₄)** obtenidas por el método directo (tamaño promedio = 1.88 nm (469 nanopartículas medidas con el programa Image J)).

Figura 2. ¹H-RMN (D₂O) de **Au@(G1C2(NMe₃I)₂)** obtenidas por el método directo.

20

Figura 3. Imagen TEM (izquierda) e histograma de distribución (derecha) de la NPs **Au@(G1C2(NMe₃I)₂)** obtenidas por el método directo (tamaño promedio = 1.80 nm (14975 nanopartículas medidas con el programa Image J)).

25

Figura 4. ¹H-RMN (D₂O) de **Au@(G1C2(NMe₃Cl)₂)** obtenidas por el método directo.

Figura 5. Imagen TEM (izquierda) e histograma de distribución (derecha) de la NPs **Au@(G1C2(NMe₃Cl)₂)** obtenidas por el método directo (tamaño promedio = 1.80 nm (14975 nanopartículas medidas con el programa Image J)).

30

Figura 6. ¹H-RMN (D₂O) de **Au@(G2C2(NMe₃I)₄)(SR)** (R = (CH₂)₁₁Me) obtenidas por el método de intercambio.

Figura 7. Imagen TEM (izquierda) **Au@(G2C2(NMe₃I)₄)(SR)** (R = (CH₂)₁₁Me) de la NPs

obtenidas por el método de intercambio.

Figura 8. ^1H -RMN (D_2O) de $\text{Ag}@\text{(G1C2(NMe}_3\text{Cl)}_2\text{)}$ obtenidas por el método directo.

5 **Figura 9.** Imagen TEM (izquierda) e histograma de distribución (derecha) de la NPs $\text{Ag}@\text{(G1C2(NMe}_3\text{Cl)}_2\text{)}$ obtenidas por el método directo (tamaño promedio = 1.67 ± 3.82 nm (2315 nanopartículas medidas con el programa Image J))

Figura 10. ^1H -RMN (D_2O) de $\text{Au}@\text{(G1C2(SO}_3\text{Na)}_2\text{)}$ obtenidas por el método directo.

10

Figura 11. Imagen TEM (izquierda) e histograma de distribución (derecha) de la NPs $\text{Au}@\text{(G1C2(SO}_3\text{Na)}_2\text{)}$ obtenidas por el método directo (tamaño promedio = 2.4 nm (1974 nanopartículas medidas con el programa Image J)).

15 **Figura 12.** ^1H -RMN (D_2O) de $\text{Au}@\text{(G1C2(SO}_3\text{Na)}_2\text{)(SR)}$ ($\text{R} = (\text{CH}_2)_{11}\text{Me}$) obtenidas por el método de intercambio.

Figura 13. Imagen TEM (izquierda) $\text{Au}@\text{(G1C2(SO}_3\text{Na)}_2\text{)(SR)}$ ($\text{R} = (\text{CH}_2)_{11}\text{Me}$) de la NPs obtenidas por el método de intercambio (tamaño promedio = 1.2 nm (19874

20 nanopartículas medidas con el programa Image J program)).

Figura 14. ^1H -RMN (D_2O) de $\text{Au}@\text{(G2C2(CO}_2\text{Me)}_4\text{)}$ obtenidas por el método directo.

Figura 15. Imagen TEM (izquierda) e histograma de distribución (derecha) de la NPs

25 $\text{Au}@\text{(G2C2(CO}_2\text{Me)}_4\text{)}$ obtenidas por el método directo (tamaño promedio = 1.5 nm (556 nanopartículas medidas con el programa Image J)).

Figura 16. ^1H -RMN (D_2O) de $\text{Au}@\text{(G2C2(CO}_2\text{Me)}_4\text{)(SR)}$ ($\text{R} = (\text{CH}_2)_{11}\text{Me}$) obtenidas por el método de intercambio.

30

Figura 17. Imagen TEM (izquierda) $\text{Au}@\text{(G2C2(CO}_2\text{Me)}_4\text{)(SR)}$ ($\text{R} = (\text{CH}_2)_{11}\text{Me}$) de la NPs obtenidas por el método de intercambio (tamaño promedio = 1.4 nm (3699 nanopartículas medidas con el programa Image J)).

Figura 18. ^1H -RMN (D_2O) de $\text{Au}@\text{(G1C2(CO}_2\text{Na)}_2\text{)}$ obtenidas por el método directo.

Figura 19. Imagen TEM (izquierda) e histograma de distribución (derecha) de la NPs $\text{Au}@\text{(G1C2(CO}_2\text{Na)}_2\text{)}$ obtenidas por el método directo (tamaño promedio = 2.0 nm (2957 nanopartículas medidas con el programa Image J)).

Figura 20. Actividad bactericida de NPs catiónicas $\text{M}@\text{(GnC2(NMe}_3\text{Cl)}_m\text{)}$ ($\text{M} = \text{Au, Ag}$; $n = 1, 2, 3$; $m = 2, 4, 8$) en mg/L de NP.

Figura 21. Viabilidad de las CMSP tratadas con nanopartículas de oro aniónicas por MTT. Las CMSP fueron tratadas con las nanopartículas de oro aniónicas durante 48 horas empleando concentraciones de 100, 50, 10 y 1 $\mu\text{g/ml}$, mostrándose, pasado el tiempo de incubación, y tras realizar un ensayo de MTT, una viabilidad mayor del 80% en todas las concentraciones. NT, control sin tratar; DMSO (10%), control positivo de muerte celular; Dext (Dextrano 10 μM), control negativo de muerte celular. Tanto los controles como las concentraciones fueron estudiados por triplicado.

Figura 22. Viabilidad de las TZM.bl tratadas con nanopartículas de oro aniónicas por MTT. A). Las células TZM.bl fueron tratadas con concentraciones de 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01 $\mu\text{g/ml}$ de las nanopartículas $\text{Au}@\text{(GnC2(SO}_3\text{Na)}_m\text{)}(\text{SR})$ (BDGP071-073) durante 48 horas, pasado el tiempo de incubación, y tras realizar un ensayo de MTT, la concentración máxima a la cual la viabilidad superó el 80%, fue de 0.05 $\mu\text{g/ml}$. B). Las células TZM.bl se trataron con las nanopartículas $\text{Au}@\text{(GnC2(SO}_3\text{Na)}_m\text{)}$ (BDGP062-064) a las concentraciones de 100, 50, 10, 1, 0.5, 0.1, 0.05 y 0.01 $\mu\text{g/ml}$ durante 48 horas, pasado el tiempo de incubación, y tras realizar un ensayo de MTT, la concentración máxima a la cual la viabilidad superó el 80%, fue de 10 $\mu\text{g/ml}$, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ y 0.5 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. NT, control sin tratar; DMSO (10%), control positivo de muerte celular; Dext (Dextrano 10 μM), control negativo de muerte celular. Tanto los controles como las concentraciones fueron estudiados por triplicado.

Figura 23. Pre-tratamiento e infección de TZM.bl con los aislados virales R5-VIH-1_{NLAD8} y X4-VIH-1_{NL4.3}. Se plaquearon 15.000 células TZM.bl/pocillo en una placa de 96 pocillos y se pre-trataron con las distintas nanopartículas de oro aniónicas a las concentraciones previamente seleccionadas no tóxicas, durante 1 hora. A continuación,

se llevó a cabo la infección de las células con una concentración de 20ng/10⁶células de los aislados virales. Tras 3 horas de infección, se lavaron las células con PBS y se dejaron en medio de cultivo durante 72 horas. Transcurrido el tiempo post-infección se determinó el porcentaje de infección midiendo la luminiscencia utilizando un lector de placas.

Figura 24. Pre-tratamiento e infección de CMSP. Se plaquearon 200.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos y se pre-trataron con las nanopartículas a la concentraciones de 100 µg/ml durante 1 hora. A continuación, se realizó la infección con 50 ng/10⁶ células del aislado R5-VIH-1_{NLAD8} durante 3 horas. Tras el tiempo de infección, se lavaron las células con PBS y se dejaron en medio de cultivo durante 72 horas. Transcurrido el tiempo post-infección se determinó el porcentaje de infección por cuantificación del antígeno p24^{gag} por ELISA.

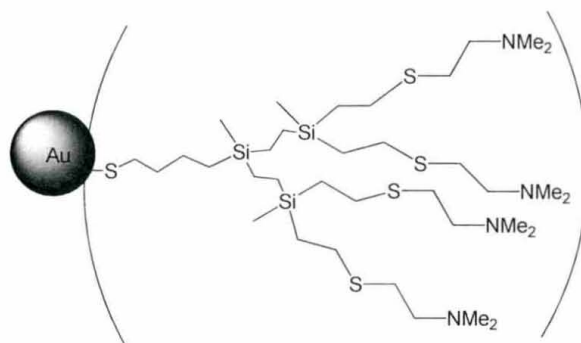
EJEMPLOS

Ejemplo 1.- Nanopartículas funcionalizadas con grupos catiónicos

Se añaden las estructuras de algunas NPs dendronizadas, que son representativas para el resto de sistemas que se describen en los siguientes ejemplos.

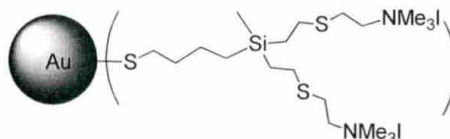
Síntesis de Au@(G2C2(NMe₂)₄).

A una solución acuosa de HAuCl₄ (8.82 mL, 0.26 mmol, 29.5 mM) se le añadió una solución de bromuro de tetraoctilamonio en tolueno (21.2 mL, 1.06 mmol, 50 mM). La mezcla se agitó hasta que todo el color se había transferido de la fase acuosa a la fase orgánica. A la mezcla anterior se le añadió una solución en tolueno del dendrón HSG2C2(NMe₂)₄ (0.26 mmol), seguida de la adición gota a gota y con agitación rápida de una solución acuosa fresca de NaBH₄ (6.25 mL, 1.30 mmol, 208 mM). Al finalizar la adición, la mezcla se mantuvo con agitación durante otras 4 horas. Las nanopartículas precipitaron de la disolución y resultaron ser insolubles en diferentes disolventes orgánicos (THF, éter, tolueno), y parcialmente solubles en DMSO. Datos para **Au@(G2C2(NMe₂)₄)**: Diámetro promedio del núcleo de oro (TEM): D = 1.88 nm. SPR (Uv-visible): 538.1 nm.



Síntesis de Au@(G1C2(NMe3I)2).

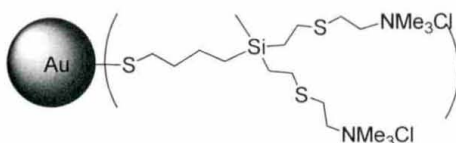
A una solución acuosa de HAuCl_4 (15 mL, 0.45 mmol, 30 mM) se le añadió gota a gota una solución acuosa del dendrón $\text{HSG1C2(NMe}_3\text{I)}_2$ (40 mL, 0.5 mmol, 12.5 mM). Seguidamente, una solución acuosa fresca de NaBH_4 (12.5 mL, 2.5 mmol, 200 mM) se añadió gota a gota y con fuerte agitación. Terminada la adición, la mezcla se mantuvo con agitación durante 4 horas. Las nanopartículas fueron purificadas por diálisis (MWCO 10,000) obteniéndose **Au@(G1C2(NMe3I)2)** (114 mg, almacenadas en agua MiLiQ a 4 °C). Datos para **Au@(G1C2(NMe3I)2)**: RMN (D_2O): ^1H RMN: δ - 0.09 (SiCH_3), 0.61 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 0.91 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 1.36 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 2.70 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 2.95 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.13 (NCH_3), 3.53 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}$). Au/(I) ratio molar de reactivos = 1:1. Anal. Obt.: C, 23.34; H, 4.741; N, 2.721; S, 8.014. TGA: Au, 51.11; (I), 48.89. Ratio molar calc. Au/(I) = 3.72:1 en la nanopartícula. SPR (UV-visible): 545.1 nm. Potencial Zeta: +46.1. DLS (Z-promedio d.nm) = 4.91 nm. Diámetro promedio del núcleo de oro (TEM): $D = 3.72$ nm. $N_{\text{Au}} = 1590$; Cálculo de dendrones unidos a la superficie $N_d = 442$. Cálculo de peso molecular aproximado: $\text{Au}_{1590}(\text{C}_{19}\text{H}_{45}\text{I}_2\text{N}_2\text{S}_3\text{Si})_{442}$. Promedio $M = 612900.87$ g mol^{-1} .



Síntesis de Au@(G1C2(NMe3Cl)2).

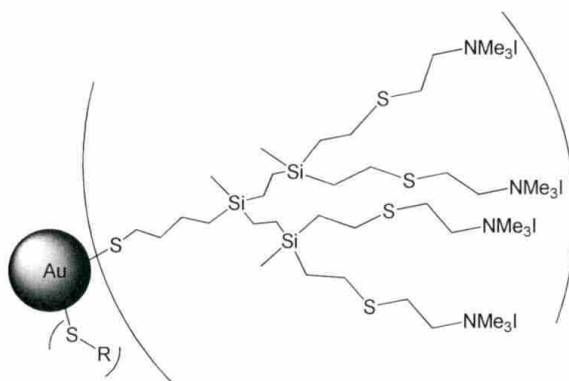
Siguiendo el procedimiento descrito para **Au@(G1C2(NMe3I)2)**, **Au(SG1(NMe3Cl)2)** se obtuvo de la reacción de HAuCl_4 (30 mL, 0.9 mmol, 30 mM) con el compuesto $\text{HSG1C2(NMe}_3\text{Cl)}_2$ (80 mL, 1 mmol, 12.5 mM).y NaBH_4 (25 mL, 5 mmol, 200 mM). Las nanopartículas fueron purificadas por diálisis (MWCO 10,000) obteniéndose

Au(SG₁(NMe₃Cl)₂) (273 mg, almacenadas en agua MiLiQ a 4 °C) . Datos para **Au(SG₁(NMe₃Cl)₂)**: RMN (D₂O): ¹H RMN: δ - 0.07 (SiCH₃), 0.60 (SCH₂CH₂CH₂CH₂Si), 0.91 (SiCH₂CH₂S), 1.41 (SCH₂CH₂CH₂CH₂Si), 1.70 (SCH₂CH₂CH₂CH₂Si), 2.70 (SiCH₂CH₂S), 2.97 (SCH₂CH₂N), 3.10 (NCH₃), 3.51 (SCH₂CH₂N). Au/(I) ratio molar de reactivos = 1:1. TGA: Au, 54.80; (I), 45.20. SPR (UV-visible): 528.1 nm. Potencial Zeta: +54.1. DLS (Z-promedio d.nm) = 13.81 nm. Diámetro promedio del núcleo de oro (TEM): D = 1.80 nm. N_{Au} = 180; Cálculo de dendrones unidos a la superficie N_d = 59. Cálculo de peso molecular aproximado: Au₁₅₉₀(C₁₉H₄₅Cl₂N₂S₃Si)₄₄₂. Promedio M = 64761.64 g mol⁻¹.



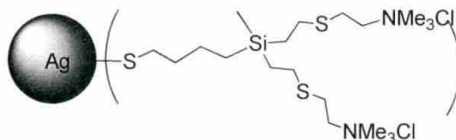
Síntesis de Au@(G2C2(NMe₃I)₄)(SR) (R = (CH₂)₁₁Me).

A una solución de nanopartículas funcionalizadas con dodecanotiolato **Au(SC12)** (50 mg) en diclorometano CH₂Cl₂ (25 mL) se le añadió una solución acuosa de HSG2(NMe₃I)₄ (187 mg, 0.143 mmol, 25 mL de agua MiLiQ) bajo argón. La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que el intercambio terminaba (el intercambio del ligando puede ser fácilmente observado, por la transferencia del color desde la fase orgánica hacia la fase acuosa). Al finalizar la reacción de intercambio, las fases fueron separadas y la fase acuosa se lavó con CH₂Cl₂ (2 x 5 mL). Seguidamente, la fase acuosa se concentró a vacío (5 mL) y se purificó por diálisis, obteniéndose **Au@(G2C2(NMe₃I)₄)(SR)** (134 mg, almacenado en agua MiLiQ a 4 °C). Datos para **Au@(G2C2(NMe₃I)₄)(SR)**: RMN (D₂O): ¹H RMN (D₂O): δ - 0.07 (SiCH₃), 0.05 (SiCH₃), 0.54 (SCH₂CH₂CH₂CH₂Si, SiCH₂CH₂CH₂Si) 0.87 (SCH₂(CH₂)₉CH₃, SiCH₂CH₂S), 1.31 (SCH₂(CH₂)₉CH₃, SCH₂CH₂CH₂CH₂Si, SiCH₂CH₂CH₂Si), 1.61 (SCH₂CH₂CH₂CH₂Si), 2.65 (SiCH₂CH₂S), 2.92 (SCH₂CH₂N), 3.32 (NCH₃), 3.61 (SCH₂CH₂N). SPR (UV-visible): 541.9 nm.



Síntesis de $\text{Ag}@\text{(G1C2(NMe}_3\text{Cl)}_2\text{)}$.

A una solución acuosa de AgNO_3 (16.3 mL, 0.49 mmol, 30 mM) se le añadió gota a gota una solución del compuesto $\text{HSG1(NMe}_3\text{Cl)}_2$ (43.2 mL, 0.54 mmol, 12.5 mM). Seguidamente, una solución acuosa recién preparada de NaBH_4 (13.5 mL, 2.7 mmol, 200 mM) se añadió gota a gota y con fuerte agitación. Terminada la adición, la mezcla se mantuvo con agitación durante 4 horas más. Las nanopartículas fueron purificadas por diálisis (MWCO 10,000) obteniéndose $\text{Ag(SG}_1\text{(NMe}_3\text{Cl)}_2\text{)}$ (108 mg, almacenadas en agua MiLiQ a 4 °C). Datos para $\text{Ag(SG}_1\text{(NMe}_3\text{Cl)}_2\text{)}$: RMN (D_2O): ^1H RMN: δ -0.06 (SiCH_3), 0.59 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 0.91 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 1.41 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 1.79 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 2.71 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 2.97 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.10 (NCH_3), 3.51 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}$). Au/(I) ratio molar de reactivos = 1:1. TGA: Au, 46.46; (I), 53.54. Ratio molar calc. Au/(I) = 3.99:1 en la nanopartícula. SPR (UV-visible): 447.8 nm. Potencial Zeta: +54.2. DLS (Z-promedio d.nm) = 17.54 nm. Diámetro promedio del núcleo de oro (TEM): $D = 1.67$ nm. $N_{\text{Au}} = 521$; Cálculo de dendrones unidos a la superficie $N_d = 131$. Cálculo de peso molecular aproximado: $\text{Au}_{521}(\text{C}_{19}\text{H}_{45}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{S}_3\text{Si})_{131}$. Promedio $M = 56200.27$ g mol^{-1} .



20

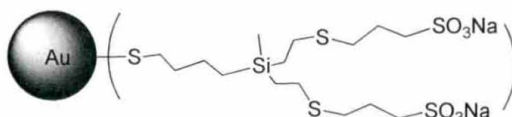
Ejemplo 2.- Nanopartículas funcionalizadas con grupos aniónicos.

Se añaden las estructuras de algunas NPs dendronizadas, que son representativas para el resto de sistemas que se describen en los siguientes ejemplos.

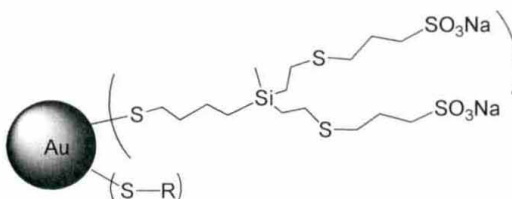
Síntesis de Au@(G1C2(SO₃Na)₂).

Seguendo el procedimiento descrito para **Au@(G1C2(NMe₃I)₂)**, **Au@(G1C2(SO₃Na)₂)** se obtuvo de la reacción de H₂AuCl₄ (10 mL, 0.3 mmol, 30 mM) con el compuesto HSG1C2(SO₃Na)₂ (26.6 mL, 0.3 mmol, 12.5 mM) y NaBH₄ (7.5 mL, 1.5 mmol, 200 mM).

- 5 Las nanopartículas fueron purificadas por diálisis (MWCO 10,000) obteniéndose **Au@(G1C2(SO₃Na)₂)** (200 mg, almacenadas en agua MiLiQ a 4 °C). Datos para **Au@(G1C2(SO₃Na)₂)**: RMN (D₂O): ¹H RMN: δ 0.06 (SiCH₃), 0.61 (SCH₂CH₂CH₂CH₂Si), 0.89 (SiCH₂CH₂S), 1.93 (SCH₂CH₂CH₂S), 2.60 (SiCH₂CH₂S, SCH₂CH₂CH₂S), 2.90 (SCH₂CH₂CH₂S). Au/(I) ratio molar de reactivos = 1:1. Anal. Obt.: C, 21.36; H, 4.12; S, 18.17. TGA: Au, 48.06; (I), 51.89. Ratio molar calc. Au/(I) = 2.54:1 en la nanopartícula. SPR (UV-visible): 549.7 nm. Potencial Zeta: -28.8. DLS (Z-promedio d.nm) = 33.66 nm. Diámetro promedio del núcleo de oro (TEM): D = 2.4 nm. N_{Au} = 427; Cálculo de dendrones unidos a la superficie N_d = 168. Cálculo de peso molecular aproximado $Au_{427}(C_{15}H_{31}Na_2O_6S_5Si)_{168}$. Promedio M = 175124.32 g·mol⁻¹.

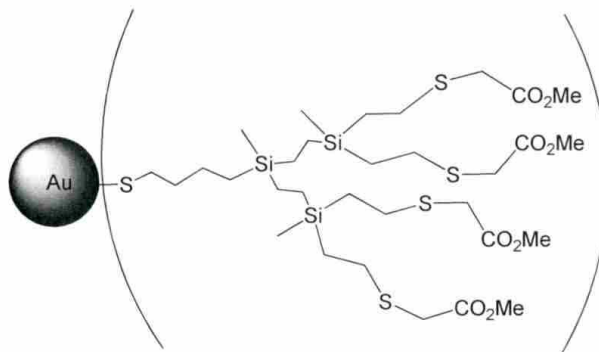
**Síntesis de Au@(G1C2(SO₃Na)₂)(SR) (R = (CH₂)₁₁Me).**

Seguendo el procedimiento descrito para **Au@(G2C2(NMe₃I)₄)(SR)**, **Au@(G1C2(SO₃Na)₂)(SR)** se obtuvo de la reacción de **Au(SC12)** (10 mg, 5 mL) y HSG1C2(SO₃Na)₂ (129 mg, 0.239 mmol, 5 mL de agua MiLiQ), obteniéndose **Au@(G1C2(SO₃Na)₂)(SR)** (127 mg, almacenado en agua MiLiQ a 4 °C). Data for **Au@(G1C2(SO₃Na)₂)(SR)**: RMN (D₂O): ¹H RMN (D₂O): ¹H RMN: δ -0.01 (m, SiCH₃), 0.54 (m, SCH₂CH₂CH₂CH₂Si), 0.85 (SCH₂(CH₂)₉CH₃, SiCH₂CH₂S), 1.37 (m, SCH₂(CH₂)₉CH₃, SCH₂CH₂CH₂CH₂Si), 1.59 (m, SCH₂CH₂CH₂CH₂Si), 1.92 (m, SCH₂CH₂CH₂S), 2.58 (m, SiCH₂CH₂S, SCH₂CH₂CH₂S, SCH₂CH₂CH₂CH₂Si), 2.89 (m, SCH₂CH₂CH₂S) SPR (UV-visible): 540.7 nm.. Potencial Zeta: -57.0. Diámetro promedio del núcleo de oro (TEM): D = 1.2 nm.

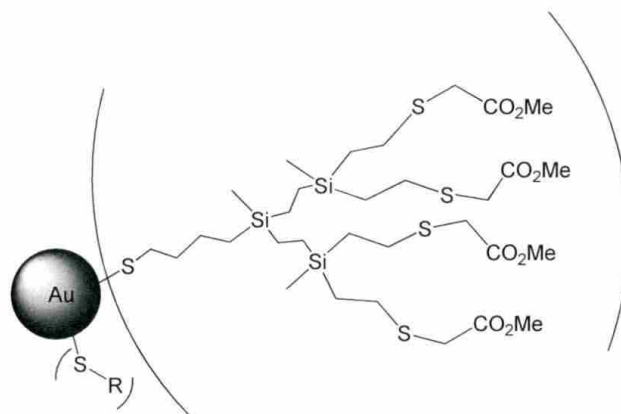


Síntesis de Au@(G2C2(CO₂Me)₄).

Seguendo el procedimiento descrito para **Au@(G2C2(NMe₂)₄)**, **Au@(G2C2(CO₂Me)₄)** se obtuvo de la reacción de HAuCl₄ (15 mL, 0.5 mmol, 30 mM), bromuro de tetraoctilamonio (40 mL, 2 mmol, 50 mM), HSG2C2(CO₂Me)₄ (0.5 mmol) y NaBH₄ (12.5 mL, 2.5 mmol, 200 mM). La mezcla resultante se concentró a vacío (5 mL) y las nanopartículas protegidas con dodecanotiolato fueron precipitadas con hexano (1.155 g, almacenados en tolueno a 4 °C). Datos para **Au@(G2C2(CO₂Me)₄)**: RMN (CDCl₃): ¹H RMN (CDCl₃): δ - 0.09 (SiCH₃), 0.01(SiCH₃), 0.53 (SCH₂CH₂CH₂CH₂Si, SiCH₂CH₂CH₂Si), 0.85 (SCH₂(CH₂)₉CH₃, SiCH₂CH₂S), 1.25 (SCH₂(CH₂)₉CH₃, SCH₂CH₂CH₂CH₂Si, SiCH₂CH₂CH₂Si), 1.66 (SCH₂CH₂CH₂CH₂Si), 2.64 (SiCH₂CH₂S), 3.22 (SCH₂CO₂), 3.71 (CO₂CH₃). SPR (UV-visible): 520.8 nm. DLS (Z-promedio d.nm) = 130.6 nm. Diámetro promedio del núcleo de oro (TEM): D = 1.5 nm.

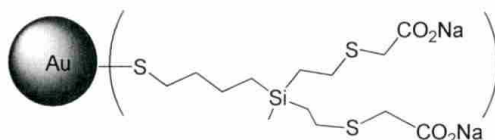
**Síntesis de Au@(G2C2(CO₂Me)₄)(SR) (R = (CH₂)₁₁Me).**

Seguendo el procedimiento descrito para **Au@(G2C2(NMe₃)₄)(SR)**, **Au@(G2C2(CO₂Me)₄)(SR)** se obtuvo de la reacción de **Au(SC12)** (50 mg, 25 mL de CH₂Cl₂) y HSG2C2(CO₂Me)₄ (126 mg, 0.143 mmol, 25 mL de CH₂Cl₂). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. A continuación, se concentró a vacío (5 mL) y el residuo obtenido se lavó con hexano (2 x 5 mL), obteniéndose **Au@(G2C2(CO₂Me)₄)(SR)** (almacenadas en agua hexano a 4 °C). Data for **Au@(G1C2(CO₂Me)₄)(SR)**: RMN (D₂O):¹H RMN (CDCl₃): δ -0.08 (SiCH₃), 0.02(SiCH₃), 0.54 (SCH₂CH₂CH₂CH₂Si, SiCH₂CH₂CH₂Si), 0.85 (SCH₂(CH₂)₉CH₃, SiCH₂CH₂S), 1.24 (SCH₂(CH₂)₉CH₃, SCH₂CH₂CH₂CH₂Si, SiCH₂CH₂CH₂Si), 1.61 (SCH₂CH₂CH₂CH₂Si), 2.65 (SiCH₂CH₂S), 3.23 (SCH₂CO₂), 3.72 (CO₂CH₃). SPR (UV-visible): 526.6 nm. Diámetro promedio del núcleo de oro (TEM): D = 1.4 nm.



Síntesis de $\text{Au}@\text{(G1C2(CO}_2\text{Na)}_2\text{)}$.

- 5 Siguiendo el procedimiento descrito para $\text{Au}@\text{(G1C2(NMe}_3\text{I)}_2\text{)}$, $\text{Au}@\text{(G1C2(CO}_2\text{Na)}_2\text{)}$ se obtuvo de la reacción de HAuCl_4 (30 mL, 0.9 mmol, 30 mM), $\text{HSG1C2(CO}_2\text{Na)}_2$ (80 mL, 0.5 mmol, 12.5 mM) y NaBH_4 (25 mL, 5 mmol, 200 mM). Las nanopartículas fueron purificadas por diálisis (MWCO 10,000) obteniéndose $\text{Au}(\text{SG}_1(\text{CO}_2\text{Na})_2)$ (169.7 mg, almacenadas en agua MiLiQ a 4 °C). Datos para $\text{Au}(\text{SG}_1(\text{CO}_2\text{Na})_2)$: RMN (D_2O): ^1H RMN:
- 10 δ -0.09 (SiCH_3), 0.53 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 0.82 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 1.17 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 2.53 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 3.09 ($\text{SCH}_2\text{CO}_2\text{Na}$). SPR (UV-visible): 521.3 nm.. Potencial Zeta: -32.4. DLS (Z-promedio d.nm) = 36.90 nm. Diámetro promedio del núcleo de oro (TEM): $D = 2.0$ nm.



15

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS CATIÓNICAS FRENTE A BACTERIAS.

- Se ha estudiado la capacidad antibacteriana de las NPs catiónicas frente a bacterias de tipo Gram+ (ej. *S. aureus*) y Gram- (ej. *E. coli*). La principal diferencia entre estas bacterias radica en la constitución de la membrana bacteriana. Sin embargo, no se descarta su actividad frente a otras bacterias y otros microorganismos como amebas y otros parásitos.
- 20

MATERIALES Y MÉTODOS

Nanopartículas.

Se analizaron 6 nanopartículas funcionalizadas con dendrones de diferente generación preparadas por el método directo del tipo $M@(\text{GnC}_2(\text{NMe}_3\text{Cl})_m)$, que a partir de ahora se denominarán cuando $M = \text{Au}$ como BDCP078 ($n = 1$, $m = 2$), BDCP079 ($n = 2$, $m = 4$) y BDCP080 ($n = 3$, $m = 8$), funcionalizadas con un dendrón de primera, segunda y tercera generación respectivamente; y cuando $M = \text{Ag}$ como BDCP086 ($n = 1$, $m = 2$), BDCP087 ($n = 2$, $m = 4$) y BDCP088 ($n = 3$, $m = 8$), funcionalizadas con un dendrón de primera, segunda y tercera generación respectivamente.

Valoración de la capacidad antibacteriana de los compuestos.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de los compuestos se determina en microplacas de 96 pocillos, utilizando el método estándar ISO 20776–1. El ensayo se realiza por sextuplicado para cada concentración analizada. Para los ensayos se utilizaron las bacterias *Escherichia coli* (CECT 515, Gram negativa) y *Staphylococcus aureus* (CECT, 240 Gram positiva). Ambas cepas fueron obtenidas en la “Colección Española de cultivos tipo” (CECT). Se prepara una disolución madre disolviendo 0,01024 g del compuesto en estudio en 10 ml de agua destilada (1024 ppm). Después de eso, se añade agua destilada estéril hasta obtener las concentraciones deseadas. En cada pocillo de las microplacas se añaden 100 μL de la solución con la concentración deseada y se completa con 100 μL de caldo MuellerHinton (Scharlau, ref. 02-136) doble concentrado de lo que se indica para su preparación. Finalmente se añaden 5 μL de una solución de bacteria de 2×10^7 UFC/mL. Las microplacas se incuban a 37°C durante 24 h utilizando un lector de microplacas ELX808iu (Bio-Tek Instruments). La concentración mínima bactericida es la concentración más pequeña del compuesto que no permite el crecimiento bacteriano. La concentración mínima bactericida (CMB) se calcula inoculando 5 μL de cada uno de los pocillos de la microplaca utilizada para el cálculo de CMI, en una placa de Petri con agar Mueller–Hinton (ref. 02–136, Scharlau). Tras 48 h de incubación a 37°C, se observa la presencia de colonias. La CMB se determina como la concentración mínima en la que no se detecta el crecimiento de bacterias.

Valoración de la capacidad hemolítica de los compuestos.

Se toman 1,5 mL de una solución de eritrocitos de oveja (RBC, Oxoid sheep erythrocytes) y se resuspenden en 5 mL de buffer fosfato salino (PBS pH 7,4; NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM y KH₂PO₄ 1,8 mM). La solución obtenida se centrifuga durante 15 min a 3.000 rpm. Se repite el proceso tres veces para lavar los eritrocitos y finalmente se resuspenden después de la última centrifugación en 20 mL de PBS. La solución del compuesto a ensayar se prepara disolviendo en PBS o en una solución salina de NaCl al 0,9% a una concentración de 1024 ppm (1024 mg/L). A partir de esta solución madre se añade agua destilada estéril hasta obtener la concentración del compuesto deseada para ensayar.

Se realiza una mezcla consistente en 0,5 mL de la solución de dendrímero a la concentración deseada con 0,5 mL de la solución preparada de eritrocitos. La mezcla se realiza en tubos eppendorf. La mezcla se mantiene a 37 °C durante 30 min en agitación suave. Transcurrido el tiempo se centrifugan los tubos eppendorf a 1.500 rpm durante 5 min. El sobrenadante se transfiere a otro tubo eppendorf y se mide la absorbancia a 412 nm como índice de la hemoglobina liberada por lisis de los eritrocitos. Como control positivo se emplea un tubo eppendorf en el que se mezclan 0,5 mL de la solución de eritrocitos con 0,5 mL de agua destilada y se procede como se ha descrito anteriormente; en este caso la hemólisis obtenida es del 100 %. Como control negativo se usa un tubo eppendorf en el que se mezclan 0,5 mL de la solución de eritrocitos con 0,5 mL de solución salina, o PBS, sin compuesto disuelto; en este caso el grado de hemólisis es del 0 %.

El porcentaje de hemólisis se calcula mediante la siguiente ecuación: $(\text{Absorbancia problema} - \text{Absorbancia control negativo}) / (\text{Absorbancia del control positivo} - \text{Absorbancia del control negativo}) \times 100$. En los ensayos realizados se obtiene el HC20 que es la concentración del compuesto necesario para producir una hemólisis del 20 %. Los experimentos son realizados por triplicado.

RESULTADOS

Las NPs catiónicas objeto de la invención presentan actividad antibacteriana frente a cepas de *S. aureus* y *E. coli* (Figura 20). Los resultados muestran la influencia del tipo de bacteria, Gram positiva o Gram negativa, en la actividad de los sistemas estudiados. Las

NPs de plata tienen una actividad similar en las tres generaciones, aunque en particular las de tercera generación son más activas con *S. aureus* y las de primera con *E. coli*. Sin embargo, las NPs de oro de primera generación dan valores mucho más altos en ambos tipos de bacterias que el resto de sistemas. Por el contrario, las AuNPs de segunda y tercera generación presentan valores similares entre sí y con las correspondientes de plata, exceptuando el caso comentado de las NPs de plata de tercera generación para *S. aureus*.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS ANIÓNICAS COMO AGENTES ANTIVIRALES FRENTE AL VIH.

Se han estudiado nanopartículas de oro aniónicas cuyos grupos funcionales interaccionan con la proteína gp120 del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el receptor celular CD4 y/o los correceptores CCR5 o CXCR4, actuando en las primeras etapas del ciclo viral inhibiendo la infección por el VIH. Los resultados indican que estas AuNPs aniónicas podrían ser posibles microbicidas frenando la infección por el VIH. Sin embargo, no se descarta su actividad frente a otros virus como los de la gripe o el herpes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Nanopartículas de oro.

Se analizaron 6 nanopartículas funcionalizadas con dendrones de diferente generación. Por un método directo de dendronización se obtuvieron 3 nanopartículas de oro **Au@($\text{GnC2}(\text{SO}_3\text{Na})_m$)**, que a partir de ahora se denominarán como BDCP062 ($n = 1$, $m = 2$), BDCP063 ($n = 2$, $m = 4$) y BDCP064 ($n = 3$, $m = 8$), funcionalizadas con un dendrón de primera, segunda y tercera generación respectivamente. Otras 3 nanopartículas de oro fueron sintetizadas por un método indirecto, **Au@($\text{GnC2}(\text{SO}_3\text{Na})_m$)(SR)** ($R = (\text{CH}_2)_{11}\text{Me}$), que a partir de ahora se denominarán como BDCP071 ($n = 1$, $m = 2$), BDCP072 ($n = 2$, $m = 4$) y BDCP073 ($n = 3$, $m = 8$), funcionalizadas con un dendrón de primera, segunda y tercera generación respectivamente, que además de los dendrones aniónicos en la nanopartícula mantiene ligandos dodecanotiol que no pueden ser sustituidos totalmente.

Reactivos.

Como controles para los ensayos de toxicidad celular se empleó el Dextrano (Sigma-Aldrich), un polisacárido complejo y ramificado formado por numerosas moléculas de glucosa como control negativo de toxicidad celular y el Dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich), como control de muerte celular. Como control de inhibición de la replicación viral se empleó el T-20 (Genetech, San Francisco, Ca, EE.UU.), un inhibidor de la fusión del VIH-1 a las células diana debido a su unión a la glicoproteína gp41 del virus. El agua libre de nucleasas (Promega) se empleó para obtener las diluciones de trabajo de los compuestos a partir del stock y el PBS (Lonza) para hacer los lavados de las placas en los diferentes experimentos. La solución de Trypan Blue (Sigma-Aldrich) se empleó para teñir las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) muertas, aprovechando la alteración de la membrana de las mismas, facilitando así su conteo al microscopio óptico. La interleuquina 2 (IL-2, Bachem, Suiza) y la fitohemaglutinina (PHA, Remel, Santa Fe, EE.UU.), se utilizaron para estimularlas CMSP de los cultivos celulares.

Células.

Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP). Las muestras de sangre se obtuvieron a partir de buffycoats de donantes anónimos sanos procedentes del centro de transfusiones de la Comunidad de Madrid siguiendo las recomendaciones de la normativa vigente (Real Decreto 1088/2005). Las CMSP se aislaron mediante gradiente de Ficoll-Hypaque® (Rafer, España) siguiendo los estándares del Biobanco VIH del HGU Gregorio Marañón (Madrid, España). La sangre se diluyó en una proporción 1:1 con PBS y se procedió a su centrifugación en gradiente de densidad. Tras dicha centrifugación se recuperó el halo que contiene las CMSP y se procedió a varios ciclos de lavado-centrifugado con PBS (10 minutos a 1500 r.p.m.) para la limpieza y purificación de las mismas. Las CMSP resultantes se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 (Life technology, Madrid, España) suplementado al 10% con suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor, 2 mM L-glutamina y un cóctel de antibióticos (125mg/mL de ampicilina, 125 mg/mL cloxaciclina y 40 mg/mL de gentamicina; Sigma-Aldrich, St-Louis, EE.UU.). Las CMSP se cultivaron con 60 UI/mL IL-2 y se estimularon con 2 µg/mL PHA durante 48h en condiciones de cultivo (37°C en una atmósfera de 5% CO₂ y 95% de humedad relativa).

HEK293T (ATCC), línea celular empaquetadora derivada del epitelio humano renal. Se cultiva de forma rutinaria en medio de cultivo DMEM suplementado al 5% con SFB

inactivado por calor, 2mM de L-glutamina y el cóctel de antibióticos mencionado anteriormente a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

TZM.bl (ATCC® PTA-5659™), línea celular procedente de una línea HeLa generada a partir de la línea JC53-bl, que expresa los marcadores CD4, CCR5 y CXCR4, y los genes de la luciferasa y β-galactosidasa bajo el control del promotor de VIH-1. Se obtuvieron a través del NIH AIDS Research and Reference Reagent Program. Se cultivaron en medio de cultivo DMEM (Life technology, Madrid, España) suplementado al 5% con SFB inactivado por calor, 2 mM de L-glutamina y el cóctel de antibióticos mencionado anteriormente a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

Aislados virales.

Los aislados virales R5 trópico VIH-1_{NLAD8} y X4 trópico VIH-1_{NL4.3}, son aislados de laboratorio producidos por transfección transitoria de los plásmidos pNL(AD8) y pNL4.3, respectivamente, procedentes del NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, en la línea celular 293T. Para ello, los plásmidos conteniendo el genoma viral fueron crecidos en *E. coli* y se aislaron y purificaron por el kit PlasmidMaxiPrep, QIAGEN®. Se partió de cultivos confluentes de células 293T que se transfectaron con 15 µg de plásmido/placa utilizando un método de transfección por cloruro cálcico. A las 24 h se eliminó el medio y se lavaron los cultivos dos veces para retirar el plásmido no integrado en el genoma celular. Se añadió medio fresco al cultivo y se recogió la producción viral presente en el sobrenadante del cultivo a las 24 h y 48 h. Los stocks virales se clarificaron por filtración (filtro de 0,45 µm) y se llevó a cabo su titulación viral mediante cuantificación del antígeno VIH-p24^{gag} por un inmunoensayo enzimático (INNOTEST® HIV antigenmAb, Innogenetics N.V., Zwijndrecht, Bélgica), siguiendo las instrucciones del fabricante. Además, se evaluó la infectividad de los aislados virales en la línea celular TZM.bl, para ello se cultivaron 2 x 10⁴ células con medio de cultivo completo en placas de 96 pocillos y se añadieron los aislados virales a distintas concentraciones durante 3 horas, tras este tiempo se lavaron las células dos veces con PBS estéril y se dejaron en medio de cultivo. Tras 48 horas post-infección se determinó el porcentaje de infección mediante la medida de luminiscencia (Luciferase Assay System, Promega) utilizando un lector de placas (Multilector de placas Synergy 4, Biotek Instrument).

Ensayo de toxicidad por reducción de sales de tetrazolio.

Esta técnica es un ensayo colorimétrico basado en la capacidad selectiva de las células vivas para reducir el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio en cristales insolubles de formazán. Este método permite determinar el efecto letal de los compuestos en estudio, en este caso las nanopartículas de oro aniónicas, sobre el metabolismo celular, ya que los daños celulares se traducen en una disminución de la actividad mitocondrial de la célula pudiéndose medir la citotoxicidad de dichas moléculas. Este ensayo se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante (MTT, Sigma-Aldrich, St Louis, EE.UU.). Brevemente, tras el tiempo de incubación de las distintas poblaciones celulares en placa de 96 pocillos (2×10^4 células TZM.bl/pocillo y 2×10^5 CMSP/pocillo) con las diferentes concentraciones seleccionadas de las nanopartículas de oro aniónicas, se retiró el sobrenadante que contiene la nanopartícula y se sustituyó por 200 μ L de Opti-MEM® (medio sin suero ni rojo fenol) y 20 μ L de MTT (Azul de Tiazolil, 5 mg/mL, concentración final en pocillo de 0,5mg MTT/mL) por pocillo. Tras 3 horas de incubación en condiciones de cultivo, se procedió a la centrifugación de la placa a 1500 r.p.m. 10 min y a la posterior retirada del sobrenadante con el exceso de MTT que no reaccionó. Los cristales de formazán se disolvieron en 200 μ L de DMSO. La placa se agitó a 700 r.p.m. para asegurar la correcta disolución de dichos cristales y la concentración de formazán se determinó por espectrofotometría utilizando un lector de placas (Multilector de placas Synergy 4, Biotek Instrument) a una longitud de onda de 570nm (referencia de 690 nm). El espectrofotómetro se calibró a 0 utilizando Opti-MEM® sin células. La viabilidad celular relativa (%) respecto del control (células sin tratar) se calculó en base a la fórmula: $[A] \text{ test} / [A] \text{ control} \times 100$. Se utilizó dextrano a 10 μ M como control negativo de muerte celular, debido a su efecto inocuo, mientras que DMSO al 10% se empleó como control positivo de toxicidad. Cada experimento se realizó por triplicado.

Ensayo de inhibición de las nanopartículas de oro: cuantificación del VIH-1.

Se determinó la capacidad de inhibición de la infección por el VIH de las nanopartículas de oro en TZM.bl y CMSP. Para ello, se pre-trataron las distintas poblaciones celulares con las diferentes concentraciones de nanopartículas de oro aniónicas no tóxicas en placa de 96 pocillos (2×10^4 células TZM.bl/pocillo y/o 2×10^5 CMSP activadas/pocillo) durante 1 hora en condiciones de cultivo y posteriormente se infectaron las células con 20 ng VIH/10⁶ TZM.bl y 50 ng VIH/10⁶ CMSP de los distintos aislados virales durante 3

horas. A continuación, se retiró el sobrenadante que contiene las nanopartículas y el exceso de virus, se realizó un lavado con 200 µL de PBS y se reemplazó con 200 µL de medio nuevo manteniéndose los cultivos durante 72 h. Tras este tiempo post-infección en la línea celular TZM.bl se procedió a la retirada del sobrenadante, seguido de un lavado con 200 µL de PBS, para proceder al lisado celular por adición de 50 µL de buffer de lisis (Promega) por pocillo durante 30 min a 4°C. Posteriormente, se centrifugaron a 1500 r.p.m. durante 2 min para precipitar los restos celulares, se recogieron 25 µL del lisado celular y se añadieron a una placa de lectura para añadirle 100 µL/pocillo de sustrato de luciferasa (Luciferase Assay System, Promega) y se determinó el porcentaje de infección mediante la medida de luminiscencia utilizando un lector de placas (Multilector de placas Synergy 4, Biotek Instrument). Para las CMSP a las 72 h post-infección, se centrifugaron las placas a 1500 r.p.m. 10 min y se recogieron los sobrenadantes de los cultivos para cuantificar la producción de VIH Ag p24^{gag} por ELISA. Cada experimento se llevó a cabo por triplicado.

RESULTADOS

En este estudio con AuNPs con cargas negativas hemos mostrado su actividad antiviral para evitar la infección por el VIH, como mecanismo preventivo de la transmisión. En este trabajo se han estudiado seis AuNPs, se ha evaluado su bioseguridad en CMSP y TZM.bl, así como su efectividad inhibiendo la transmisión del VIH-1 y la infección viral, con el fin de determinar y caracterizar su potencial uso como microbicidas.

Está descrito que en la transmisión heterosexual del VIH-1, son principalmente los virus de tropismo R5 los dominantes y los implicados en las primeras etapas de la infección. Sin embargo, variantes del VIH-1 de tipo X4 también se han encontrado presentes en el semen, aunque su papel en estos primeros pasos de la infección sexual es todavía desconocido. Las nanopartículas de oro BDCP062, BDCP063, y BDCP064 disminuyeron significativamente la infección por ambos aislados R5-VIH y X4-VIH en células TZM.bl, mostrando valores de inhibición de la infección del VIH-1 >80%. Sin embargo, las AuNPs BDCP071 y BDCP072 mostraron una inhibición de la infección para el aislado viral R5 alrededor del 40% y BDCP073 del 70% en células TZM.bl. Cuando se realizaron los mismos experimentos en un modelo más fisiológico como las CMSP, las AuNPs BDCP064 y BDCP073 inhibieron la infección por el VIH-1 en un 78% y 88%, respectivamente. Este dato es de gran valor, ya que la inhibición es frente a un aislado

viral R5-VIH, que es el mayoritario en el momento de la transmisión del virus por vía sexual, en la fase aguda de la infección.

Viabilidad celular

- 5 En primer lugar se llevo a cabo un *screening* inicial de las diferentes nanopartículas para determinar las concentraciones a las que no producían toxicidad en CMSP y en la línea celular TZM.bl. Se estudió la toxicidad por el ensayo MTT, basado en la capacidad de las células vivas para reducir el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio en cristales insolubles de formazán. Se consideraron no tóxicas las concentraciones con una
- 10 viabilidad celular >80%.

Se estudió la viabilidad celular en CMSP de las AuNPs utilizando concentraciones del rango de 1 a 100 µg/ml, las cuales no fueron tóxicas ya que se obtuvo una viabilidad >80% (Figura 21).

15

- En la línea celular TZM.bl se estudiaron concentraciones del rango de 1 a 100 µg/ml obteniéndose valores elevados de toxicidad, por lo que se realizó un nuevo ensayo MTT con concentraciones menores en un rango de 0,01 a 1 µg/ml. La toxicidad fue variable en función del tipo de nanopartícula de oro aniónica utilizada. Para las AuNPs BDCP071,
- 20 BDCP072 y BDCP073 se descartaron las concentraciones mayores a 1 µg/ml (datos no mostrados), (Figura 22a), mientras que para las nanopartículas BDCP062, BDCP063y BDCP064 se muestra el rango de toxicidad completo de 0.01 a 100 µg/ml (Figura 22b).

Evaluación de la actividad antiviral.

- 25 Con el objetivo de desarrollar una nueva estrategia para la prevención de la infección por el VIH-1, se analizó el porcentaje de inhibición de la infección por el VIH que se producía cuando las células se pre-trataban con las nanopartículas de oro aniónicas, en primer lugar se realizó en TZM.bl y posteriormente en CMSP.

30 Pre-tratamiento e infección en TZM.bl

Las AuNPs aniónicas fueron no tóxicas a las concentraciones de 10 µg/ml, 0,1 µg/ml y 0.5 µg/ml, para las nanopartículas BDCP062, BDCP063 y BDCP064 respectivamente (Figura 22B) y de 0.05 µg/ml para BDCP071, BDCP072 y BDCP073 (Figura 22A). Una vez pre-tratadas las células se infectaron con el aislado R5-VIH-1_{NLAD8} de AuNPs y con el aislado

X4-VIH-1_{NL4.3} para las **Au@GnC2(SO₃Na)_m**. Los resultados muestran una inhibición de la infección por el VIH-1 en el caso de las AuNPs BDCP062, BDCP063, y BDCP064 hasta del 80% a la concentración máxima no tóxica para el aislado viral R5 trópico y casi del 100% en el caso de BDCP062 y BDCP064 y del 50% para BDCP063 para el aislado viral X4. Mientras, que en el caso de las AuNPs BDCP071, BDCP072 y BDCP073 la inhibición no fue significativa, con un 36%, 34% y 64% respectivamente para el aislado viral R5 trópico (Figura 23).

Pre-tratamiento e infección en CMSP

Se seleccionaron como concentraciones para realizar el pre-tratamiento en las CMSP las concentraciones máximas no tóxicas que para todas las AuNPs fue de 100 µg/ml. Tras realizar el pre-tratamiento en las CMSP se infectaron con el aislado R5-VIH-1_{NLAD8}. Se cuantificó la infección por la detección de antígeno p24^{gag} en el sobrenadante del cultivo. Los resultados muestran que las nanopartículas BDCP064 y BDCP073 inhiben la infección por el VIH-1 en las CMSP en un 78% y 88%, respectivamente, mientras que en el resto de AuNPs la inhibición no fue significativa (Figura 24).

REIVINDICACIONES

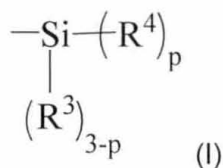
1. Nanopartícula metálica dendronizada con dendrones de naturaleza carbosilano que comprende:

-Un núcleo compuesto por átomos metálicos, principalmente átomos de oro o plata;

-Un compuesto dendrítico recubriendo la superficie metálica, preferentemente un dendrón que contiene un punto focal y una capa externa;

-El punto focal se puede seleccionar del grupo $-(CH_2)_z-R^1$; donde z es un número entero que varía de 1 a 10, preferiblemente z varía de 1 a 5 y más preferiblemente z es 4; y R^1 es una función que comprende preferentemente un átomo de azufre o un grupo amino $-NH$.

-La capa externa o periferia consiste, total o parcialmente, en unidades iguales o diferentes del grupo de fórmula (I):



donde: R^3 es un grupo alquilo (C_1-C_4),

p es un número entero y varía entre 1 y 3, y

R^4 es el siguiente grupo $-(CH_2)_x-S-(CH_2)_y-R^5$;

x representa un número entero que varía de 2 a 5;

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

R^5 es un grupo $-OH$, $-SO_3H$, $-OSO_3H$, $-COOR'$, $-NR''R'''$, donde R' , R'' y R''' , representan de manera independiente un grupo alquilo (C_1-C_4) o un hidrógeno; o cualquiera de sus sales.

2. Nanopartícula metálica dendronizada cuyo núcleo metálico puede tener preferentemente una disposición de sus átomos esférica, cilíndrica, de prisma u otras, con al menos una dimensión entre 1 y 1000 nm, pero preferentemente esférica con un diámetro entre 1 y 20 nm.

3. Nanopartícula metálica dendronizada según la reivindicación 1, donde el compuesto dendrítico es una cuña dendrítica o un dendrímero.
4. Nanopartícula metálica dendronizada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3,
5 donde el compuesto dendrítico es una cuña dendrítica con un átomo de azufre en el punto focal del tipo $-S(CH_2)_z-Si$; donde z es un número entero que varía de 1 a 10 y Si es un átomo de silicio de la capa externa según se recoge en la reivindicación 1.
5. Nanopartícula metálica dendronizada según cualquiera de las reivindicaciones
10 anteriores, donde p es 2.
6. Nanopartícula metálica dendronizada según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R^3 es un grupo metilo.
- 15 7. Nanopartícula metálica dendronizada según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde x es 2 ó 3.
8. Nanopartícula metálica dendronizada según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R^5 es un grupo $-N(CH_3)_2$.
20
9. Nanopartícula metálica dendronizada según la reivindicación anterior, donde y es 2.
10. Nanopartícula metálica dendronizada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4,
donde R^5 es un grupo $-CO_2H$ o $-CO_2Me$.
25
11. Nanopartícula metálica dendronizada según la reivindicación anterior, donde y es 1 ó 2.
12. Nanopartícula metálica dendronizada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4,
30 donde R^5 es un grupo $-SO_3H$ o $-OSO_3H$.
13. Nanopartícula metálica dendronizada según la reivindicación anterior, donde y es 2 ó 3.

14. Nanopartícula metálica dendronizada según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la capa externa comprende además un grupo $R^{5'}$ diferente al resto de grupos R^5 que forman la capa externa del compuesto dendrítico ($R^{5'} = OR^6$, NHR^6 , CO_2R^6), donde estos grupos R^6 se pueden seleccionar entre una molécula etiqueta,
5 preferiblemente un fluoróforo, un grupo director o un principio activo.
15. Nanopartícula metálica dendronizada según la reivindicación anterior, donde R^6 es un fluoróforo que se selecciona de la lista que comprende fluoresceína, rodamina, dansilo.
10
16. Nanopartícula metálica dendronizada según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha nanopartícula es catiónica, cuando R^5 es un grupo amonio, o aniónica para el resto de grupos R^5 descritos en la reivindicación 1.
- 15 17. Nanopartícula metálica dendronizada según la reivindicación anterior, donde dicha nanopartícula está en forma de sal.
18. Procedimiento de obtención de las nanopartículas descritas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, que comprende una reacción entre el precursor metálico y
20 una cuña dendrítica.
19. Procedimiento de obtención de las nanopartículas metálicas dendronizadas descritas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, que comprende una reacción entre el precursor metálico y un dendrímero con un núcleo de tipo $-(CH_2)_z-S-S-(CH_2)_z$; donde
25 z es un número entero que varía de 1 a 10, preferiblemente z varía de 1 a 5 y más preferiblemente z es 4; y una periferia del tipo $-[Si(R^3)_{3-p}(R^4)_p]$ como la descrita en la reivindicación 1.
20. Procedimiento de obtención de las nanopartículas metálicas dendronizadas según
30 cualquiera de las reivindicaciones 18 o 19, donde el precursor metálico es ácido tetracloroaúrico $H[AuCl_4]$ o cualquiera de sus sales.
21. Procedimiento de obtención de las nanopartículas metálicas dendronizadas según cualquiera de las reivindicaciones 18 o 19, donde el precursor metálico es $AgNO_3$.

22. Procedimiento de obtención de las nanopartículas metálicas dendronizadas según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, donde dicha reacción se lleva a cabo preferentemente en presencia de un disolvente polar como agua.
23. Procedimiento de obtención de las nanopartículas metálicas dendronizadas según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22, donde dicha reacción se realiza preferiblemente en presencia de un agente reductor.
24. Procedimiento según la reivindicación anterior, donde el agente reductor es preferiblemente tetrahidrobórato de sodio.
25. Procedimiento de obtención de nanopartículas metálicas dendronizadas descritas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, que comprende una reacción entre una nanopartícula ya formada y una cuña dendrítica, que presenta las características expuestas en las reivindicaciones anteriores.
26. Procedimiento de obtención de nanopartículas metálicas dendronizadas descritas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, que comprende una reacción entre una nanopartícula ya formada y un dendrímero con un núcleo de tipo $-(CH_2)_z-S-S-(CH_2)_z-$, donde z es un número entero que varía de 1 a 10, preferiblemente z varía de 1 a 5 y más preferiblemente z es 4; y una periferia del tipo $-[Si(R^3)_{3-p}(R^4)_p]$ como la descrita en la reivindicación 1.
27. Uso de las nanopartículas metálicas dendronizadas descritas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, como agente antibacteriano, amebicida o antiparasitario.
28. Uso de las nanopartículas metálicas dendronizadas descritas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, como agente antiviral.
29. Uso de las nanopartículas metálicas dendronizadas según la reivindicación 28, donde el virus es VIH.

30. Uso de las nanopartículas metálicas dendronizadas catiónicas, donde el grupo R⁵ es un grupo amino, descritas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, como vector no viral.
- 5 31. Uso según la reivindicación anterior, donde el vector no viral es empleado para la transfección o internalización de material nucleico.
32. Uso según la reivindicación anterior, donde el material nucleico se selecciona entre oligonucleotidos, ARN o ADN.
- 10 33. Uso de las nanopartículas metálicas dendronizadas descritas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, para la elaboración de un medicamento.
34. Uso de las nanopartículas metálicas dendronizadas según la reivindicación 33, para
15 la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades causadas por un microorganismo.
35. Uso de las nanopartículas metálicas dendronizadas según la reivindicación anterior, donde la enfermedad es causada por una infección bacteriana o parasitaria.
- 20 36. Uso de las nanopartículas metálicas dendronizadas según la reivindicación 34, para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades causadas por el VIH.
- 25 37. Composición farmacéutica que comprende las nanopartículas metálicas dendronizadas descritas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17.
38. Composición farmacéutica según la reivindicación 37 que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y/u otro principio activo, preferiblemente un
30 antibiótico, antiinflamatorio o antiviral.
39. Composición farmacéutica según la reivindicación 37 que además comprende material nucleico.

40. Composición farmacéutica según la reivindicación anterior, donde el material nucleico se selecciona de entre oligonucleotidos, ARN o ADN.

5 41. Uso de las nanopartículas metálicas dendronizadas descritas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, como vehículo de transporte de moléculas.

42. Uso según la reivindicación anterior, donde la molécula es aniónica o catiónica.

10 43. Uso según la reivindicación anterior, donde la molécula es un fármaco, preferiblemente un antibiótico.

44. Uso según la reivindicación 42 donde la molécula es un fármaco antiviral.

15

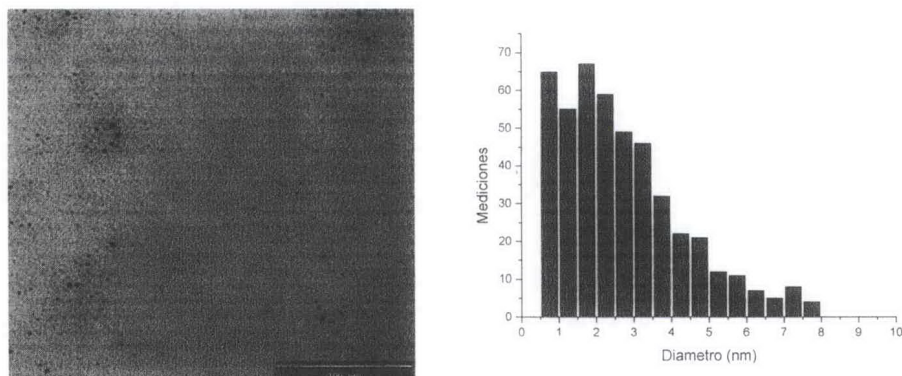


FIG 1

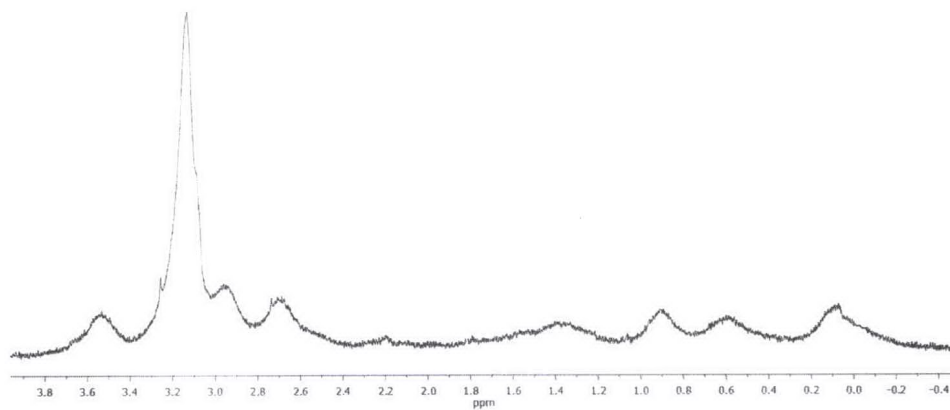


FIG 2

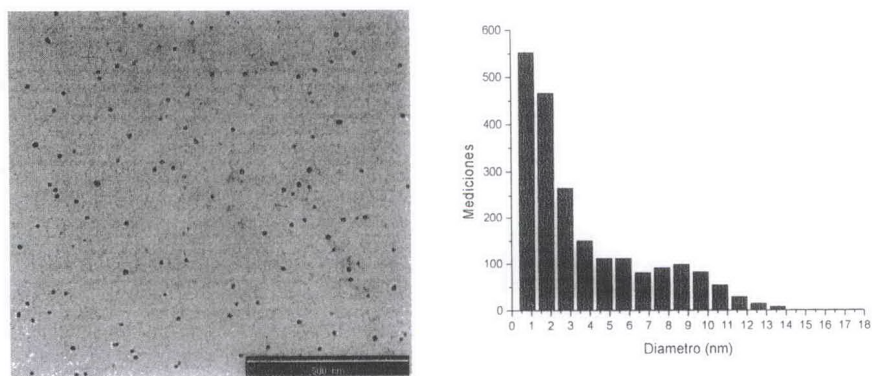


FIG 3

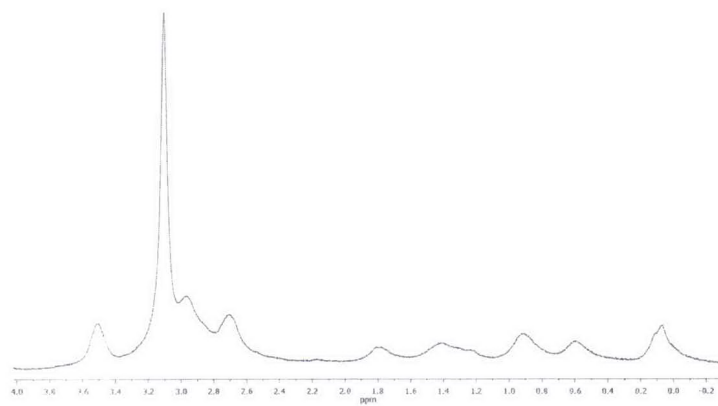


FIG 4

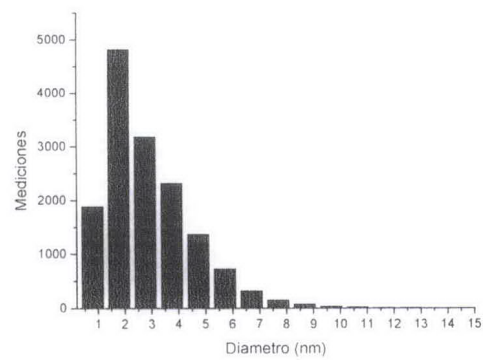
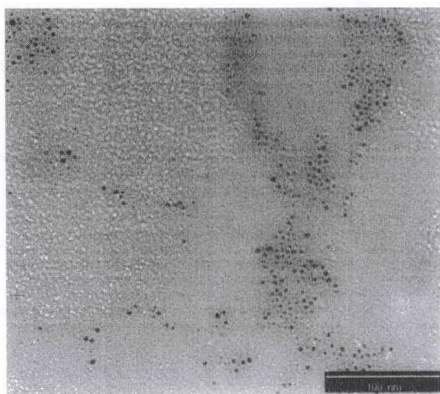


FIG 5

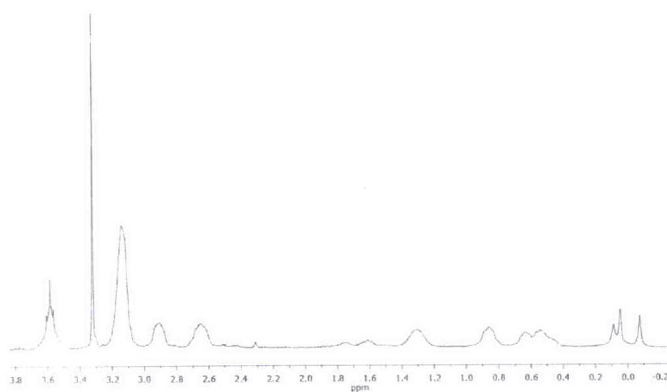


FIG 6

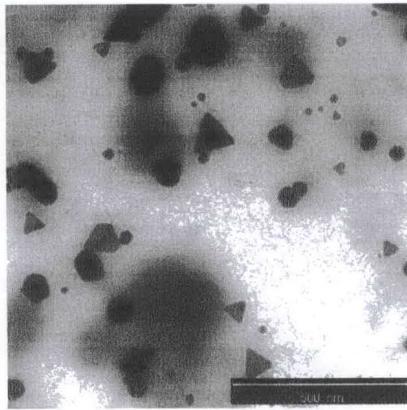


FIG 7

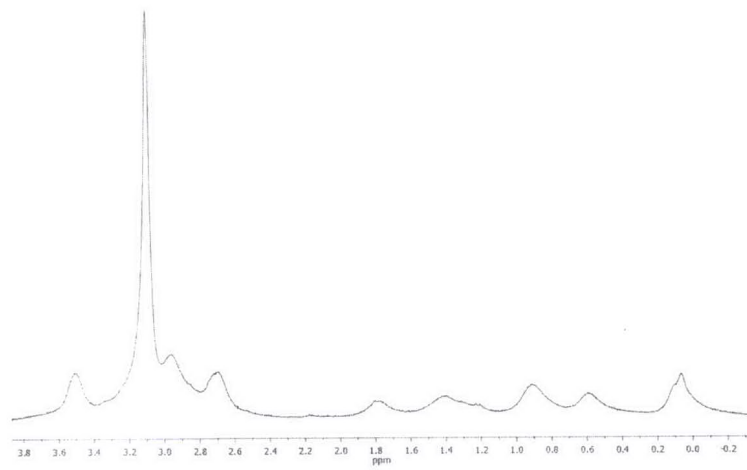


FIG 8

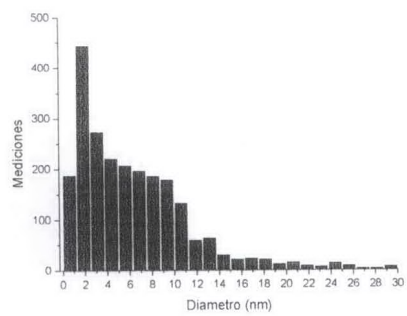
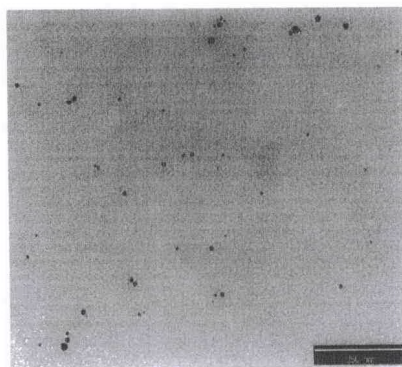


FIG 9

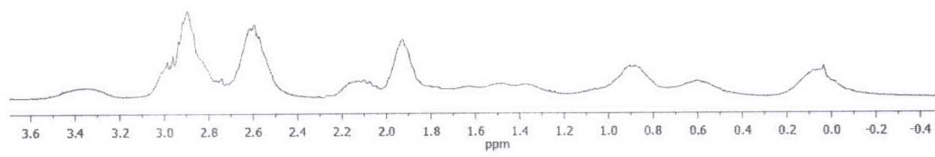


FIG 10

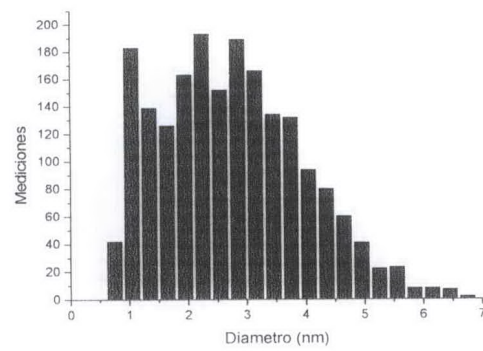
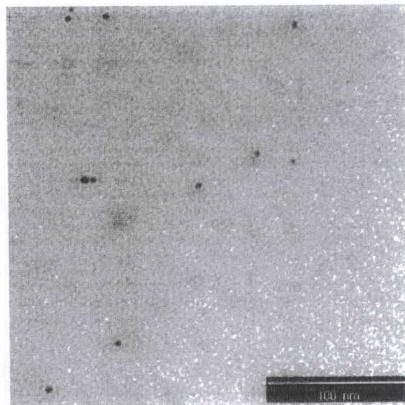


FIG 11

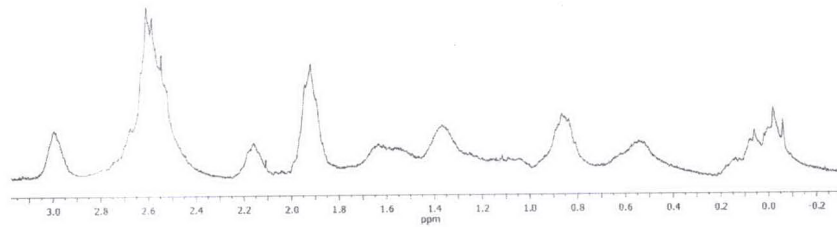


FIG 12

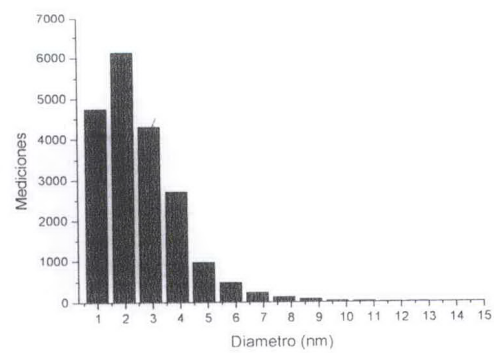
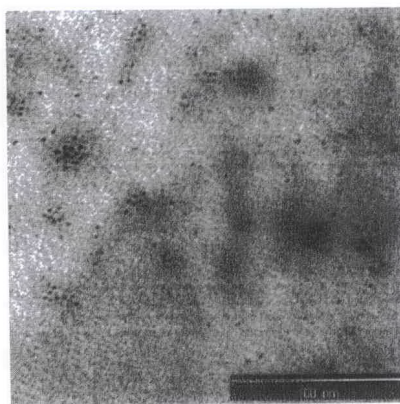


FIG 13

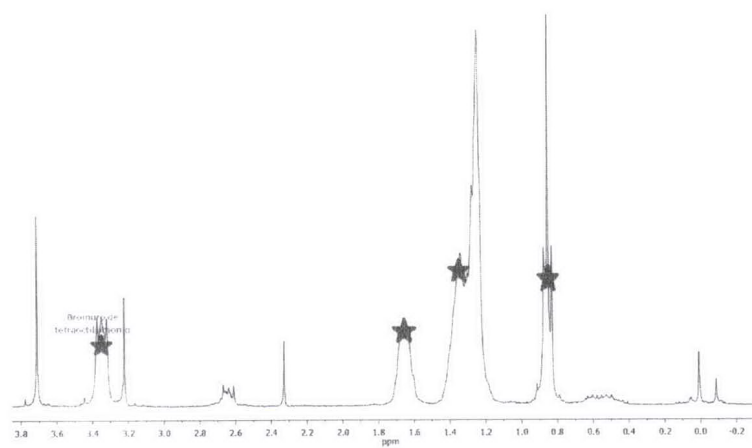


FIG 14

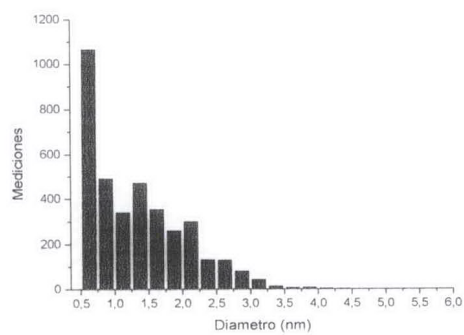
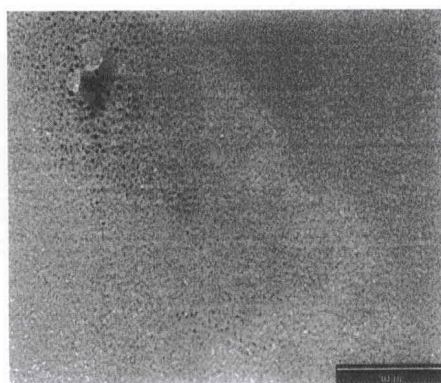


FIG 15

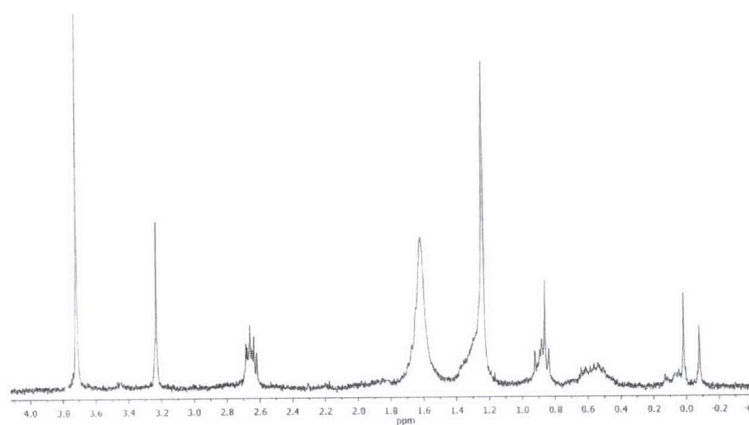


FIG 16

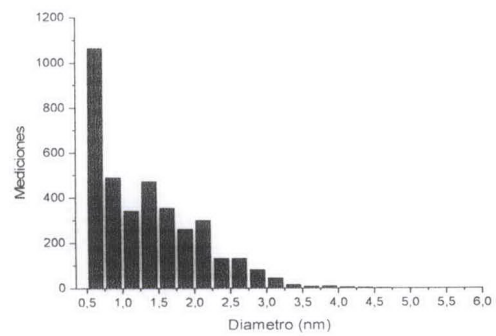
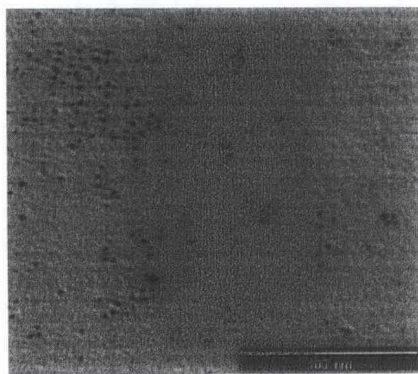


FIG 17

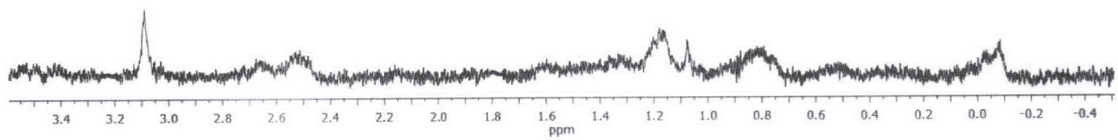


FIG 18

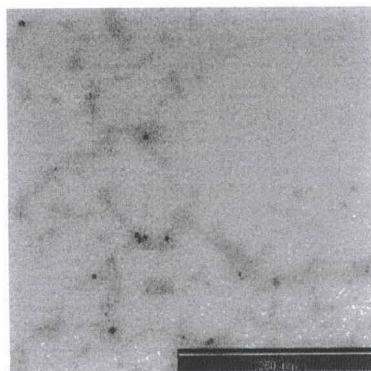


FIG 19

	S. aureus		E. coli	
	CMI (mg/L)	CMB (mg/L)	CMI (mg/L)	CMB (mg/L)
BDCP078	64.00	128.00	128.00	128.00
BDCP079	8.00	8.00	16.00	16.00
BDCP080	8.00	16.00	32.00	32.00
BDCP086	8.00	16.00	8.00	16.00
BDCP087	16.00	16.00	32.00	32.00
BDCP088	4.00	4.00	32.00	32.00

FIG 20

Toxicidad en CMSP

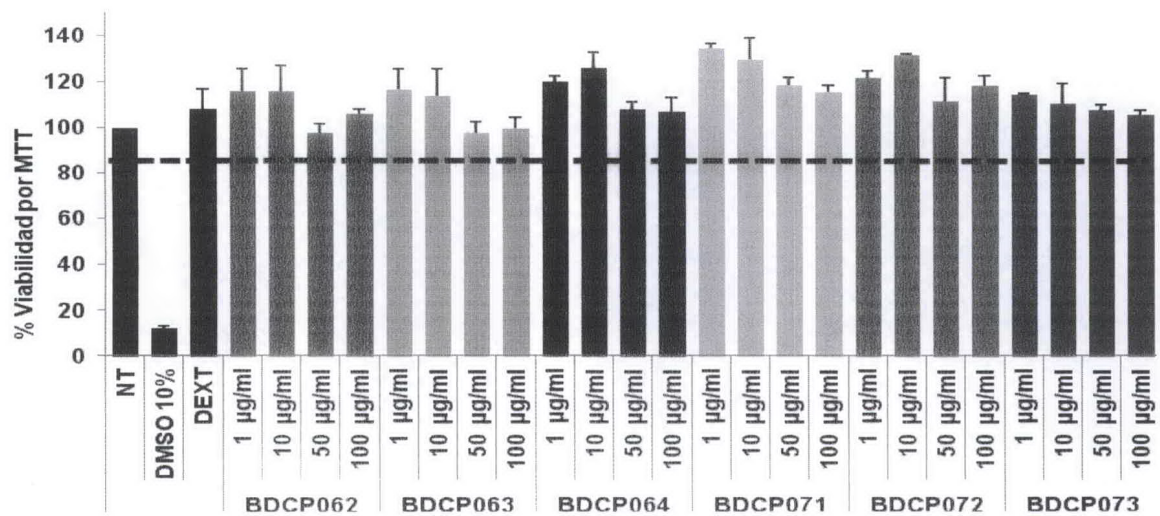


FIG 21

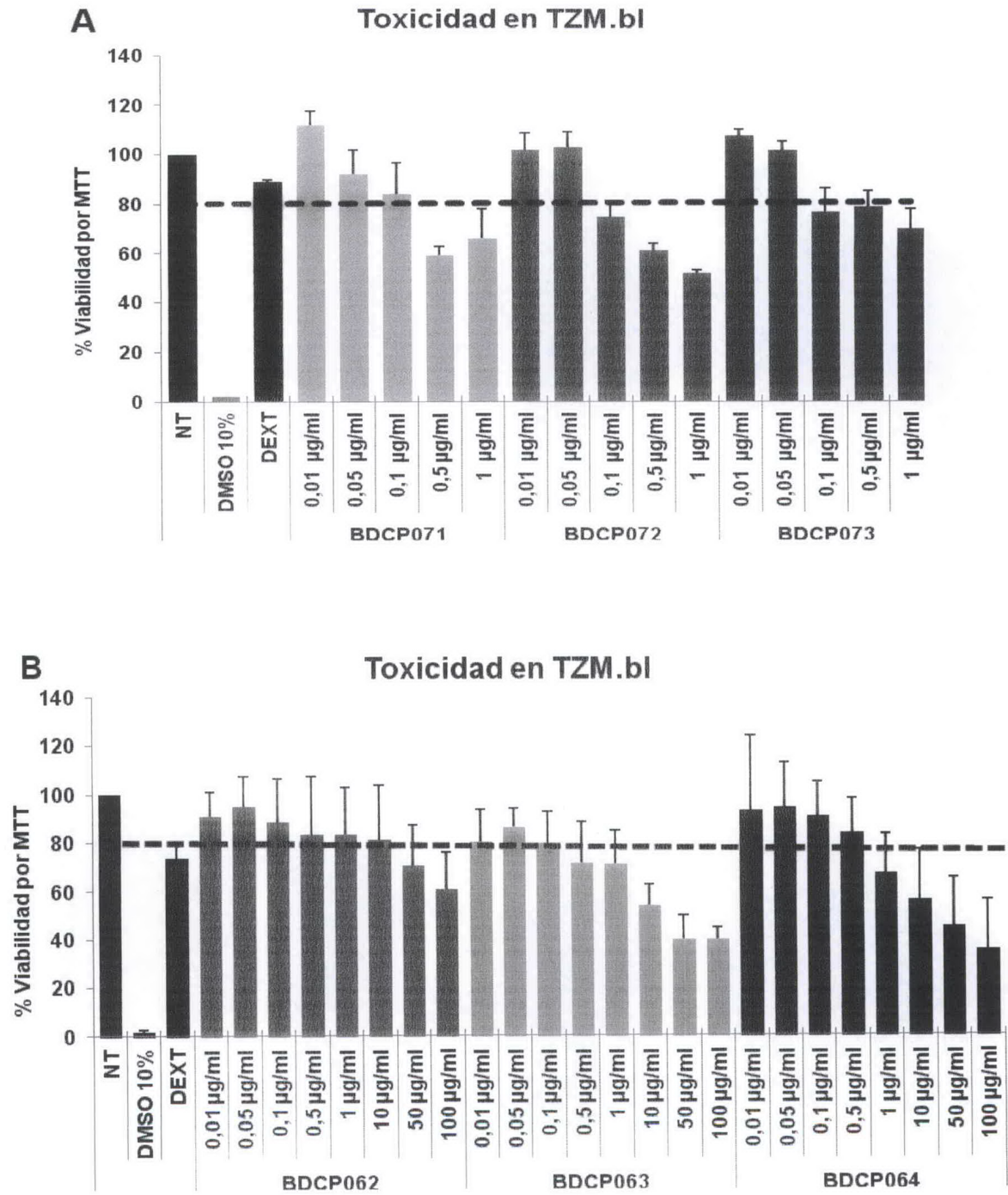


FIG 22

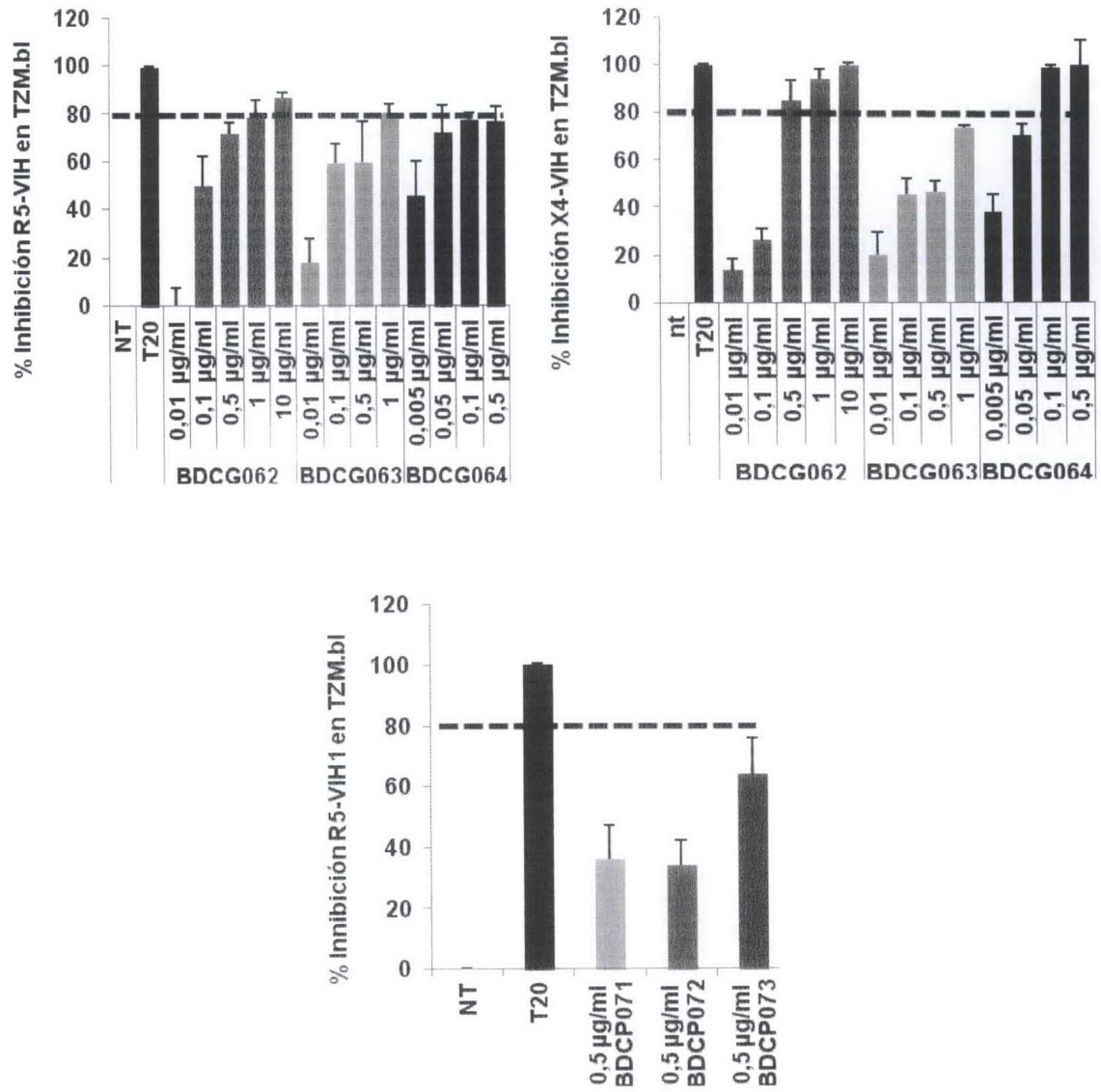


FIG 23

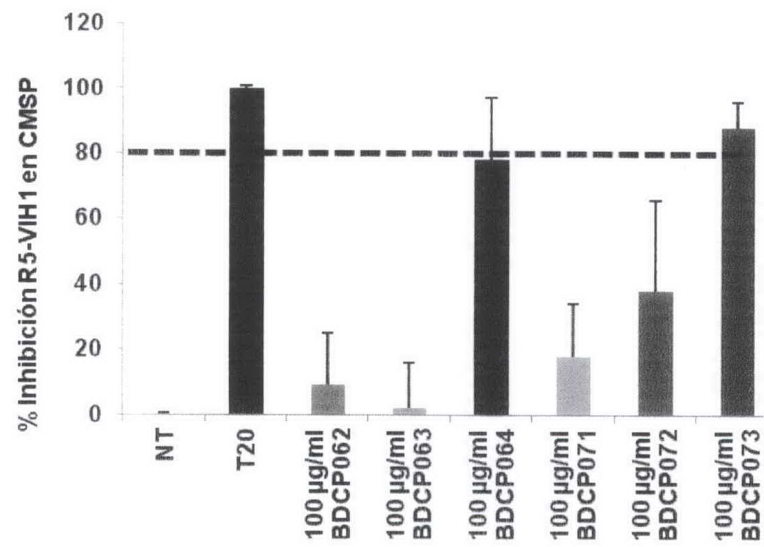


FIG 24