

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
30 de agosto de 2018 (30.08.2018)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2018/154165 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:
A61K 49/18 (2006.01) B82Y 5/00 (2011.01)

LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2018/070130

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(22) Fecha de presentación internacional:
21 de febrero de 2018 (21.02.2018)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201730221 21 de febrero de 2017 (21.02.2017) ES

(71) Solicitante: FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PROGRESO Y SALUD [ES/ES]; Avda. Américo Vespucio, nº 15, Edificio S-2, 41092 Sevilla (ES).

(72) Inventores: DE LA CUEVA MÉNDEZ, Guillermo; FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PROGRESO Y SALUD, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), C/Doctor Miguel Diaz Recio, 28, 29010 Málaga (ES). CANO LUNA, Manuel; FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PROGRESO Y SALUD, Avda. Américo Vespucio, nº 5, 41092 Sevilla (ES). NÚÑEZ LOZANO, Rebeca; FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PROGRESO Y SALUD, Avda. Américo Vespucio, nº 5, 41092 Sevilla (ES).

(74) Mandatario: FUSTER, Gustavo; Paseo de la Castellana 140. Planta 3ª., Edificio Lima., 28046 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT,

(54) Title: NANOPARTICLES MODIFIED WITH ALKOXY-SILANE DERIVATIVES

(54) Título: NANOPARTÍCULAS MODIFICADAS CON DERIVADOS ALCOXI-SILANOS

(57) Abstract: The invention relates to a nanoparticle obtained by means of thermal decomposition, comprising at least two alkoxy-silane derivatives. The invention also relates to a composition, the uses thereof and a synthesis method.

(57) Resumen: Nanopartícula obtenida por descomposición térmica que comprende al menos dos derivados alcoxi-silanos. La invención también se refiere a una composición, usos y un método de síntesis.



WO 2018/154165 A1

Nanopartículas modificadas con derivados alcoxi-silanos

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se encuentra dentro del campo de la medicina (Nanomedicina), de la química y de la bioquímica, y se refiere a una nanopartícula superparamagnética, preferiblemente de óxido de hierro (SPION) obtenida por descomposición térmica, modificada superficialmente mediante un intercambio de ligando con dos derivados alcoxi-silanos de manera simultánea. La presente invención se refiere también a las composiciones, al procedimiento de modificación de la nanopartícula y a sus usos.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El fenómeno de la resonancia magnética nuclear (RMN) sucede debido a que los núcleos de distintos átomos absorben diferentes energías en el dominio de radiofrecuencia, resonando a concretas frecuencias cuando el campo magnético aplicado se cambia periódicamente. El hidrógeno es uno de los elementos más apropiados para el fenómeno de la resonancia magnética nuclear, y es el elemento más común contenido en el cuerpo humano. Por estos motivos, la imagen por resonancia magnética es capaz de proporcionar imágenes de gran resolución de tejidos blandos con información anatómica detallada. Las imágenes se obtienen situando al sujeto en un campo magnético y observando las interacciones entre los espines magnéticos de los protones de agua del sujeto y la radiofrecuencia de radiación aplicada. La imagen se resuelve aplicando gradientes de campo magnético ortogonales que en última instancia codifican espacialmente las tres coordenadas de cada píxel de la imagen. Los espines magnéticos de la muestra liberan la energía adquirida durante la excitación, como un campo magnético oscilante de forma exponencialmente decreciente que induce una pequeña corriente en una bobina receptora. Dos parámetros, llamados tiempos de relajación del protón, son de una importancia fundamental en la generación de la imagen: T1 (tiempo de relajación longitudinal) y T2 (tiempo de relajación transversal). T1 o tiempo de relajación de espín-red representa la transferencia de energía entre los espines del protón observado y la red circundante, y T2 o tiempo de relajación espín-espín es la transferencia de energía entre diferentes espines o protones. Un parámetro adicional, llamado tiempo de relajación T2*, resulta también necesario para describir apropiadamente el decaimiento total de la inducción magnética. Este decaimiento incluye, tanto el decaimiento del T2, como los procesos adicionales de desfase causados por la inevitable falta de homogeneidad en el campo magnético que producen, variaciones en la susceptibilidad magnética local. Por esta razón, T2* es siempre más breve que T2. La señal de resonancia magnética (MR) detectada incluye, por

tanto, una combinación de tiempos de relajación T1, T2 y T2*, así como la contribución de la densidad del protón.

Una ventaja de esta técnica es que no emplea radiación ionizante, aportando imágenes de gran calidad sin exponer al paciente a ningún tipo de radiación perjudicial. Sin embargo, los contrastes de RMN endógenos e inherentes son, en muchos casos, insuficientes para resolver adecuadamente pequeñas lesiones anatómicas o caracterizar adecuadamente la fisiología de los tejidos. Por esta razón, se han desarrollado series específicas de agentes exógenos para potenciar los componentes T1, T2 o T2* de la imagen, respectivamente. Aunque se han realizado importantes avances en agentes potenciadores de T1 y T2, se sabe mucho menos sobre la investigación de la potenciación de T2*, que podría hacer posible la imagen de la perfusión tisular y tumoral con una resolución y sensibilidad muy aumentadas.

Los agentes de contraste para la imagen por resonancia magnética (IMR) se dividen en dos clases generales de materiales activos magnéticamente: Materiales paramagnéticos y superparamagnéticos o ferromagnéticos. Los agentes de contraste paramagnéticos incluyen sustancias basadas en pequeños quelatos de gadolinio (III) (Gd-DTPA, Gd-DTPA-BMA, Gd-DOTA, Gd-DO3A) [E. Toth et al., 2001. The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging, John Wiley & Sons, 45], y los agentes de contraste superparamagnéticos se basan en nanopartículas (NPs) con núcleo de óxido de hierro (Fe_3O_4 , Fe_2O_3) de tamaño muy reducido (<10 nm, USPIO-ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles) o reducido (<100 nm, SPIO-superparamagnetic iron oxide) [Kharissova O.V. et al., 2013. RSC Advances 3, 22648-22682].

Los agentes paramagnéticos inducen un aumento en la intensidad de imagen RM en secuencias ponderadas en T1 (potenciación de contraste positiva), y los agentes superparamagnéticos inducen un descenso en la señal de resonancia magnética en secuencias ponderadas en T2 (potenciación de contraste negativa). La sensibilidad y especificidad de ambos tipos de agentes es muy distinta. Mientras que los quelatos de gadolinio tienen una relajatividad que requiere concentraciones milimolares del compuesto en el tejido objetivo, las NPs superparamagnéticas, debido a su mayor peso molecular, son efectivas en rangos micromolares o nanomolares.

Los materiales nanoestructurados superparamagnéticos fueron desarrollados como agente de contraste para IRM ya que su estructura a nanoescala modificaba profundamente el tiempo de relajación de los protones potenciando de este modo la sensibilidad del diagnóstico IRM. Además mediante modificaciones en la superficie de las NPs con vectores específicos biológicamente activos, como anticuerpos monoclonales o policlonales o sistemas avidina-biotina, puede incrementarse también la especificidad del diagnóstico IRM.

La calidad de las partículas usadas como agente de contraste de IRM está determinada por las propiedades magnéticas del núcleo del material, la distribución del tamaño de la partícula, la superficie de carga de la partícula, la estabilidad en disolventes casi neutrales o suero fisiológico, así como las propiedades químicas y funcionales de moléculas inmovilizadas en la superficie. Además, el comportamiento farmacocinético constituye un determinante importante en aplicaciones de imagen por resonancia magnética, ya que el agente idealmente debería permanecer en el tejido diana solo durante el examen IRM, y ser rápidamente eliminado después, sin acumularse en ninguna parte del cuerpo.

Los productos comerciales se sintetizan por coprecipitación (tamaño del núcleo de 5-10 nm) en medio acuoso. Este método de síntesis simple y sostenible produce NPs magnéticas no tóxicas (MNP) de pequeño tamaño (<10nm), que se pueden mantener fácilmente en suspensión coloidal, pero que presentan distribuciones significativamente grandes (>20%). El tamaño hidrodinámico y la naturaleza química del recubrimiento influyen en la distribución de MNP y por tanto en el órgano o tejido de acumulación. Las nanopartículas SPIO recubiertas de dextrano (Feridex) y Carboxydextrano (Resovist®) con tamaños hidrodinámicos superiores a 100 nm han sido utilizadas para imagen de hígado, mientras que las nanopartículas USPIO con tamaños hidrodinámicos inferiores a 50 nm han sido utilizadas para angiografías y aplicaciones de permeabilidad de tumores. Sin embargo, los recubrimientos de dextrano o carboxydextrano dan lugar a una unión significativa y no específica por absorción de esas partículas a las superficies vasculares y de tejidos, limitando la eliminación efectiva de estas partículas una vez que el estudio por imagen se ha realizado siendo requeridos tiempos de espera relativamente largos hasta una completa eliminación y eventual readministración. Por estos motivos la producción y caracterización de NPs magnéticas con escasa adherencia tisular y vascular que favorezcan una rápida eliminación y una baja acumulación tisular presentan actualmente una gran relevancia.

Los procedimientos de elaboración de agentes de contraste de tipo T2 están descritos en la literatura.

Un protocolo apropiado para producir NPs magnéticas de óxido de hierro comprende la coprecipitación de sales férricas y ferrosas en un medio alcalino en ausencia o presencia de surfactantes. Las NPs así obtenidas tienen un núcleo con un diámetro comprendido entre 1 y 50 nm.

El recubrimiento de las NPs magnéticas con polímeros biocompatibles o copolímeros se lleva a cabo a través de unión covalente por activación de las NPs con carbodiimida. Las NPs con una estructura de núcleo con recubrimiento tienen un diámetro hidrodinámico comprendido entre 1 y 150 nm.

El superparamagnetismo es una propiedad física que sólo se presenta en NPs de MFe_2O_4 (M=Fe, Co, Mn) con tamaños inferiores a 20-30 nm. La obtención eficiente de este tipo de NPs inorgánicas con un tamaño, forma, homogeneidad y cristalinidad adecuada se consigue empleando métodos de síntesis basados en la descomposición térmica de sus precursores orgánicos de hierro, y requieren del uso de disolventes orgánicos, surfactantes y temperaturas elevadas. Sin embargo, las NPs superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIONs, *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles*) generadas por estos métodos son hidrofóbicas, al estar recubiertas de ligandos surfactantes, y por tanto estables en disolventes apolares.

Con objeto de utilizar estas SPIONs hidrofóbicas en cualquier aplicación industrial y clínica es necesario hacerlas hidrofílicas, especialmente en aquellos casos en los que su uso tenga lugar necesariamente en medios acuosos (como son las orientadas a biología, biotecnología y biomedicina). Uno de los métodos más empleados para cambiar la solubilidad de estas NPs son los de "Intercambio de Ligando", los cuales se basan en la sustitución de los ligandos hidrofóbicos de su superficie por otros ligandos que poseen un extremo reactivo con la superficie de la partícula y otro extremo con grupos hidrofílicos [De Palma et al., 2007. Chem. Mater. 19, 1821-1831]. Generalmente, este método se lleva a cabo añadiendo un exceso del nuevo ligando a una disolución muy diluida de la NPs en un determinado disolvente orgánico, lo que provoca un desplazamiento del ligando hidrofóbico original por gradiente de concentración. Algunos de los ligandos más usados para el intercambio de ligando suelen contener grupos ácido carboxílico (ej. Citrato) [Lattuada M. et al., 2007. Langmuir 23, 2158-2168], fosfonato o bifosfonato [Sandiford L. et al., 2013. ACS Nano 7, 500-512], alcohol (ej. Dextrano) [López-Cruz A. et al., 2009, J. Mater. Chem. 19, 6870-6876], o catecol (ej. Dopamina) [Lak. A. et al., 2013. Nanoscale 5, 11447-11455], etc. en uno de sus extremos, los cuales permiten al nuevo ligando quedar adsorbido químicamente sobre la superficie de la partícula formando una capa protectora. Sin embargo, la estabilidad acuosa de las SPIONs resultantes con estos ligandos es bastante limitada en el tiempo, especialmente en medios biológicos, debido principalmente a que esta "adsorción química" es una unión no covalente y los ligandos son fácilmente desorbidos de la superficie de la partícula en función de su constante de disociación (es decir, desplazados progresivamente por otras moléculas del medio que les rodea). Además, las SPIONs obtenidas de esta manera pueden perder cualquier funcionalización a la que hayan sido sometidas durante el proceso de síntesis, ya que este tipo de unión no covalente puede verse afectada (comprometida) por las condiciones en las que tiene lugar la reacción y/o en los procesos requeridos para su purificación (especialmente en el caso del uso de columnas Sephadex®), que induzcan la separación de moléculas asociadas a la partícula, necesarias para su correcta función (clínica, biotecnológica, industrial, etc.).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Con el objetivo de mejorar las propiedades de contraste T2-MRI y el tiempo en circulación de las SPIONs, y al mismo tiempo mantener una excelente estabilidad estructural y coloidal de las NPs, se propuso la modificación superficial de las SPIONs obtenidas por descomposición térmica con al menos dos derivados alcoxi-silano simultáneamente. En particular, la presente invención describe cómo el uso de una combinación de 60 % de Si(OCH₂CH₃)₄ (TEOS) y 40 % de NH₂-(CH₂)₃-Si(OCH₂CH₃)₃ (APTES), para la modificación superficial de estas SPIONs hidrofóbicas, y su posterior PEGilación, permite generar partículas con mejores propiedades de contraste T2-MRI que sus antecesoras obtenidas sólo con APTES (100%). Las SPIONs PEGiladas producidas por este método mantienen buenas propiedades de estabilidad estructural y coloidal, baja citotoxicidad y facilidad de funcionalización posterior. Estos resultados ejemplifican el punto anterior (la utilidad y potencial de usar mezclas de alcoxi-silanos para proporcionar nuevas propiedades físico químicas a las NPs, manteniendo e incluso mejorando su estabilidad coloidal y estructural) y abren la puerta a una nueva estrategia para la modificación superficial de SPIONs, con capas delgadas de sílica, para el desarrollo y optimización de estas NPs para un alto número de aplicaciones, tanto en diagnóstico de cáncer como en su terapia.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Ilustración esquemática de la síntesis de SPIONs estables estructural y coloidalmente. Tanto las moléculas como las NPs no estas dibujadas a escala.

Figura 2. Imágenes de TEM de las NPs (A) SPION-OA, (B) SPION-TEOS/APTES y (C) SPION-TEOS/APTES-PEG.

Figura 3. Estabilidad coloidal de NPs SPION-TEOS/APTES en disolución tampón MES a pH 6.0 (A) y de SPION-TEOS/APTES-PEG en agua (C). (B) Variación del tamaño hidrodinámico de las NPs SPION-TEOS/APTES en agua o 0.25 M PBS (pH 7.4) o 0.05 M MES (pH 6.0) o 30 mg/mL BSA en 0.25 M PBS (pH 7.4) con el tiempo durante 5 días. (D) Igual que (B) para las NPs SPION-TEOS/APTES-PEG con el tiempo durante 7 días.

Figura 4. (A) FTIR y (B) TGA de las NPs SPION-OA (negro), SPION-TEOS/APTES (azul) y SPION-TEOS/APTES-PEG (rojo). (C) XPS de NPs SPION-APTES (negro) y SPION-TEOS/APTES (rojo). (D) Variación del Zeta-potencial en función del pH para NPs SPION-APTES-PEG (negro) y SPION-TEOS/APTES-PEG (rojo).

Figura 5. (A) Análisis VSM de las NPs SPION-OA (negro), SPION-APTES (azul) y SPION-APTES-PEG (rojo). (B) Imágenes de phantom de MRI mostrando el contraste positivo (T1) y negativo (T2) producido por las NPs SPION-TEOS/APTES-PEG y/o las SPION-APTES-PEG a las concentraciones indicadas a un campo magnético de 9.4 T.

Figura 6. Citotoxicidad de las células HepG2 tratadas con las NPs SPION-APTES/TEOS-PEG. (A) Imágenes representativas de la línea celular HepG2 tratada con las concentraciones indicadas de NPs SPION-APTES/TEOS-PEG durante 48 horas y mostrando las células totales (tinción azul) y las células muertas (tinción amarilla). Escala = 0.05 cm. (B) Número total de células en cultivo tratadas con las concentraciones indicadas de NPs durante 24 y 48 horas. (C) Número total de células muertas en cultivo analizadas en B. (D) Porcentaje de células muertas en las mismas células analizadas en B.

Figura 7. (A-L) Imágenes T2W representativas obtenidas a partir de los ratones antes y después de la administración intravenosa de 9-11 mg Fe·Kg⁻¹ de SPION-APTES-PEG (A-F) y SPION-APTES/TEOS-PEG (G-L) a los tiempos indicados. Las dos imágenes trasversales del animal en cada tiempo muestran determinados órganos. (M-N) Ratios del tiempo de relajatividad T2 en los diferentes tejidos medidos a partir de los mapas de MRI tras la inyección intravenosa de NPs SPION-APTES-PEG (M) y SPION-APTES/TEOS-PEG (N). (O) Ratio del tiempo de relajatividad T2 en la médula renal – músculo a los tiempos indicados tras la administración i.v. de NPs SPION-APTES-PEG y SPION-APTES/TEOS-PEG.

Figure 8. Imágenes T2W representativas, con código de colores, obtenidas antes y después de la administración i.v. de 9-11 mg Fe-Kg-1 en ratones tanto de NPs SPION-APTES-PEG (A) como SPION-TEOS/APTES-PEG (B) a los tiempos indicados. (C) Ejemplo de imagen T2W resaltando las diferentes áreas medidas en el riñón (ROIs).

5 **Figura 9.** (A) Espectro UV-visible de NPs SPION-TEOS/APTES-PEG-Cy5 (rosa), SPION-TEOS/APTES-PEG (rojo), SPION-TEOS/APTES (azul) y un blanco como muestra control (negro) tratado con ninhidrina. (B) Ilustración esquemática de las funcionalización de las NPs SPION-TEOS/APTES-PEG con Cy5-NHS éster. (C) Espectro UV-visible de absorción de las NPs SPION-TEOS/APTES-PEG-Cy5 (rosa), SPION-TEOS/APTES-PEG (rojo) y Cy5 libre
10 (verde). (D) Imagen de phantom de Fluorescencia mostrando la emisión de las NPs SPION-TEOS/APTES-PEG antes y después de funcionalizar con Cy5 ($\lambda_{ex} = 600 \text{ nm}$ y $\lambda_{em} = 700 \text{ nm}$).

Figura 10. Representación de algunos derivados alcoxi-silanos que pueden ser utilizados para la modificación química de distintas superficies.

15

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han desarrollado un método para la solubilización en agua de nano partículas, preferiblemente SPIONs obtenidas por descomposición térmica, que se basa en un intercambio de ligando con al menos dos derivados alcoxi-silanos
20 simultáneamente en una proporción determinada como por ejemplo, pero sin que represente una limitación, 60% TEOS y 40% APTES, y su preferible posterior PEGilación mediante una reacción de amidación con un derivado de polietilenglicol (α -Metoxi- ω -carboxi PEG). Las nano partículas, preferiblemente PEGiladas, generadas de esta forma presentan mejores propiedades de contraste T2-MRI y mayor tiempo en circulación que sus antecesoras
25 obtenidas sólo con APTES (100%). Las NPs, preferiblemente PEGiladas, producidas por este método mantienen excelentes propiedades de estabilidad estructural y coloidal, baja citotoxicidad y facilidad de funcionalización posterior. Estos resultados abren la puerta a una nueva estrategia para la modificación superficial de nano partículas, con capas delgadas de sílica, la cual permite el desarrollo y optimización de estas nano partículas para determinadas
30 aplicaciones, tanto en el diagnóstico de cáncer como en su terapia, así como para otras aplicaciones cosméticas, industriales, biotecnológicas, etc., como por ejemplo pero sin limitarnos a, catálisis, detoxificación, descontaminación, purificación biomoléculas, células, etc.

NANOPARTÍCULA DE LA INVENCION

Por tanto, un **primer aspecto** de la invención se refiere a una nanopartícula (NP), preferiblemente SPIONs obtenidos por descomposición térmica, que comprende al menos dos derivados alcoxi-silanos diferentes.

- 5 Las NPs pueden ser de cualquier nanomaterial inorgánico, preferiblemente obtenido por “descomposición térmica”, como por ejemplo, pero sin limitarnos a, NPs magnéticas (ejemplo, MFe_2O_4 con $M=Fe, Co, Mn$), fluorescentes (ejemplo, Quantum dots), fosforescentes (ejemplo, tierras raras: $NaYbF_4$), de metales nobles (Oro, Plata, Platino, etc.), etc. Preferiblemente, las NPs son SPIONs.
- 10 En esta memoria se entiende por “descomposición térmica” al procedimiento de síntesis de nanocristales o NPs inorgánicas con un tamaño controlado y una distribución homogénea de NPs a través de la descomposición térmica de compuestos organometálicos, en disolventes orgánicos de alto punto de ebullición que contienen tensioactivos estabilizadores. La descomposición térmica permite un elevadísimo grado de control en el tamaño y diferencia de
- 15 tamaños en las NPs, lo que da lugar a un comportamiento muy homogéneo en cuanto a sus características físicoquímicas. Esto es importante para trasladar las NPs a la práctica clínica.

En esta memoria se entiende por “derivados alcoxi-silanos” a los compuestos químicos derivados del silicio que se caracterizan por la presencia de radicales Si-O-C (alcoxi). Preferiblemente, se entienden como derivados alcoxi-silanos cualquier compuesto que tenga al

20 menos un grupo silicio hidrolizable, OR, que se reticula mediante “policondensación del silano” en presencia de humedad. Más particularmente, la presente invención se ilustra a través de la utilización de los siguientes dos “derivados alcoxi-silanos” simultáneamente: $Si(OCH_2CH_3)_4$ (TEOS) y $NH_2-(CH_2)_3-Si(OCH_2CH_3)_3$ (APTES).

De forma no limitante una posible fórmula de derivados alcoxi-silanos útiles en la presente

25 invención se ilustra a continuación:



donde R es un grupo químico seleccionado de la lista que consiste en: un grupo alquilo, alquenos, alquinos, aromáticos, alcóxidos, organofuncionales o cualquier combinación de los mismos; preferiblemente R es un grupo organofuncional o funcional, preferiblemente un grupo

30 amino, unido a un grupo alquilo C1 a C20, más preferiblemente C1 a C10, más preferiblemente C1 a C6, más preferiblemente C1 a C3, más preferiblemente C2. Preferiblemente R es un grupo amino unido a un grupo C3 o a un alcoxi del tipo metoxi- o etoxi;

donde m puede ser 0, 1, 2 ó 3;

donde n representa un número natural entre 0 y 3; y

donde X representa un grupo alcóxido, preferiblemente un metoxi- o un etoxi-.

5 En la presente invención se entiende por grupo “organofuncional” o “funcional” al sitio en que la mayoría de las reacciones químicas tienen lugar. Al respecto el doble enlace en los alquenos y el triple enlace en los alquinos se consideran también como grupos funcionales. Los principales grupos funcionales se seleccionan de la lista que consiste en alcanos, alquenos, alquinos, alcoholes, éteres, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres, aminas, amidas y cualquier combinación de los mismos,

10 En una realización preferida de este aspecto de la invención, la NP de invención se modifica superficialmente con dos derivados alcoxi-silanos mediante un procedimiento de intercambio de ligando. En esta memoria se entiende por “intercambio ligando” al cambio químico que ocurre cuando un ligando X es desplazado por otro Y, siendo un ligando una molécula unida químicamente a una NP.

15 En una realización preferida de este aspecto de la invención, la NP de la invención es magnética, y más preferiblemente super-paramagnética.

20 De acuerdo con una realización de la invención, la NP magnética consiste en uno o más de los siguientes componentes: i) un núcleo inorgánico que contiene uno o más de los elementos seleccionados entre metales de transición, incluyendo pero no limitado a hierro, cobalto, manganeso, cobre y magnesio; o ii) un núcleo inorgánico compuesto por una aleación que contenga elementos seleccionados entre metales de transición, incluyendo pero no limitado a hierro, cobalto, manganeso, cobre y magnesio.

En una realización particular de la invención el núcleo inorgánico de la NP magnética es seleccionado del grupo formado por óxido de hierro, ferrita de cobalto, ferrita de manganeso, ferrita de magnesio y sus combinaciones.

25 En una realización más particular de la invención, el núcleo inorgánico de la NP magnética es óxido de hierro.

30 La NP obtenida por descomposición térmica que es hidrofóbica es convertida en hidrofílica por un proceso de modificación superficial basado en un intercambio de ligando con dos derivados alcoxi-silanos simultáneamente. Por tanto, en una realización preferida de este aspecto de la invención, la NP de la invención es hidrofílica.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, los derivados alcoxi-silanos se seleccionan de la lista que consiste en: Tetraetilortosilicato (TEOS), 3-aminopropil-trietoxisilano (APTES), 3-aminopropil-trimetoxisilano (APTMS), 3-mercaptopropil trietoxisilano (MPTES), 3-

mercaptopropil trimetoxisilano (MPTMS), 3-Glicidoxipropil trietoxisilano, 3-Glicidoxipropil trimetoxisilano, 3-Cianatopropil trietoxisilano (CPTES), 3-Cianatopropil trimetoxisilano (CPTMS), 3-Azidatopropil trietoxisilano, 3-Azidatopropil trimetoxisilano, trimetoxi PEG silanos y α -silano- ω -metoxi polietilenglicol, o derivados o análogos.

- 5 En otra realización más preferida de este aspecto, la NP de la invención comprende dos derivados alcoxi-silanos que se seleccionan de entre: Tetraetilortosilicato (TEOS) y 3-aminopropil-trietoxisilano (APTES), y más preferiblemente en una proporción 60% TEOS y 40% APTES o en otras proporciones próximas a dicha proporción 60/40 TEOS/APTES tal y como son cualquier proporción +/- 20% de dicha proporción 60/40, tales como proporciones 40/60 ó
10 80/20 y cualquier otra proporción intermedia entre estos dos valores.

Preferiblemente, las NPs de la invención se caracterizan por presentar un tamaño medio de partículas inferior a 50 nm, más preferiblemente inferior a 30 nm, preferentemente tienen un tamaño medio comprendido entre 5 y 25 nm, y aún más preferentemente entre 10 y 20 nm.

- Por "tamaño medio", o "diámetro medio" se entiende el diámetro promedio de la población de
15 NPs dispersa en un medio acuoso. El diámetro medio de estos sistemas se puede medir por procedimientos estándar conocidos por el experto en la materia, y que se describen, por ejemplo, en los ejemplos más abajo.

- Existen varios procedimientos para mejorar la solubilidad de las NPs. El control en la solubilización es difícil de conseguir para que las NPs permanezcan suficientemente estables
20 en el tiempo. A la NP en la que se ha hecho el intercambio de ligando con los alcoxi-silanos, todavía se le puede incrementar la estabilidad coloidal (evita la formación de agregados). Por tanto, necesita incorporar grupos que mejoren la solubilidad. De esta forma, en una realización preferida, las NPs de la invención están PEGiladas. Más preferiblemente, con el derivado de polietilenglicol α -Methoxy- ω -carboxy PEG. Más preferiblemente, la PEGilación se realiza
25 mediante una reacción de amidación.

COMPOSICIÓN DE LA INVENCION

Un **segundo aspecto** de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante composición de la invención, que comprende la NP de la invención.

- 30 En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención es una composición farmacéutica, más particularmente para el diagnóstico médico *in vivo*. En otra realización preferida, la composición es una composición cosmética.

Las NPs de la invención pueden tener múltiples aplicaciones, como por ejemplo, pero sin limitarnos a, aplicaciones industriales, biotecnológicas, etc.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Así, las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen, pero sin limitarse a, cualquier composición líquida (suspensión del sistema incluyendo las NPs en agua o en agua con aditivos tales como viscosizantes, tampones de pH, etc.) o sólida (el sistema incluyendo las NPs liofilizadas o atomizadas formando un polvo que se puede utilizar para elaborar granulados, comprimidos o cápsulas) para su administración bien por vía oral, bucal o sublingual, bien tópica, o bien en forma líquida o semisólida para su administración por vía transdérmica, ocular, nasal, vaginal o bien parenteral. En el caso de las vías no parenterales el contacto de las NPs con la piel o mucosas podrá mejorarse dotando a las partículas de una importante carga positiva, lo que favorecerá su interacción con las citadas superficies cargadas negativamente. En el caso de las vías parenterales, más en concreto para la administración intravenosa, estos sistemas ofrecen la posibilidad de modular la distribución *in vivo* de los fármacos o moléculas que puedan llevar asociadas. Pueden ser también suspensiones en fluidos biológicos, tales como el suero. Las suspensiones acuosas pueden estar tamponadas o no tamponadas y pueden tener componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes, incluyendo, pero sin limitarse a, agentes microbianos, antioxidantes, quelantes, y similares, y nutrientes incluyendo glucosa, dextrosa, vitaminas y minerales. Las composiciones pueden combinarse con varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo pero sin limitarse a; aglutinantes tales como celulosa micro-cristalina, goma tragacanto, o gelatina; excipientes tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes tales como ácido algínico o almidón de maíz, etc.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención además comprende al menos un compuesto o molécula biológicamente activa, un agente terapéutico o fármaco, o un agente marcador.

La expresión "molécula biológicamente activa" tiene un sentido amplio y comprende moléculas tales como fármacos de alto, o más preferentemente, de bajo peso molecular, polisacáridos, proteínas, péptidos, lípidos, oligonucleótidos y ácidos nucleicos, así como combinaciones de las mismas. En una variante de la invención la molécula biológicamente activa tiene como función prevenir, paliar, curar o diagnosticar enfermedades. En otra variante de la invención la molécula biológicamente activa tiene una función cosmética.

En esta memoria el término "molécula biológicamente activa" incluye también los términos "principio activo", "sustancia activa", "sustancia farmacéuticamente activa", "ingrediente

activo”, “agente terapéutico”, “fármaco”, “agente o molécula con fines diagnósticos *in vivo*”, o “ingrediente farmacéuticamente activo”, es decir, significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. Incluye también a los cosméticos, diagnósticos así como los industriales (enzimas, moléculas quelantes, etc.).

Las NPs de la invención también pueden comprender otras moléculas biológicamente activas y otros agentes, para usos industriales, como por ejemplo enzimas y agentes quelantes

Adicionalmente, la NP de la invención puede comprender más de una molécula biológicamente activa distinta.

Dicho principio o principios activos adicionales pueden estar incluidos en el sistema para el transporte de moléculas biológicamente activas de la invención o formar parte de la composición farmacéutica de la invención sin ser parte del sistema de transporte.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención además comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable.

USO DE LA NANOPARTÍCULA DE LA INVENCION Y DE LA COMPOSICION DE LA INVENCION

En función de la capa de silano y su composición, las propiedades de la NP pueden variar, con distintos niveles de capacidad diagnóstica *in vivo* y terapéutica, así como con distintas aplicaciones biotecnológicas, industriales, etc. Se hace notar que tanto la nanopartícula de la invención y como la composición farmacéutica de la invención son útiles para el diagnóstico y la terapia, en particular para el diagnóstico *in vivo*.

Así, un **tercer aspecto** de la invención se refiere al uso de la NP de la invención o de la composición de la invención, en la elaboración de un medicamento, o alternativamente, a la nanopartícula de la invención o la composición de la invención para su uso como medicamento o como agente útil en el diagnóstico *in vivo*.

Adicionalmente, las NPs de la invención pueden servir como vehículos de principios activos.

Por tanto, otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de la NP o de la composición de la invención en la administración de principios activos.

Además, puede servir para realizar mediciones de la perfusión en el tejido normal y en patologías que afectan al sistema vascular, como la isquemia tisular, o a otros sistemas, como

neurodegeneración, inflamación, edema o cáncer, en animales o humanos por medio de resonancia magnética.

Por tanto, otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de la nanopartícula o de la composición de la invención en el diagnóstico *in vivo* por resonancia magnética nuclear.

MÉTODO DE LA INVENCIÓN

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a un método para la síntesis de las NPs de la presente invención que comprende:

10 1. Síntesis de NPs hidrofóbicas, preferiblemente SPIONs hidrofóbicas.

A modo meramente ilustrativo se hace notar que dichas SPIONs de, por ejemplo 10 nm, esféricas, monodispersas e hidrofóbicas, se pueden producir por el método de “descomposición térmica” descrito por Park et al. [Park J. et al., 2004. Nat. Mater. 3, 891-895]. Se hace notar que existen distintas variantes del método de síntesis de SPIONs por
15 “Descomposición Térmica” y que se basan fundamentalmente en el uso de otros precursores orgánicos de hierro. Aunque también pueden cambiar el disolvente y los surfactantes usados.

Una lista de dichos posibles precursores orgánicos de hierro sería por ejemplo la siguiente:

- complejos de hierro con ácidos grasos (en nuestro caso, usamos el “Oleato de hierro (III)”)
- 20 -Acetilacetonato de hierro (III),
- Carboxilato de hierro (III),
- Complejo de Colinacitrato-hierro (III),
- complejo de cupferrón-hierro(III), y
- pentacarbonilo de hierro.

25 Por otro lado, existen otros métodos de Síntesis que generen SPIONs hidrofóbicas distintos al método de Descomposición Térmica o cualquiera de sus variantes. En este sentido, dichas metodologías se incluyen en la presente memoria.

2. Síntesis de NPs, preferiblemente SPIONs-derivados de alcoxisilanos de silicios a partir de las NPs del paso 1 o de otras NPs idénticas o similares con dos o más alcoxi-

silanos, preferiblemente a través de un procedimiento de intercambio de ligando ejecutado simultáneamente.

Preferiblemente para la síntesis de estas partículas se añade la combinación de alcoxi-silanos de interés a las SPIONs suspendidas en un medio oleoso. Por ejemplo, 0.15 % (v/v) de TEOS (300 μ L), 0.10 % (v/v) APTES (200 μ L), y 0.01 % (v/v) de ácido acético (20 μ L) se le añadieron a 40 mg of SPION-OA suspendidas en 200 mL de n-hexano. Esta mezcla se agitó orbitalmente durante 72 h a temperatura ambiente para permitir el desplazamiento progresivo de las moléculas de ácido oleico en las SPION-OA por los 2 derivados alcoxi-silano usados (TEOS y APTES). Las NPs resultantes (SPION-TEOS/APTES) son insolubles en n-hexano y por tanto precipitan cuando el proceso de intercambio de ligando se ha completado. Estas NPs se separaron con la ayuda de un imán de neodimio y se lavaron tres veces con 50 mL de n-hexano para eliminar el exceso de TEOS y APTES y de cualquier otro reactivo sin reaccionar. Finalmente, las partículas se secaron a 60 °C y al vacío durante 48 h, para permitir la completa condensación de los alcoxi-silanos ligados a la superficie de la NP.

3. Opcionalmente, se lleva a cabo una PEGilación de las NPs obtenidas en el paso 2).

A modo meramente ilustrativo, una vez sintetizadas las SPIONs del paso 2) se procede a la PEGilación de dichas NPs. A modo meramente ilustrativo este paso se puede llevar a cabo suspendiendo las SPION-TEOS/APTES (30 mg) del paso 2) en 10 mL de agua ultrapura. Por otro lado, se mezclaron 2 kDa CH₃O-PEG-COOH (180 mg), EDC·HCl (20 mg) y NHS (12 mg) en 10 mL de MES 0.1 M MES (pH 6), y se incubaron a temperatura ambiente para permitir la activación de los grupos ácido carboxílico del PEG. Una vez transcurrido el tiempo de activación, se mezclaron ambas disoluciones y se dejaron reaccionar durante 2-3 horas a temperatura ambiente y con agitación magnética. Después, las NPs se purificaron mediante diálisis frente a agua ultrapura usando una membrana de 12-14 KDa (cut-off); y opcionalmente

4. Funcionalización de las NPs del paso 3) o del paso 2).

A modo meramente ilustrativo, una vez sintetizadas las SPIONs del paso 3) se procede a su funcionalización, por ejemplo, pero sin limitarnos a, cianina-5. Así, se disolvieron Cy5-NHS éster (2 mg) en 200 μ L de DMSO y se añadieron lentamente a 14 mg of SPION-TEOS/APTES-PEG disueltas en 800 μ L de PBS 0.25 M pH 8.0. La mezcla se dejó reaccionar en ausencia de luz y con agitación orbital durante 4 h a 4° C para permitir la unión del Cy5 a los grupos amino de la superficie de las NPs. Después, las NPs SPION-TEOS/APTES-PEG-Cy5 se purificaron usando una columna Sephadex G-25 y una disolución de PBS pH 7.4 como fase móvil.

Los inventores de la presente invención, muestran en los ejemplos incluidos en la presente memoria que las SPION PEGiladas generadas por el método descrito anteriormente presentan mejores propiedades de contraste T2-MRI y mayor tiempo en circulación que sus antecesoras

obtenidas sólo con APTES (100%). Además, las SPIONs PEGiladas producidas por este método mantienen buenas propiedades de estabilidad estructural y coloidal, baja citotoxicidad y facilidad de funcionalización posterior.

KIT O DISPOSITIVO Y USOS

5 Algunos nanosistemas, como las NPs de la invención, permiten el desarrollo nanotecnológico de nuevas, prometedoras y fascinantes posibilidades en el diagnóstico y tratamiento médico. Los nanodispositivos utilizados como agentes de contraste en el diagnóstico médico por imagen (especialmente, en IMR, ecografía y tomografía) tienen claras ventajas sobre los
10 agentes tradicionales en relación a una mejor dispersión óptica, una mejor biocompatibilidad, una disminución en la probabilidad de desnaturalización y, especialmente, su capacidad de unirse a ligandos, lo cual los convierte en dispositivos con múltiples funciones que se unen a las células diana, permitiendo obtener una imagen para el diagnóstico y al mismo tiempo transportar medicamentos, permitiendo un tratamiento más específico y eficiente.

La nanotecnología permite el diseño de nanomateriales multifuncionales con una semivida
15 plasmática prolongada (gracias a la incorporación superficial de cadenas poliméricas hidrófilas), necesaria para alcanzar de forma segura su objetivo y liberar específicamente la dosis de fármaco vehiculizada en el lugar deseado, aumentando al mismo tiempo la biodisponibilidad del agente activo en el tejido diana. En cuanto al tratamiento del cáncer, estas NPs pueden alcanzar la región tumoral simplemente por acumulación o retención (transporte
20 pasivo). Este fenómeno se denomina efecto de permeación y retención aumentada (efecto “EPR”), y es debido a las características diferenciales del entorno tumoral, donde el tejido vascular se encuentra alterado. Esto explica por qué se da una mayor acumulación de NPs en la masa tumoral, en comparación con un tejido sano [Martínez-Soler G.I. et al., 2010. ARS Pharmaceutica 51, Suplemento 3, 113-116; Núñez-Lozano R. et al., 2015. Current Opinion in
25 Biotechnology 35, 135-140].

Las NPs caracterizadas por una extensa semivida plasmática pueden atravesar la estructura
anormal de los vasos sanguíneos de tejidos patológicos (cáncer, inflamación, infección). El destino biológico de todo coloide transportador de fármacos se puede mejorar notablemente si
30 tiene: i) un tamaño de partícula muy pequeño (< 100 nm) y una morfología esférica; y, ii) unas adecuadas propiedades eléctricas y termodinámicas superficiales (muy baja carga eléctrica, e hidrofilia).

La composición de la invención, adicionalmente puede comprender un marcador detectable. Un “marcador detectable” se refiere a cualquier marcador que se puede usar para localizar la composición *in vivo* o *in vitro*.

Ejemplos de marcadores, pero sin limitarse a estos, serían fluoróforos (por ejemplo, Cianina-5), marcadores químicos o proteicos que permiten la visualización de un polipéptido. La visualización puede realizarse a simple vista o mediante un aparato (como por ejemplo, pero sin limitarse a un microscopio) y puede implicar una fuente de energía o de luz.

- 5 Por tanto, **otro aspecto** de la invención se refiere a un kit o dispositivo de diagnóstico, que comprende al menos una nanopartícula de la invención, o la composición farmacéutica de la invención.

Los términos molécula biológicamente activa, fármaco o agente terapéutico, o marcador detectable, tienen significados análogos y se utilizan indistintamente en la memoria de esta
10 invención. Se refieren a cualquier sustancia que proporcione actividad farmacológica y se emplee en el tratamiento, cura, prevención, mitigación o diagnóstico de una enfermedad o que afecte a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. Estas moléculas biológicamente activas pueden incluir desde fármacos de bajo peso molecular hasta moléculas del tipo de polisacáridos, proteínas, péptidos, lípidos, oligonucleótidos y ácidos nucleicos y
15 combinaciones de las mismas. Estas moléculas, son bien conocidas para el experto en la materia e incluye el significado de un compuesto que tiene las características que lo hacen aceptables para su uso en medicina, por ejemplo y sin limitarse al principio activo en un medicamento. Por lo tanto, por ejemplo y sin limitarse a, estas moléculas pueden ser sintetizadas por diferentes técnicas de química orgánica, o técnicas de biología molecular y
20 bioquímica. Los términos aquí utilizados se entienden como cualquier compuesto que es administrado a un paciente para el tratamiento de una afección y que puede llegar más eficientemente al tejido diana cuando está unido a la nanopartícula de la invención que cuando es administrado sin la nanopartícula de la invención. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el
25 mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

El agente terapéutico incluye, pero no está limitado, a compuestos hidrofílicos y hidrofóbicos. Según esto, los agentes terapéuticos contemplados en esta invención incluyen aunque no se limitan a moléculas tipo fármaco, ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, aptámeros y moléculas pequeñas.

- 30 Un agente terapéutico proteico incluye pero sin limitar a péptidos, enzimas, proteínas estructurales, receptores, y otras proteínas circulantes o celulares así como fragmentos y derivados de los mismos cuya expresión aberrante dan pie a uno o más afecciones médicas. Un agente terapéutico también incluye compuestos quimioterapéuticos y materiales radioactivos. La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de
35 una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo, tolerancia, etc. del mamífero. La "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de principio activo, o de sus

sales, pro-fármacos, derivados o análogos o de sus combinaciones, que produzcan el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dichos pro-fármacos, derivados o análogos y el efecto terapéutico a conseguir. Los “adyuvantes” y “vehículos farmacéuticamente aceptables” que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia.

El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción o distribución o acción de cualquiera de los principios activos de la presente invención, que estabiliza dicha sustancia activa o ayuda a la preparación del medicamento en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable.

Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes 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, capsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

El término excipiente “farmacéuticamente aceptable” hace referencia a que el excipiente este permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

Además, el excipiente debe ser farmacéuticamente adecuado, es decir, un excipiente que permita la actividad del principio activo o de los principios activos, es decir, que sea compatible con el principio activo, en este caso, el principio activo es cualquiera de los compuestos de la presente invención.

Un “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluye, pero sin limitarse, sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos.

El vehículo, al igual que el excipiente, es una sustancia que se emplea en el medicamento para diluir cualquiera de los compuestos de la presente invención hasta un volumen o peso determinado. El vehículo farmacéuticamente aceptable es una sustancia inerte o de acción análoga a los principios activos de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros compuestos, permitir una mayor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacéuticamente aceptable es el diluyente.

El término "molécula pequeña" se refiere a un compuesto químico, por ejemplo un peptidomimético que se puede derivatizar o cualquier otro compuesto orgánico de bajo peso molecular, natural o sintético. Dichas moléculas pequeñas pueden ser sustancias terapéuticamente transportadas o pueden ser derivatizadas para facilitar el transporte.

- 5 Se entiende por "peso molecular bajo" compuestos cuyo peso molecular es menor de 1000 Daltons, normalmente entre 300 y 700 Daltons.

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 desprenden en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

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

EJEMPLOS DE LA INVENCIÓN

- 15 Para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención se lleva a cabo un método para la solubilización en agua de las SPIONs obtenidas por descomposición térmica, que se basa en un intercambio de ligando con dos derivados alcoxi-silanos simultáneamente en una proporción determinada (60 % TEOS y 40 % APTES) y su posterior PEGilación mediante una reacción de amidación con un derivado de polietilenglicol (α -Methoxy- ω -carboxy PEG).

Ejemplo 1. Síntesis y Caracterización de las NPs: SPION-OA, SPION-TEOS/APTES y SPION-TEOS/APTES-PEG

La **Figura 1** muestra un esquema resumen de este procedimiento. El protocolo de fabricación concreto de estas *NPs SPION-TEOS/APTES-PEG* se describe en el apartado titulado **“MÉTODO DE LA INVENCION”**. En primer lugar, NPs SPION-OA de 10 nm hidrofóbicas, esféricas y monodispersas se sintetizaron mediante el método de descomposición térmica del oleato de Hierro [Park J. et al., 2004. Nat. Mater. 3, 891-895]. La **Figura 2A** muestra una imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) obtenida para una preparación de SPION-OA, donde se puede observar que presentan el tamaño, forma y homogeneidad deseada. Una vez purificadas, como se describe en esta invención, las NPs SPION-OA hidrofóbicas obtenidas se convirtieron en hidrofílicas por medio de un intercambio de ligando empleando dos derivados alcoxi-silano de manera simultanea (60 % de TEOS y 40 % de APTES). Este método desplaza los ligandos de ácido oleico de las SPION-OA y las recubre con una capa muy delgada de óxido de silicio, generando NPs SPION-TEOS/APTES hidrofílicas. Como puede observarse en la imagen TEM de las NPs obtenidas (**Figura 2B**) este proceso de intercambio de ligando **no produce cambios morfológicos aparentes, ni afecta al tamaño, ni a la monodispersidad de las partículas resultantes.**

Las NPs SPION-TEOS/APTES obtenidas son solubles en agua. Sin embargo, la progresiva protonación de los grupos amino en la superficie de estas NPs conlleva el establecimiento de enlaces de hidrógeno entre las partículas, provocando la formación progresiva de agregados. Aunque el uso de una disolución tamponadora de pH 6.0 puede ralentizar este fenómeno, su agregación es inevitable (**Figura 3A y 3B**). Para solventar este problema, se llevó a cabo la PEGilación parcial de las NPs SPION-TEOS/APTES. Para esto, se indujo la unión covalente de moléculas de α -metoxi- ω -carboxilato PEG (2 KDa) a los grupos amino de la superficie de estas partículas, mediante una reacción de amidación. Las SPIONs PEGiladas resultantes fueron fácilmente purificadas usando una simple diálisis. Imágenes de TEM de las NPs obtenidas (**Figura 2C**) demuestran que este proceso de PEGilación no produce cambios morfológicos, ni afecta al tamaño, ni a la monodispersidad de las partículas resultantes. Por otro lado, la estabilidad coloidal de las NPs SPION-TEOS/APTES-PEG aumentaba drásticamente en comparación con la de sus NPs precursoras (**Figura 3C y 3D**).

A continuación, se llevó a cabo una caracterización físico-química completa de las SPIONs PEGiladas y de sus precursoras (SPION-OA y SPION-TEOS/APTES). En primer lugar, para confirmar el recubrimiento con Sílica y la posterior PEGilación se emplearon las técnicas analíticas de espectroscopia infrarroja por transformada de fourier (FTIR) y análisis Termogravimétrico (TGA). El espectro de FTIR de las NPs precursoras hidrofóbicas (SPION-OA) mostraba las bandas características de vibración Fe-O del núcleo de magnetita (585 cm^{-1}),

de extensión C-H (2926 y 2852 cm^{-1}) y de vibración del carboxilato (1710 y 1459 cm^{-1}) procedentes de las moléculas de ácido oleico que recubren la SPION (**Figura 4A**). El espectro FTIR de las NPs SPION-TEOS/APTES resultantes del intercambio de ligando presentaba una banda nueva y ancha correspondiente a los enlaces Fe-O-Si (800 - 1200 cm^{-1}) y la característica de flexión N-H de las aminas primarias (1637 y 1540 cm^{-1}), confirmando que el intercambio de ligando con la mezcla de alcoxi-silanos mencionada se realizó con éxito (**Figura 4A**). El espectro de FTIR de las SPIONs PEGiladas presentaba un pico (~ 1650 cm^{-1}) que puede ser asignado a los grupos carbonilo del enlace amida formado con el PEG y las bandas típicas procedentes del polímero (entre 1718 y 837 cm^{-1}) unido covalentemente a la superficie de las NPs SPION-TEOS/APTES (**Figura 4A**). Por otro lado, la curva de TGA obtenida para las NPs obtenidas por descomposición térmica (SPION-OA) mostraba una pérdida de peso de 69.5 %, correspondiente a la considerable cantidad de ligandos de ácido oleico que recubren al núcleo de la partícula (**Figura 4B**). La curva de TGA obtenida para las NPs SPION-TEOS/APTES presenta una pérdida de peso de 30.9 %, mucho menor que el obtenido con SPION-OA, y habitual en partículas sometidas a procesos de intercambio de ligando con silanos [Cano M. et al., 2017. *Nanoscale* 9, 812-822; Cano M. et al., 2016. *RSC Advances* 6, 70374-70382] (**Figura 4B**). La curva de TGA obtenida para las SPIONs PEGiladas mostraba una pérdida de peso de 70.8 %, lo que significa que hay un incremento del 39.9 % generado por las moléculas de PEG unidas covalentemente a través de los aminos de las NPs SPION-TEOS/APTES precursoras (**Figura 4B**). Este valor es muy similar al obtenido en el caso de las NPs SPION-APTES-PEG [Cano M. et al. 2017, *Nanoscale* 9, 812-822], lo que indica que la reacción de PEGilación tuvo un rendimiento equivalente. Si consideramos que la masa teórica de una SPION de Fe_3O_4 de 10 nm diámetro es de $\sim 2.7 \cdot 10^{-18}$ g, y teniendo en cuenta la pérdida de peso generada por las moléculas del polímero estabilizante, se puede estimar que cada SPION está recubierta por unas 860 moléculas de PEG de 2KDa . Esto equivale a una densidad superficial de ~ 2.73 moléculas de PEG por nm^2 , que es según la bibliografía un valor apropiado para la estabilización de SPIONs en ambientes fisiológicos [Amstad E. et al., 2009. *Small* 5, 1334; Liu D. et al., 2011. *Adv. Funct. Mater.* 21, 1498-1504; Pernía M. et al., 2015. *Nanoscale* 7, 2050-2059; Cano M. et al., 2017. *Nanoscale* 9, 812-822].

Los resultados de FTIR y TGA para las NPs SPION-TEOS/APTES no sólo confirman que la reacción de intercambio de ligando usando 2 derivados alcoxi-silano simultáneamente (60 % TEOS y 40 % TEOS) se produce con éxito, sino que además nos indican que la capa de Sílica producida es ligeramente mayor que para las NPs SPION-APTES obtenidas usando un único alcoxi-silano (100 % APTES). Para conseguir un análisis cuantitativo más exacto de la estructura de la capa de sílica producida tanto en SPION-TEOS/APTES como en SPION-APTES NPs, se llevaron a cabo las medidas de Espectroscopía Fotelectrónica de rayos X (XPS). En la **Figura 4C** se muestran los espectros generales de XPS o Survey obtenidos para

NPs producidas por intercambio de ligando con 2 ligandos alcoxi-silano (SPION-TEOS/APTES) y con un único ligado (SPION-APTES). En ambos casos, se pueden observar los átomos característicos, tales como silicio (Si2s y Si2p) y nitrógeno (N1s), de la capa de silicio generada sobre la superficie de las SPIONs. Además, como la intensidad de la señal de Si2p es exponencialmente proporcional al espesor de la capa de silicio, el espesor medio (t) puede ser estimado usando la ecuación de Lambert-Beer, descrita en las siguientes publicaciones para capas muy delgadas [Kallury K.M.R. et al., 1995. Anal. Chem. 67, 3362-3370; Wong A.K.Y. et al., 2005. Anal. Bioanal. Chem. 383, 187-200; XPS Applications in Thin Films Research. Geng S. et al., 2002. Materials Technology 17(4)]:

$$I = I_0 [\exp(-t/l \sin\theta)]$$

Donde I es la intensidad de señal Si2p (eV) obtenida para el soporte sólido con capa de silano, I_0 es la intensidad de señal Si2p (eV) obtenida para el soporte sólido sin capa de silano, l es la profundidad de escape de los electrones Si2p a través de la capa de Silano (tomada como 20 Armstrong en este trabajo) y θ el ángulo de escape al cual los electrones son expulsados de la superficie. El valor de espesor obtenido a partir de esta ecuación para las superficies de NPs SPION-TEOS/APTES y de SPION-APTES fueron 1.15 y 0.52 nm, respectivamente. Estos resultados confirman que usando la combinación TEOS/APTES propuesta en este trabajo se obtiene una capa de silano más gruesa que cuando se emplea sólo APTES. Por otro lado, la intensidad de señal N1s no decrece para la superficie de SPION-TEOS/APTES, indicando que hay una cantidad similar de grupos aminos que con SPION-APTES.

Debido a que los grupos amino en superficie contribuyen a la carga superficial de las NPs resultantes, se midió el potencial-zeta de las partículas de SPION-TEOS/APTES PEGiladas a diferentes valores de pH (**Figura 4D**). Se puede observar que estas SPIONs presentan un comportamiento similar al que se observa para las SPION-APTES-PEG (es decir, su carga superficial va cambiando de positiva a negativa conforme se incrementa el pH) y muestran un punto isoeléctrico (IEP) de ~ 7.2 , el cual se considera ideal para NPs empleadas en aplicaciones biológicas [Cano M. et al., 2017. Nanoscale 9, 812-822].

Para completar la caracterización físico-química de las SPIONs PEGiladas y de sus precursores se analizaron también sus propiedades superparamagnéticas mediante la técnica de Magnetometría de muestra vibratoria (en inglés, vibrating sample magnetometry, VSM). La representación gráfica de los valores Magnetización (M) frente al campo magnético aplicado (H) a 300 °K mostraba la ausencia de coercitividad y remanencia en todas las muestras, confirmando su comportamiento superparamagnético (**Figura 5A**). Nuestros análisis revelaron que los valores de saturación de la magnetización de las NPs SPION-TEOS/APTES-PEG era de $21.31 \text{ emu}\cdot\text{g}^{-1}$, un valor ligeramente menor que los obtenidos para SPION-OA y SPION-

TEOS/APTES (18.78 y 28.68 $\text{emu}\cdot\text{g}^{-1}$). Estas variaciones eran debidas al diferente recubrimiento orgánico que presentaba cada uno de los núcleos de SPION analizados. En cualquier caso, el valor de magnetización de las NPs SPION-TEOS/APTES-PEG fue similar al que se obtuvo con las NPs SPION-APTES-PEG, y por lo tanto apropiado también para su uso en separación e imagen por resonancia magnética [Na H.B. et al., 2009. Adv. Mater. 21, 2133-2148].

Ejemplo 2. Estudios de citotoxicidad

La biocompatibilidad celular supone un factor importante a considerar en el desarrollo de las NPs de uso biomédico por lo que analizamos la citotoxicidad de nuestras NPs SPION-TEOS/APTES-PEG. Para ello usamos la línea celular humana HepG2 de carcinoma hepático, la cual constituye un modelo adecuado para los ensayos de citotoxicidad en estudios farmacéuticos. Además, estas células representan un buen ejemplo de diana susceptible de sufrir efectos secundarios in vivo puesto que la mayoría de las NPs son secuestradas de forma masiva por el hígado al administrarse por vía intravenosa [Blanco E. et al., 2015. Nature Biotech. 33, 941-951].

Cuantificamos la citotoxicidad mediante la proliferación celular basándonos en la integridad de la membrana (la cual usamos como marcador de muerte celular) de las células HepG2 expuestas a concentraciones crecientes de NPs SPION-TEOS/APTES-PEG durante 24 y 48 horas. Para ello, usamos dos marcadores fluorescentes con diferente permeabilidad plasmática, Hoechst 33342 para teñir los núcleos de las células totales (tinción azul en la **Figura 6A**) y yoduro de propidio para teñir las células muertas (tinción amarilla en la **Figura 6A**), el cual sólo puede penetrar en el interior de las células cuando la integridad de su membrana está comprometida) [Jan E. et al., 2008. ACS Nano 2, 928-938]. La exposición de las células a concentraciones de NPs SPION-TEOS/APTES-PEG por debajo de $100\ \mu\text{g Fe}\cdot\text{mL}^{-1}$ no tuvo efecto en la proliferación en comparación con las muestras control, y sólo cuando el tratamiento de estas NPs alcanzó los $200\ \mu\text{g Fe}\cdot\text{mL}^{-1}$ se apreció un efecto negativo en la proliferación celular, lo cual fue particularmente evidente tras 48 horas (**Figura 6B**). En consonancia con lo anterior, sólo en esta última concentración se observaron células muertas por encima de los valores del grupo control (**Figura 6C**), aunque éstas sólo supusieron un 23.9 % de las células totales. En el resto de las concentraciones de tratamiento el porcentaje de células muertas fue muy similar al de las células control (**Figura 6D**). Como ya se comprobó previamente con las NPs SPION-APTES-PEG [Cano M. et al. 2017, Nanoscale 9, 812-822], estos resultados demostraron que las NPs SPION-TEOS/APTES-PEG tampoco eran citotóxicas incluso a concentraciones de hierro de $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, lo cual corrobora su potencial uso en aplicaciones biomédicas [Singh N. et al., 2010. Nano Reviews 1, 1-15]

Ejemplo 3. Estudios de MRI (in vitro e in vivo)

5 Evaluamos el potencial de las NPs SPION-TEOS/APTES-PEG como agentes de contraste para MRI. Para ello analizamos los tiempos de relajatividad longitudinal (T1) y transversal (T2) a campo magnético bajo (1.5 T) y alto (9.4 T), usando un relaxómetro y un escáner MRI preclínico respectivamente (**Tabla 1**).

Tabla 1. Propiedades de relajatividad de las NPs SPION-TEOS/APTES-PEG a campo bajo (1.5 T) y alto (9.4 T).

Field	Relajación Longitudinal		Relajación Transversal		r_2/r_1
	T_1 (ms)*	r_1 [mM ⁻¹ s ⁻¹]	T_2 (ms)*	r_2 [mM ⁻¹ s ⁻¹]	
1.5 T	640 ± 8.7	4.76 ± 0.08	12.90 ± 0.09	156.3 ± 2.8	32.8
9.4 T	1724 ± 11.2	0.28 ± 0.06	11.37 ± 0.12	110.7 ± 3.1	395.3

10 *Los tiempos de relajación longitudinal (T1) y transversal (T2) se midieron a 0.5 mM Fe (medido por ICP-AES).

El promedio de la relajatividad transversal (r_2) de nuestras SPIONs PEGiladas fue 156.3 mM⁻¹s⁻¹ a 1.5 T y 110.7 mM⁻¹s⁻¹ a 9.4 T. Además, la medida de la relajatividad longitudinal (r_1) de las mismas fue 4.76 mM⁻¹s⁻¹ a 1.5 T y 0.28 mM⁻¹s⁻¹ a 9.4 T, dando unos ratios r_2/r_1 de 32.8 y 395.3 a dichos campos magnéticos respectivamente. Estos valores altos indicaron que las NPs SPION-TEOS/APTES-PEG ofrecían un buen contraste T2 para MRI tanto en condiciones preclínicas (alto campo magnético) como para condiciones clínicas (bajo campo magnético) [Pernía M. et al., 2015. Nanoscale 7, 2050-2059; Cano M. et al., 2016. RSC Advances 6, 70374-70382; Weissleider R. et al., 2010. People's Medical Publishing House – USA Global Medical Publisher 1-1357]. Para verificar esto llevamos a cabo un phantom de MRI a campo alto usando diferentes concentraciones de NPs SPION-TEOS/APTES-PEG y SPION-APTES-PEG disueltas en agua (**Figura 5B**). Éste confirmó que el contraste negativo (T2) ya era evidente en las concentraciones de NPs más bajas comparándolo con el control (agua) y que este contraste era muy elevado en las concentraciones crecientes (imagen T2W en **Figura 5B**). También se observó que el contraste T2 obtenido para las NPs SPION-TEOS/APTES-PEG era mayor que el mismo obtenido con las SPION-APTES-PEG para una misma concentración de hierro, lo cual concuerda con sus valores r_2/r_1 a campo alto (**Tabla 1**). Por otro lado, como era de esperar, nuestras NPs no mostraron ningún contraste positivo (T1) comparando con el agua control (imagen T1W en **Figura 5B**).

30 Inyectamos NPs SPION-TEOS/APTES-PEG por vía intravenosa en ratones BALB/c. De forma general, cualquier NP administrada sistémicamente en animales se queda retenida en el hígado y en el bazo en gran proporción [Blanco E. et al., 2015. Nature Biotech. 33, 941-951;

Kettiger H. et al., 2013. *Int. J. Nanomedicine* 8, 3255-3269; Albanese A. et al., 2012. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 14, 1-16]. Por tanto, teniendo en consideración esta observación, determinamos si nuestras SPIONs PEGiladas ofrecían un contraste negativo T2 in vivo. Este experimento demostró que dichos órganos se oscurecían en gran medida tras la inyección de las NPs (Figura 7 G-L). Comparando el decaimiento de la señal T2 en el hígado tras la administración de las NPs SPION-TEOS/APTES-PEG (Figura 7 G-L) y SPION-APTES-PEG (Figura 7 A-F), las primeras NPs oscurecieron el hígado con mucha más intensidad. La cuantificación de los cambios en T2 confirmaron que el hígado experimentó un decaimiento de la señal mucho más exacerbado incluso tras una hora post-administración (Figura 7N) ratificando que el híbrido silanizado tiene un contraste T2-MRI mucho mejor, por lo que potencialmente es mejor agente de contraste in vivo.

En cuanto a la distribución renal, en publicaciones anteriores se ha demostrado que las NPs son retenidas en los corpúsculos renales en función de su tamaño, siendo éstos localizados en la corteza renal [Choi C.H.C. et al., 2011. *PNAS* 108, 6556-6661; Pernía M. et al., 2015. *Nanoscale* 7, 2050-2059] pero no existe acumulación glomerular para NPs PEGiladas menores de 25 nm. Teniendo esto en cuenta, las NPs SPION-TEOS/APTES-PEG, las cuales tienen un tamaño hidrodinámico en torno a 25 nm en suero fetal bovino (medio muy similar al de la sangre), se pueden encontrar tanto en los capilares peritubulares, que anatómicamente están tanto en la médula como en la corteza renal, y probablemente también ligeramente retenidos en el glomérulo, que se encuentra sólo en la corteza renal. Por lo tanto, sólo el decaimiento de la señal observado en la médula renal sería enteramente debido a las NPs circulantes en sangre que acortan la señal T2 cuando pasan por los capilares peritubulares y retornan al sistema circulatorio. En otras palabras, el decaimiento de la señal observada en la médula renal se podría utilizar como indicador de la presencia de nuestras NPs en circulación. Por esta razón, durante la cuantificación de la T2 que se llevó a cabo en estos experimentos, se seleccionaron unas ROIs (del inglés Regions of interest) en el riñón que diferenciaban la corteza de la médula renal. De esta manera excluíamos una probable acumulación de nuestras NPs en los glomérulos (corteza renal). También excluimos la pelvis renal, cuyo decaimiento de T2 correspondía a las NPs excretadas en la orina, ya que esta es la zona donde el riñón concentra la orina antes de ser acumulada en la vejiga a través de los uréteres (Figura 8 C).

Siguiendo esta propuesta, las NPs SPION-TEOS/APTES-PEG se encontraban en circulación incluso a las 4 horas de su administración intravenosa (Figura 7 G-L, N y 8 B). El contraste T2 en la médula renal no se recuperó hasta sus valores normales ni a las 48 horas post-inyección, la cual fue la última medida realizada, indicando que, a ese momento, las NPs estaban todavía en circulación. En comparación con las medidas del ratio T2 en la médula renal tras la administración de las NPs SPION-APTES-PEG no mostraron un decaimiento de la T2

significativo, lo cual indica que su tiempo en circulación era más limitado (**Figura 7M**). Esto se confirmó en las correspondientes imágenes T2 (**Figura 7 A-F y 8 A**).

En conclusión, todos estos resultados comparativos sugieren que el híbrido silanizado mejora no sólo el contraste T2 in vivo para MRI sino también el tiempo en circulación, lo cual es clave para permitir el acceso de las NPs al tumor una vez administradas por vía intravenosa.

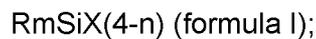
Ejemplo 4. Facilidad de funcionalización posterior para su adaptación a aplicaciones específicas.

Finalmente, evaluamos que las SPION PEGiladas generadas por este método (SPION-TEOS/APTES-PEG), además de las mejoras anteriormente citadas con respecto a las NPs SPION-APTES-PEG [M. Cano et al., 2017. *Nanoscale* 9, 812-822], seguían manteniendo la capacidad de ser fácilmente funcionalizadas a través de los grupos aminos todavía disponibles en su superficie. Para ello, se llevó a cabo funcionalización de nuestras NPs SPION-TEOS/APTES-PEG con un marcador fluorescente comercial (Cy5-NHS) activado con un grupo N-hidroxisuccinimida (**Figura 9B**). Una vez purificadas las NPs SPION-TEOS/APTES-PEG-Cy5, el test de Ninhidrina mostró una clara reducción de la cantidad de grupos aminos libres en comparación con su NP precursora (línea rosa en **Figura 9A**). Además, estos análisis también revelaron la aparición de un nuevo pico de absorción a ~650 nm que corresponde a la longitud de onda de máxima absorción del Cy5. Para confirmar la unión eficiente del fluoróforo a las NPs SPION-TEOS/APTES-PEG se compararon los espectros de absorción del Cy5 libre (línea verde) y de las NPs PEGiladas antes (línea roja) y después de la funcionalización (línea rosa en **Figura 9C**). De acuerdo con esto, la imagen de phantom de Fluorescencia ($\lambda_{ex} = 600$ nm y $\lambda_{em} = 700$ nm) mostró que sólo las NPs SPION-TEOS/APTES-PEG-Cy5 presentan emisión (**Figura 9D**). Estos resultados demuestran que las NPs PEGiladas obtenidas con nuestro método (usando TEOS y APTES simultáneamente) pueden ser fácilmente funcionalizadas, lo que permite la posibilidad de añadir propiedades de interés clínico a éstas, y, en este ejemplo concreto, como agente de imagen multimodal (MRI/Óptica).

REIVINDICACIONES

1.- Una nanopartícula que comprende:

- un núcleo hidrofóbico, preferiblemente de óxido de hierro; y
- una superficie funcionalizada con al menos dos derivados alcoxi-silanos diferentes de formula I:



donde R es un grupo químico seleccionado de la lista que consiste en un grupo alquilo, alquenos, alquinos, aromáticos, alcóxidos, organofuncionales o cualquier combinación de los mismos;

10 donde m puede ser 0, 1, 2 ó 3;

donde n representa un número natural entre 0 y 3; y

donde X representa un grupo alcoxido, preferiblemente un metoxi- o un etoxi-.

15 2.- La nanopartícula según la reivindicación anterior, donde la nanopartícula se funcionaliza con los derivados alcoxi-silanos mediante un procedimiento de intercambio de ligando.

3.- La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la nanopartícula es un SPION.

20 4.- La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde los derivados alcoxi-silanos se seleccionan de la lista que consiste en: Tetraetilortosilicato (TEOS), 3-aminopropil-trietoxisilano (APTES), 3-aminopropil-trimetoxisilano (APTMS), 3-mercaptopropil trietoxisilano (MPTES), 3-mercaptopropil trimetoxisilano (MPTMS), 3-Glicidoxipropil trietoxisilano, 3-Glicidoxipropil trimetoxisilano, 3-Cianatopropil trietoxisilano (CPTES), 3-Cianatopropil trimetoxisilano (CPTMS), 3-Azidatopropil trietoxisilano, 3-Azidatopropil trimetoxisilano, trimetoxi PEG silanos y α -silano- ω -metoxi polietilenglicol, o cualquiera de sus sales, isómeros, derivados o análogos, o cualquiera de sus combinaciones.

5.- La nanopartícula según la reivindicación 4, donde la nanopartícula comprende dos derivados alcoxi-silanos que se seleccionan de entre la lista que consiste en:

30 a) Tetraetilortosilicato (TEOS) y 3-AminoPropil-TriEtoxiSilano (APTES), o

b) Tetraetilortosilicato (TEOS) y 3-mercaptopropil trimetoxisilano, o

c) Tetraetilortosilicato (TEOS) y α -silano- ω -metoxi polietilenglicol.

5 6.- La nanopartícula según la reivindicación 5, donde la nanopartícula comprende dos derivados alcoxi-silanos que son tetraetilortosilicato (TEOS) y 3-aminopropil-trietoxisilano (APTES).

10 7.- La nanopartícula según la reivindicación 6, donde la concentración de TEOS se encuentra en un rango de concentración, sobre el total de los alcoxi-silanos, de entre 40 y 80% y APTES, sobre el total de los alcoxi-silanos, en un rango de concentración de entre 20 y 60%.

8.- La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde las nanopartículas están PEGiladas.

15 9.- La nanopartícula según la reivindicación 8, donde las nanopartículas están PEGiladas con el derivado de polietilenglicol α -Methoxy- ω -carboxy PEG.

10.- Una composición que comprende la nanopartícula tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

20

11.- La composición según la reivindicación anterior, donde la composición es una composición farmacéutica.

25 12.- La composición según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, donde la composición además comprende al menos un compuesto o molécula biológicamente activa, un agente terapéutico o fármaco, o un agente marcador.

13.- La composición según la reivindicación anterior, donde el agente marcador es un agente de contraste.

14.- Uso de la nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en la elaboración de un medicamento.

5 15.- Uso de la nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en la elaboración de una composición farmacéutica para el diagnóstico *in vivo* por resonancia magnética.

16.- Un método para la síntesis de una nanopartículas que comprende

- 10 1. Síntesis de nanopartículas hidrofóbicas, preferiblemente SPIONs hidrofóbicas sintetizadas por descomposición térmica;
2. Funcionalización con dos derivados alcoxi-silanos de formula I, tal y como se ha definido esta fórmula en la reivindicación 1, de las nanopartículas del paso 1), a través de un procedimiento de intercambio de ligando ejecutado simultáneamente;
- 15 3. Opcionalmente, se lleva a cabo una PEGilación de las nanopartículas obtenidas en el paso 2); y opcionalmente
4. Se lleva a cabo una funcionalización de las nanopartículas del paso 3) o del paso 2).

17. El método según la reivindicación 16, donde las nanopartículas hidrofóbicas del paso 1) son SPIONs hidrofóbicas sintetizadas por descomposición térmica y donde el procedimiento de intercambio de ligando se lleva a cabo con dos derivados de alcoxisilanos de formula I seleccionados de la lista que consiste en Tetraetilortosilicato (TEOS), 3-aminopropil-trietoxisilano (APTES), 3-aminopropil-trimetoxisilano (APTMS), 3-mercaptopropil trietoxisilano (MPTES), 3-mercaptopropil trimetoxisilano (MPTMS), 3-Glicidoxipropil trietoxisilano, 3-Glicidoxipropil trimetoxisilano, 3-Cianatopropil trietoxisilano (CPTES), 3-Cianatropropil trimetoxisilano (CPTMS), 3-Azidatopropil trietoxisilano, 3-Azidatopropil trimetoxisilano, trimetoxi PEG silanos y α -silano- ω -metoxi polietilenglicol, o cualquiera de sus sales, isómeros, derivados o análogos, o cualquiera de sus combinaciones.

20

25

18. El método según la reivindicación anterior, donde el procedimiento de intercambio de ligando se lleva a cabo con dos derivados de alcoxisilanos de formula I seleccionados de la lista que consiste en APTES y TEOS.

30

19. El método según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, donde se lleva a cabo una PEGilación de las nanopartículas obtenidas en el paso 2), preferiblemente con el derivado de polietilenglicol α -Methoxy- ω -carboxy PEG

FIGURAS

Figura 1

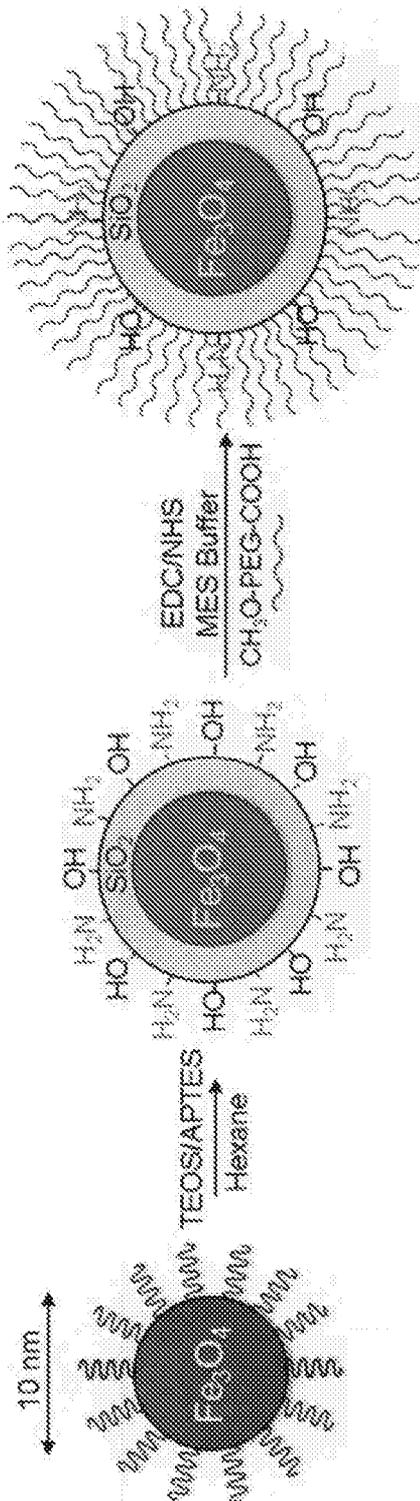


Figura 2

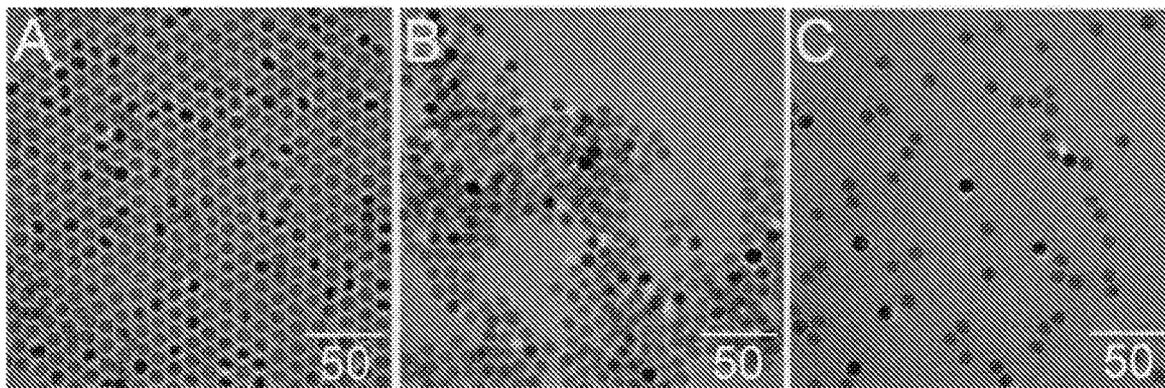


Figura 3

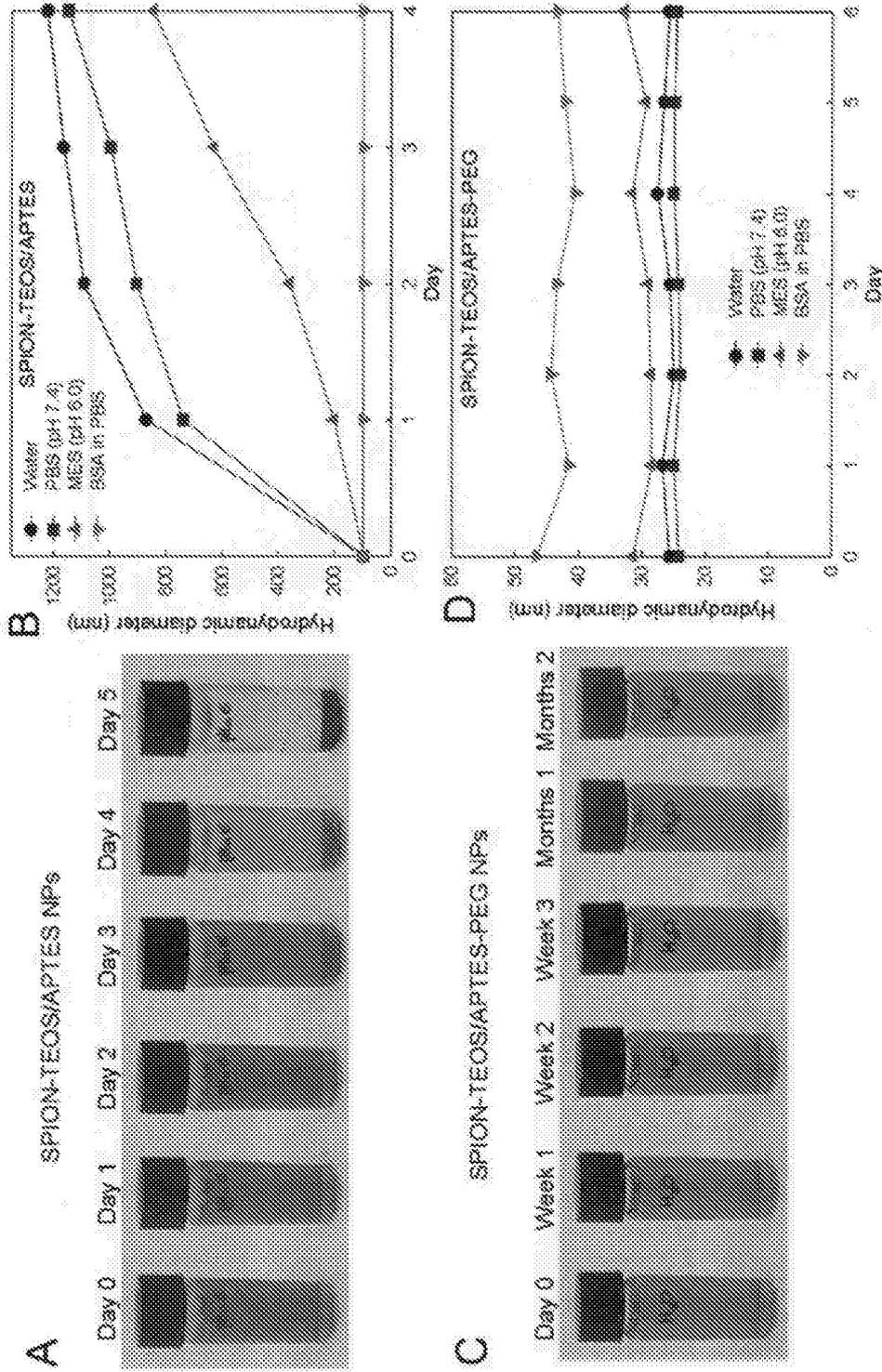


Figura 4

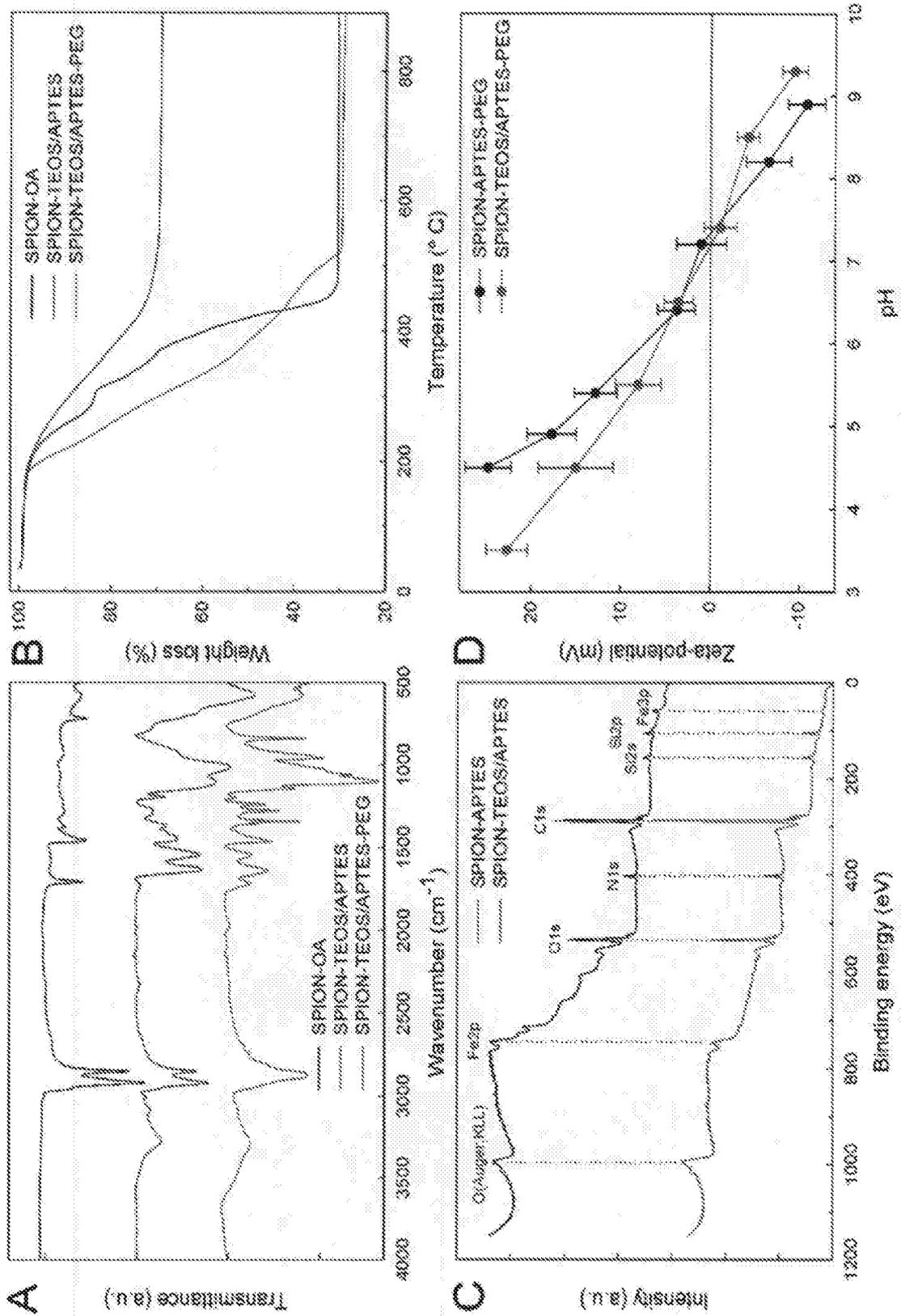


Figura 5

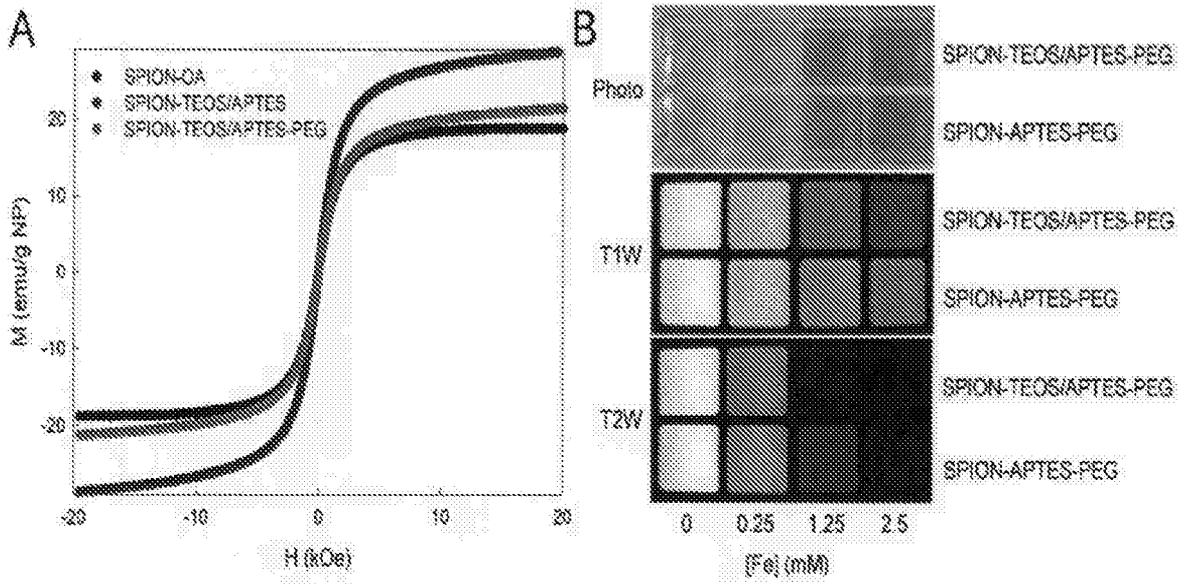


Figura 6

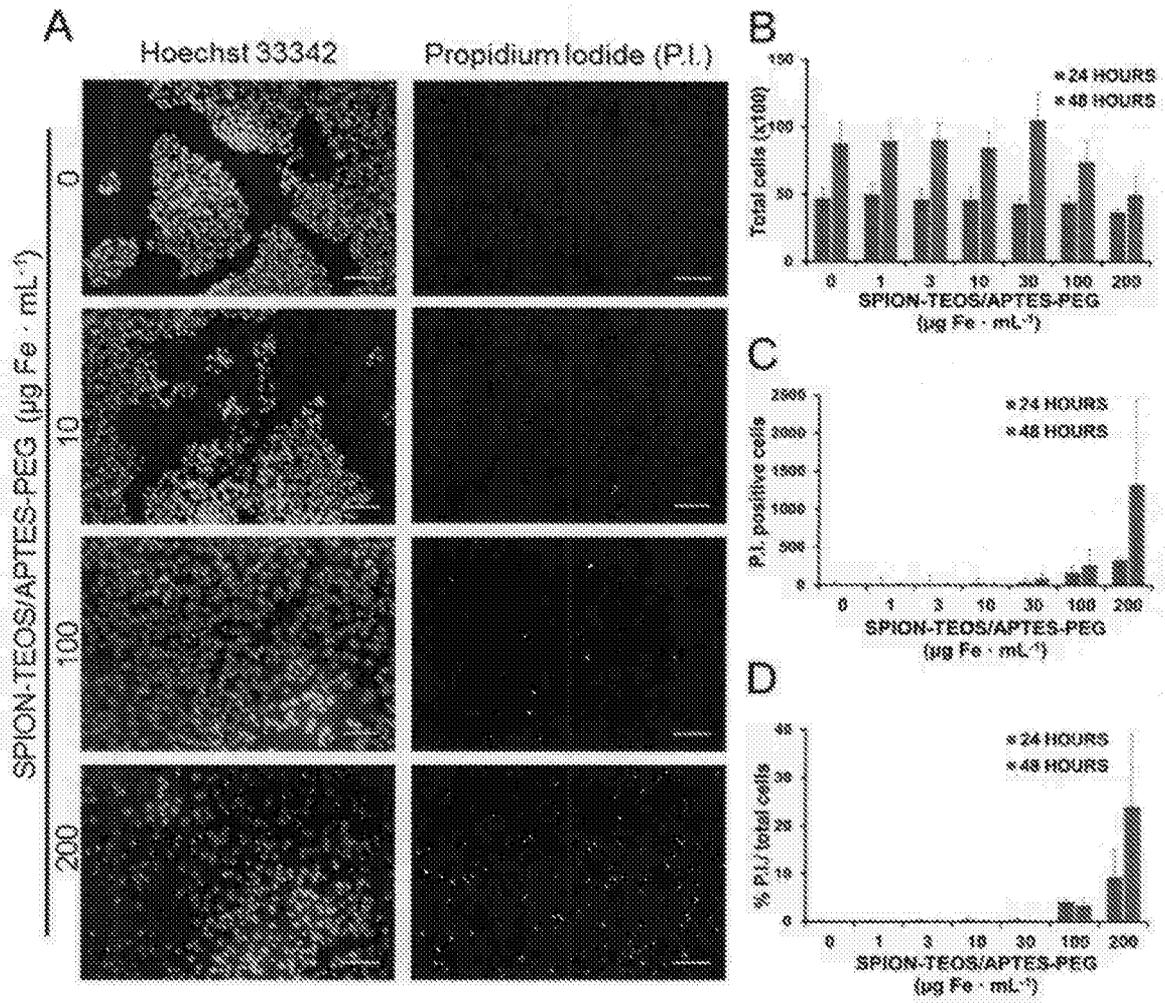


Figura 7

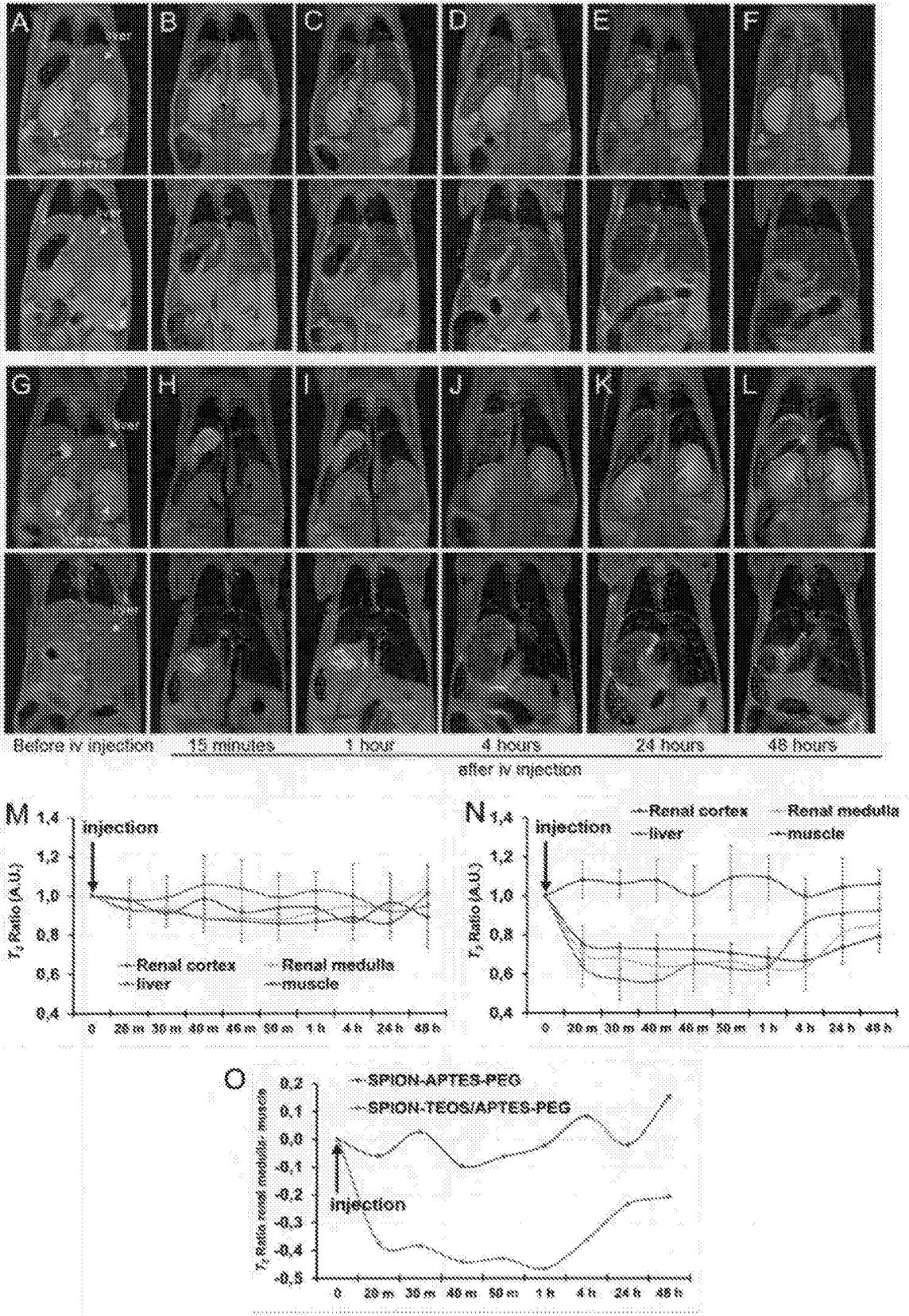


Figura 8

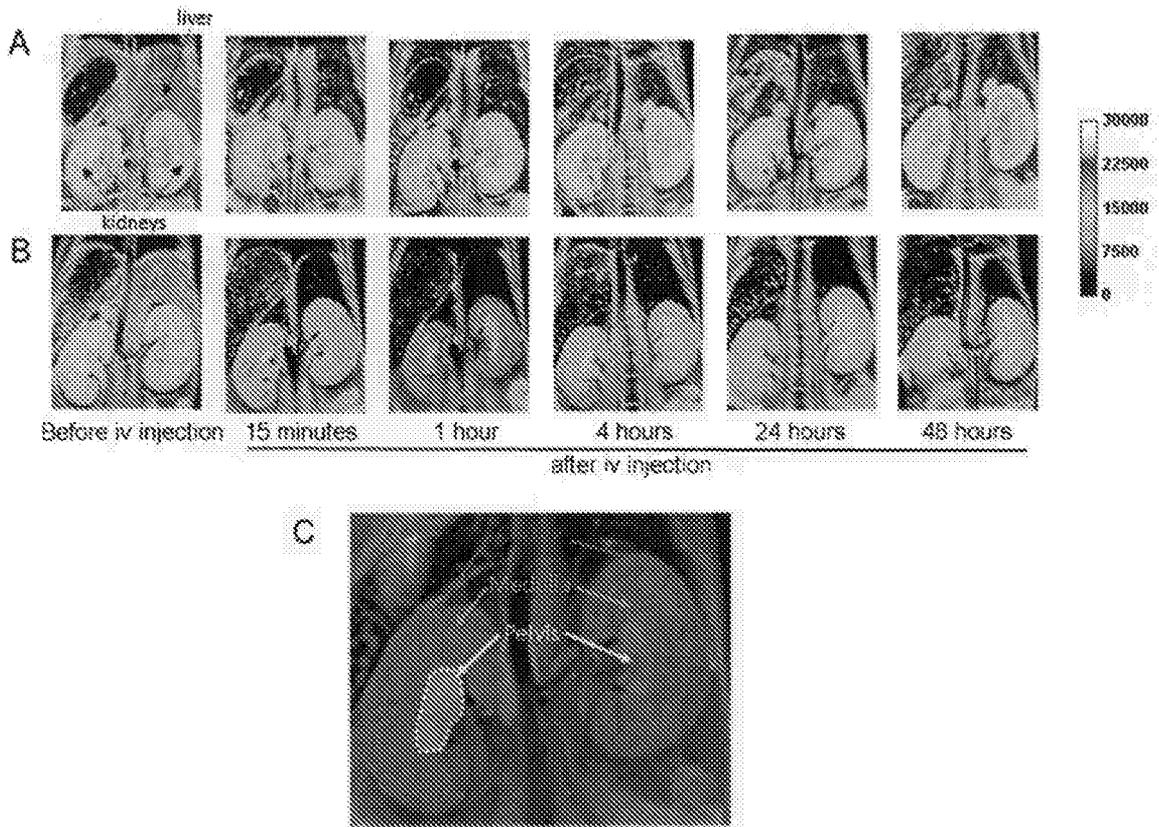


Figura 9

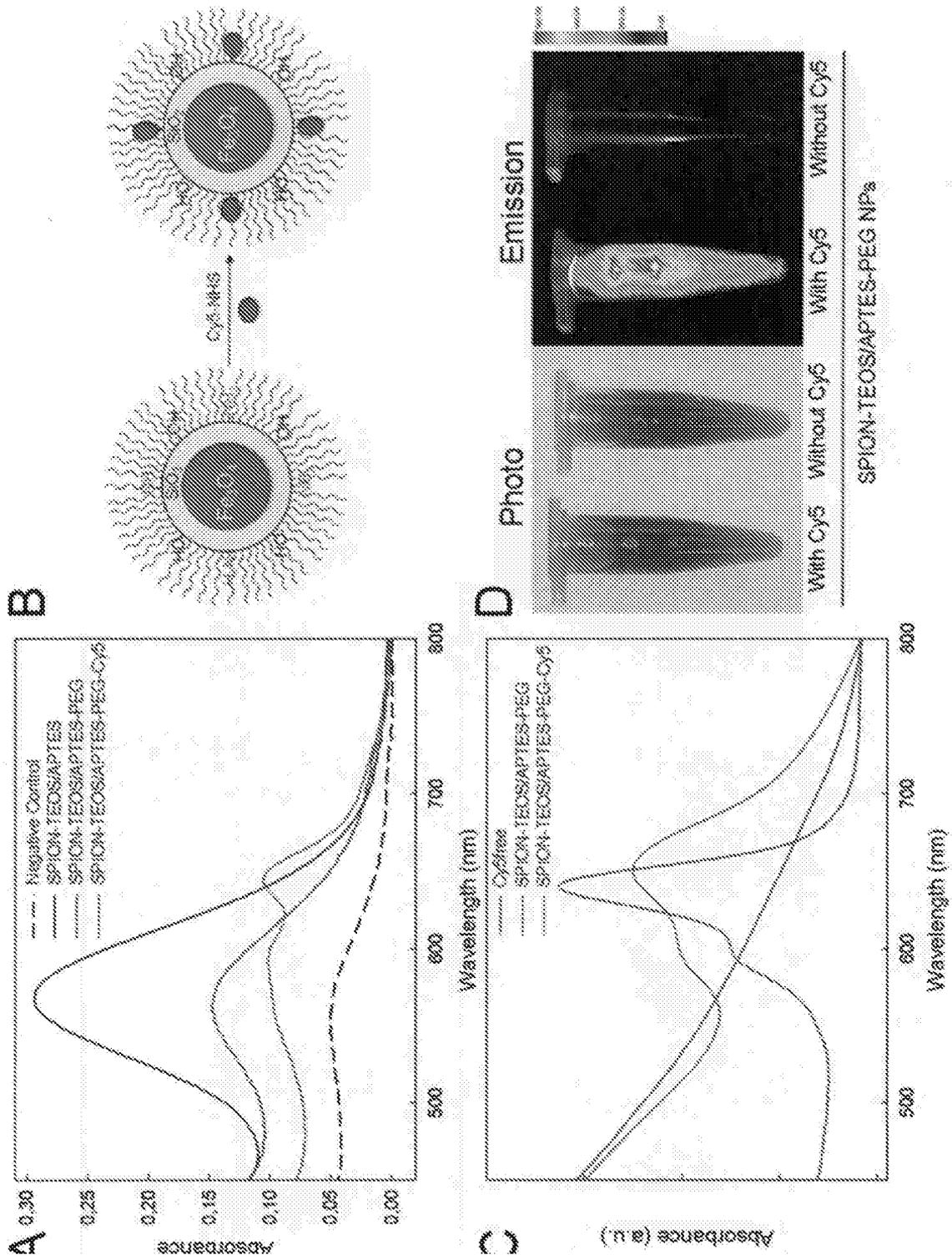
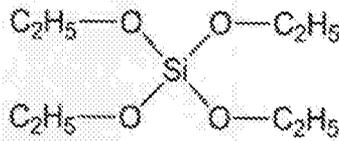
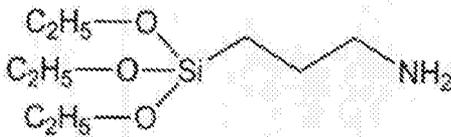


Figura 10

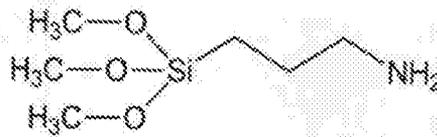
ALGUNOS DERIVADOS ALCOXI-SILANOS



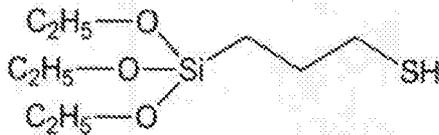
Tetraetilortosilicato (TEOS)



3-aminopropil trietoxisilano (APTES)



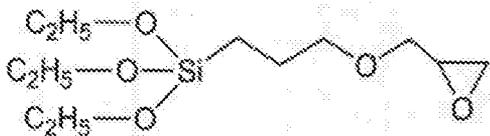
3-aminopropil trimetoxisilano (APTMS)



3-Mercaptopropil trietoxisilano (MPTES)



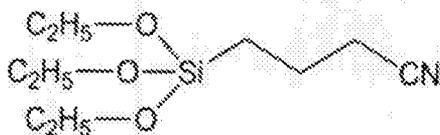
3-Mercaptopropil trimetoxisilano (MPTMS)



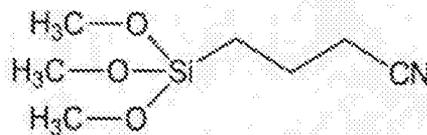
3-Glicidoxipropil trimetoxisilano



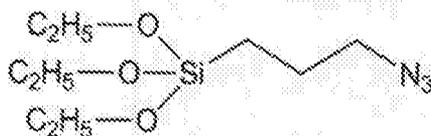
3-Glicidoxipropil trimetoxisilano



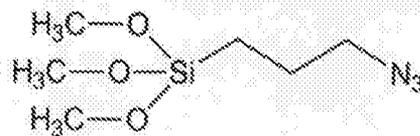
3-Cianatopropil trietoxisilano (CPTES)



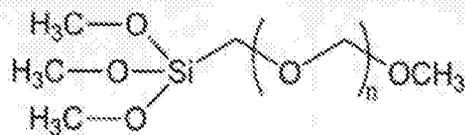
3-Cianatopropil trimetoxisilano (CPTMS)



3-Azidatopropil trietoxisilano



3-Azidatopropil trimetoxisilano



Trimetoxi PEG silanos

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2018/070130

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K49/18 (2006.01)

B82Y5/00 (2011.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, B82Y

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DIGIGOW REINALDO G. <i>et al.</i> ; Preparation and characterization of functional silica hybrid magnetic nanoparticles; Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 20140801 Physics - Magnetism Physics - Solid State Physics. 01/08/2014, Vol. 362, Pages 72 - 79, ISSN 0304-8853, <DOI: doi:10.1016/j.jmmm.2014.03.026>	1-19
X	US 2010008862 A1 (FU AIHUA <i>et al.</i>) 14/01/2010, paragraphs [0054], [0055], [0061], [0062], [0073], [0074], [0082], [0083], [0091], [0095], [0105]; example 2, paragraph [0152]; claims 3, 6, 17.	1-5, 8-19

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search
17/05/2018

Date of mailing of the international search report
(25/05/2018)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
N. Vera Gutierrez

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3495544

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2018/070130

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CANO MANUEL <i>et al.</i> ; Synthesis and characterization of multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION)/C60 nanocomposites assembles by fullerene-amine click chemistry; Royal Society of Chemistry Advances, 2016, 6 (74), 70374-70382, ISSN 2046-2069.	1-6, 8-19
X	US 2010111859 A1 (AXELSSON OSKAR <i>et al.</i>) 06/05/2010, paragraphs [0001], [0038], [0042], [0075]-[0078], [0117], example 2, paragraphs [0148]-[0161].	1, 2, 4-6, 8-19
X	CANO MANUEL <i>et al.</i> ; Self-assembly of a superparamagnetic raspberry-like silica/iron oxide nanocomposite using epoxy-amine coupling chemistry; Chemical communications (Cambridge, England) England 28 Feb 2015. 28/02/2015, Vol. 51, N° 17, Pages 3620 - 3622, ISSN 1364-548X (Electronic), <DOI: doi:10.1039/c4cc09311a pubmed:25635377>	1-3, 8-15
A	CANO MANUEL <i>et al.</i> ; Partial PEGylation of superparamagnetic iron oxide nanoparticles thinly coated with amine-silane as a source of ultrastable tunable nanosystems for biomedical applications; Nanoscale, 2017, 9 (2), 812-822; ISSN: 2040-3372.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2018/070130

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US2010008862 A1	14.01.2010	US2016279270 A1 US2014227190 A1 US9402926 B2 US8722017 B2	29.09.2016 14.08.2014 02.08.2016 13.05.2014

US2010111859 A1	06.05.2010	ZA200905420 B JP2010518070 A US2010119458 A1 CN101663050 A CA2675631 A1 AU2008212556 A1 EP2121041 A1 EP2121040 A1 WO2008096280 A1 WO2008096279 A1	27.10.2010 27.05.2010 13.05.2010 03.03.2010 14.08.2008 14.08.2008 25.11.2009 25.11.2009 14.08.2008 14.08.2008

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2018/070130

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K49/18 (2006.01)

B82Y5/00 (2011.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

A61K, B82Y

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

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

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	DIGIGOW, REINALDO G. <i>et al.</i> ; Preparation and characterization of functional silica hybrid magnetic nanoparticles; Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 20140801 Physics - Magnetism Physics - Solid State Physics. 01/08/2014, Vol. 362, Páginas 72 - 79, ISSN 0304-8853, <DOI: doi:10.1016/j.jmmm.2014.03.026>	1-19
X	US 2010008862 A1 (FU AIHUA <i>et al.</i>) 14/01/2010, párrafos [0054], [0055], [0061], [0062], [0073], [0074], [0082], [0083], [0091], [0095], [0105]; ejemplo 2, párrafo [0152]; reivindicaciones 3, 6, 17.	1-5, 8-19

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
17/05/2018

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
25 de mayo de 2018 (25/05/2018)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)

Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado

N. Vera Gutierrez

Nº de teléfono 91 3495544

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2018/070130

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	CANO MANUEL <i>et al.</i> ; Synthesis and characterization of multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION)/C60 nanocomposites assembled by fullerene-amine click chemistry; Royal Society of Chemistry Advances, 2016, 6 (74), 70374-70382, ISSN 2046-2069.	1-6, 8-19
X	US 2010111859 A1 (AXELSSON OSKAR <i>et al.</i>) 06/05/2010, párrafos [0001], [0038], [0042], [0075]-[0078], [0117], ejemplo 2, párrafos [0148]-[0161].	1, 2, 4-6, 8-19
X	CANO MANUEL <i>et al.</i> ; Self-assembly of a superparamagnetic raspberry-like silica/iron oxide nanocomposite using epoxy-amine coupling chemistry; Chemical communications (Cambridge, England) England 28 Feb 2015. 28/02/2015, Vol. 51, Nº 17, Páginas 3620 - 3622, ISSN 1364-548X (Electronic), <DOI: doi:10.1039/c4cc09311a pubmed:25635377>	1-3, 8-15
A	CANO MANUEL <i>et al.</i> ; Partial PEGylation of superparamagnetic iron oxide nanoparticles thinly coated with amine-silane as a source of ultrastable tunable nanosystems for biomedical applications; Nanoscale, 2017, 9 (2), 812-822; ISSN: 2040-3372.	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2018/070130

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US2010008862 A1	14.01.2010	US2016279270 A1 US2014227190 A1 US9402926 B2 US8722017 B2	29.09.2016 14.08.2014 02.08.2016 13.05.2014
-----	-----	-----	-----
US2010111859 A1	06.05.2010	ZA200905420 B JP2010518070 A US2010119458 A1 CN101663050 A CA2675631 A1 AU2008212556 A1 EP2121041 A1 EP2121040 A1 WO2008096280 A1 WO2008096279 A1	27.10.2010 27.05.2010 13.05.2010 03.03.2010 14.08.2008 14.08.2008 25.11.2009 25.11.2009 14.08.2008 14.08.2008
-----	-----	-----	-----