



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 367 959**

② Número de solicitud: 200931234

⑤ Int. Cl.:

**A61K 9/14** (2006.01)

**A61K 9/51** (2006.01)

**B82Y 5/00** (2011.01)

**B82Y 15/00** (2011.01)

**B82Y 25/00** (2011.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **22.12.2009**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **11.11.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud: **11.11.2011**

⑦ Solicitante/s: **CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN RED EN BIOINGENIERÍA, BIOMATERIALES Y NANOMEDICINA**  
**María de Luna, 11**  
**Edificio CEEI, Módulo 3**  
**50018 Zaragoza, ES**  
**Universidad Autónoma de Madrid**

⑦ Inventor/es: **Muñoz Noval, Álvaro;**  
**Torres Costa, Vicente;**  
**Gallach Pérez, Darío;**  
**Sánchez-Vaquero, Vanessa;**  
**Manso Silván, Miguel José;**  
**Martín Palma, Raúl José y**  
**García Ruiz, Josefa P.**

⑦ Agente: **Arias Sanz, Juan**

⑤ Título: **Partículas magnético-luminiscentes para aplicaciones biomédicas.**

⑤ Resumen:

Partículas magnético-luminiscentes para aplicaciones biomédicas.

La presente invención se refiere a un sistema de partículas magnético luminiscentes de tamaño inferior a 3 micras, de forma particular igual o inferior a 500 nm, que comprende una matriz de silicio poroso nanoestructurado, donde dicha matriz comprende en sus poros nanopartículas de material magnético y nanocristales de silicio, así como a un procedimiento para su preparación. Dichas partículas pueden ser funcionalizadas con grupos o moléculas que permiten la unión de bio-moléculas en su superficie, lo que les hace ser especialmente útiles en aplicaciones biomédicas.

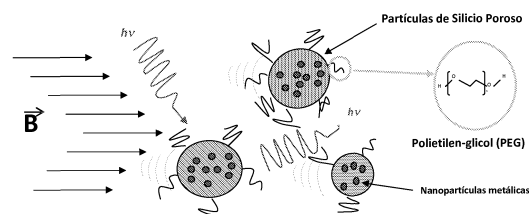


Figura 1

ES 2 367 959 A1

## DESCRIPCIÓN

Partículas magnético-luminiscentes para aplicaciones biomédicas.

### Campo de la invención

La presente invención se encuadra dentro del campo de los biosensores, más concretamente se refiere a sistemas híbridos nanoparticulados con propiedades magnéticas y luminiscentes para su aplicación en imagen, monitorización, liberación de fármacos y biodetección, así como a procedimientos para su obtención.

### Antecedentes

La aplicación de nanoestructuras basadas en semiconductores de tamaño y composición controlada está siendo progresivamente implementada en multitud de campos pertenecientes a la biotecnología [Wang, Y. *et al.*, Bioapplication of nanosemiconductors. *Mat. Today*, 2005, 8 (Suppl. 1), 20-31; Jianrong, C. *et al.*, Nanotechnology and biosensors, *Biotechnol. Adv.*, 2004, 22, 505-518], El control sistemático de dicha propiedades de las nanoestructuras contrasta con la naturaleza de las especies moleculares cuyas propiedades no varían sistemáticamente. Este control de las variaciones de las propiedades no sólo mejora las aplicaciones tradicionales, sino que abre las puertas a las nuevas aplicaciones más allá de los bioconjugados moleculares convencionales.

La disponibilidad de estas nuevas nanoestructuras facilita la creación de nuevos métodos de monitorización *in situ* y de diseño de sensores. Así, se han venido desarrollando partículas bio-magnéticas modificadas en su superficie para su aplicación en inmunosayos, ingeniería genética, separación celular, purificación de complejos, localización intracelular, destinos específicos de células etc... Estas partículas comprenden óxidos ferromagnéticos, superparamagnéticos o paramagnéticos de hierro, cobalto o níquel como núcleo metálico, recubiertas por un material que presenta grupos funcionales orgánicos a los cuales se unen de forma covalente moléculas con compatibilidad biológica contrastada.

Por otra parte, es también de sobra conocido en biotecnología y biología molecular las aplicaciones técnicas usando moléculas con fluorescencia. Existen numerosos materiales fluorescentes que son empleados para etiquetar células o moléculas, tales como sondas fluorescentes orgánicas, puntos cuánticos, etc. La incorporación de estos cromóforos en las partículas bio-magnéticas permite la creación de sistemas híbridos que presentan tanto propiedades magnéticas como fluorescentes, haciendo posible el desarrollo de nuevos sistemas híbridos para imagen, monitorización, liberación de fármacos y biodetección.

Así, en los últimos años se han desarrollado sistemas híbridos nanoparticulados magnético-luminiscentes en donde el material o matriz constitutiva de los mismos es óxido de silicio. Insin, N. *et al* [ACS *Nano*, 2008, 2(2), 197-202] describen la elaboración de microesferas de sílice con propiedades magnéticas y luminiscentes mediante la incorporación de nanopartículas magnéticas de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y puntos cuánticos de CdSe/CdZnS en una capa de sílice que se ubica como recubrimiento sobre microesferas de sílice preformadas. Existen otros documentos que describen la preparación de partículas cuyo núcleo está constituido por material magnético recubierto por una capa de sílice, que incorporan el elemento fluorescente bien en la capa de sílice o dopando el nú-

cleo magnético [WO2007/029980, WO2005/015213, WO2008/115854, WO03/089906],

Las nanoestructuras porosas ofrecen la ventaja adicional de poseer una muy alta superficie específica que revierte en una alta reactividad química, lo que facilita enormemente la conjugación con moléculas y biomoléculas. Así, se han diseñado nanopartículas a partir de una estructura de sílice mesoporosa en cuyos poros se insertan nanopartículas magnéticas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> y puntos cuánticos semiconductores (QDs), recubiertas con un polímero anfífilo capaz de mejorar su biocompatibilidad [Sathe, T.R. *et al.*, *Anal. Chem.*, 2006, 78, 5627-32], WO2009/078924 describe una estructura de dimensión menor a una micra, formada por un cuerpo de sílice poroso que incorpora nanopartículas de óxido de hierro y moléculas fluorescentes en el interior de los poros de la mencionada estructura. Sobre el cuerpo de sílice se encuentran unidas moléculas aniónicas que permiten la unión con bio-moléculas.

No obstante, uno de los principales inconvenientes que presentan estas estructuras se deriva de la presencia del elemento fluorescente. Aunque los puntos cuánticos presentan multitud de ventajas sobre los fluoróforos orgánicos, como pueden ser la selección de la longitud de onda de emisión, una amplia banda de absorción en el espectro, un espectro de emisión muy estrecho, así como altos niveles de intensidad luminiscente y fotoestabilidad, éstos suelen resultar en la mayoría de los casos tóxicos debido a que incluyen metales pesados tales como cadmio, zinc, cobalto y similares.

Por otra parte, debido al procedimiento de obtención basado en la mezcla física de soluciones que contiene los distintos componentes y posterior precipitación, no es fácil controlar la concentración final de metal ferromagnético infiltrado en la matriz, lo que limita en gran medida su aplicación posterior.

A la vista de los inconvenientes señalados, se hace necesario el desarrollo de sistemas híbridos nanoparticulados con propiedades magnéticas y luminiscentes que presenten una mayor biocompatibilidad y biodegradabilidad, y que permitan un control de la concentración de material magnético con el fin de poder variar las propiedades magnéticas en función de la aplicación particular que quiera dárseles.

### Breve descripción de la invención

Los autores de la presente invención han observado que partículas biofuncionales que comprenden una matriz de silicio poroso nanoestructurado como material soporte, permiten mejorar considerablemente la biocompatibilidad y biodegradabilidad de las mismas, dado que no necesitan incorporar trazadores luminiscentes adicionales, debido a que la propia matriz presenta luminiscencia intrínseca como consecuencia de la presencia de monocristales nanométricos de silicio dentro de la estructura del silicio amorfo que actúan como puntos cuánticos.

Además, la matriz de silicio poroso presenta una mayor afinidad química y una mayor superficie biocatalítica que la matriz de sílice, lo que facilita el recubrimiento con moléculas funcionales capaces de conjugarse con moléculas y biomoléculas. De hecho, las partículas funcionalizadas han sido cultivadas en presencia de células mesenquimáticas humanas hMSC, las cuales han internalizado dichas partículas y han demostrado su no toxicidad. Las células hMSC son productoras de factores inmunosupresores, facilitan

factores que estimulan la reparación endógena de los tejidos y la angiogénesis, por lo que son idóneas para la terapia celular y demás aplicaciones biomédicas. Los ensayos experimentales llevados a cabo han mostrado que la máxima luminiscencia en el rango óptico se mantiene durante varios días gracias a su capa funcionalizada y, lo que es más importante, que una vez esta luminiscencia inicial desaparece, las partículas siguen siendo luminiscentes debido a la formación de nuevos centros emisores, lo que las convierte en marcadores celulares muy útiles.

Por otra parte, el procedimiento utilizado para su obtención, basado en un proceso de galvanización y posterior electro infiltración, ha permitido la incorporación de forma controlada de nanopartículas magnéticas dentro de los poros de la matriz. Hasta el momento, sólo se habían podido obtener estructuras de silicio con canales o depósitos metálicos con tamaños del orden de 10 a 20 veces superior el de los poros de la matriz nanoestructurada, para su posterior aplicación en la fabricación de dispositivos de almacenamiento de memoria y sensores magnéticos.

El mencionado procedimiento permite además controlar el tamaño de los poros así como el de los monocristales de silicio (considerados también como puntos cuánticos cuando su tamaño es nanométrico), lo que se traduce en la posibilidad de seleccionar previamente la longitud de onda de las partículas luminiscentes, además de controlar la actividad química superficial. Se ha observado además, que la luminiscencia se mantiene incluso después de haber insertado en la estructura porosa las nanopartículas magnéticas auto-nucleadas. Adicionalmente, para aplicaciones biomédicas, las condiciones experimentales de fabricación pueden ser ajustadas de forma que el máximo de luminiscencia ocurra en el intervalo infrarrojo cercano de longitudes de onda donde los tejidos presentan una alta transparencia.

Así, en un primer aspecto la invención se dirige a un sistema de partículas magnético luminiscentes de tamaño inferior a 3 micras, que comprenden una matriz de silicio poroso nanoestructurado, donde dicha matriz comprende en sus poros nanopartículas de material magnético y monocristales nanométricos de silicio.

En un segundo aspecto, la invención se dirige a un procedimiento para la preparación de un sistema de nanopartículas como se ha mencionado previamente, que comprende:

- a) someter obleas de silicio a un proceso de galvanización en una disolución que comprende una mezcla de un ácido fuerte inorgánico y un alcohol, aplicando una densidad de corriente comprendida entre 10 mA/cm<sup>2</sup> y 150 mA/cm<sup>2</sup> para obtener obleas de silicio poroso;
- b) someter las obleas de silicio poroso a un proceso de electro infiltración del material magnético mediante un modo pulsado de corriente-equilibrio por inmersión de las obleas de silicio poroso en una disolución que comprende sales de metales que constituyen el material magnético y catalitos.
- c) convertir las obleas de silicio poroso infiltradas con material magnético en partículas de silicio poroso.

Asimismo, un aspecto adicional de la invención lo

constituye una composición farmacéutica que comprende partículas magnético luminiscentes como se ha definido anteriormente y una molécula biológicamente activa.

5 En un aspecto adicional la invención se refiere al uso de un sistema de partículas como se ha definido anteriormente para la preparación de un medicamento.

10 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un sistema de partículas como se ha definido anteriormente para la preparación de un medicamento para terapia génica.

15 En otro aspecto adicional, la invención se refiere al uso de un sistema de partículas como se ha definido anteriormente como marcadores celulares de tejidos y marcadores de migración o destino.

20 Un aspecto adicional lo constituye el uso de un sistema de partículas como se ha definido anteriormente como agentes de contraste en resonancia magnética nuclear.

25 En un último aspecto, la invención se relaciona con el uso de un sistema de partículas como se ha definido anteriormente para separación magnética asistida de productos químicos y bio-químicos.

#### Breve descripción de las figuras

30 Figura 1. Representación esquemática de las partículas de silicio poroso nanoestructurado magnético-luminiscentes (PSPml) tras la funcionalización con polietilenglicol. Las partículas de silicio poroso nanoestructurado (partículas con fondo rayado) alojan en su interior las nanopartículas ferromagnéticas infiltradas (partículas de fondo sólido). Inmediatamente tras su síntesis las partículas son cubiertas con una capa biofuncional de Polietilen-glicol.

35 Figura 2. (a) Morfología de las PSPmls inmediatamente tras la funcionalización con PEG, en la que se observan las partículas esféricas con una distribución de tamaños comprendida entre los 500 nm y las 3 micras. El espectro inserto muestra el correspondiente espectro EDX. (b) Imagen TEM de una partícula mostrando los depósitos metálicos (en este caso cobalto) en el interior de la estructura de silicio poroso.

40 Figura 3. Respuesta magnética en las partículas con hierro infiltrado sintetizadas por el método descrito en el ejemplo 2.

45 Figura 4. (a) Imágenes del microscopio de fluorescencia de las partículas funcionalizadas con PEG a las 24 h de su síntesis. Las imágenes se obtuvieron por excitación con lámpara ultravioleta y se utilizó un filtro DAPI. (b) Evolución temporal de la luminiscencia de las partículas infiltradas con Cobalto y funcionalizadas con PEG, excitadas a 420 nm.

50 Figura 5. Imágenes ópticas de las partículas internalizadas en las hMSCs, observadas con microscopía óptica y excitadas con luz UV a) a las 4 horas y b) a las 72 horas de cultivo.

55 Fig. 6. Resultados del test MTT de citotoxicidad para las partículas funcionalizadas y no funcionalizadas.

#### Descripción detallada de la invención

60 En el contexto de la presente invención, los siguientes términos tienen el significado que se detalla a continuación:

65 El término "partículas magnético luminiscentes" se refiere a entidades físicas independientes y observables de forma sustancialmente esférica, cuyo diámetro promedio es inferior a 3 micras, y que presen-

tan propiedades magnéticas (pueden ser manipuladas mediante la aplicación de campos magnéticos) y luminiscentes (son capaces de emitir radiación electromagnética de diferentes longitudes de onda al ser excitadas a una determinada longitud de onda).

El término “silicio poroso nanoestructurado” se refiere a una estructura obtenida a partir de silicio que comprende una serie de poros de tamaño nanométrico (inferior a 1 micra) en el interior de los cuales se ubican monocristales nanométricos de silicio.

El término “monocristales nanométricos de silicio” hace referencia a monocristales de silicio con un tamaño en el rango nanométrico, es decir, con un tamaño inferior a 1 micra.

El término “material magnético” se refiere a cualquier composición metálica que presente propiedades magnéticas, es decir, que permita su manipulación bajo la acción de un campo magnético.

El término “catalitos” se refiere a cualquier compuesto capaz de favorecer la nucleación en superficie de monocristales de silicio.

La presente invención proporciona en un primer aspecto un sistema de partículas magnético luminiscentes de tamaño inferior a 3 micras, que comprenden una matriz de silicio poroso nanoestructurado, donde dicha matriz comprende en sus poros nanopartículas de material magnético y monocristales nanométricos de silicio.

En una realización particular, las partículas presentan una estructura con un tamaño medio controlable según el procedimiento de obtención y de dimensiones inferiores a una micra, más particularmente entre 500 y 900 nm. Preferentemente, las partículas presentan un tamaño medio de aproximadamente 300-500 nm, lo que les permite ser internalizadas por las células.

Una descripción más detallada de la estructura de la matriz y de los monocristales de silicio, tamaño de poros, tamaño de los monocristales, etc. puede extraerse de la literatura [Martín-Palma, R.J. *et al.*, *Applied Physics Letters*, 2002, 81(1), 25-27; Martín-Palma, R.J. *et al.*, *Applied Physics Letters*, 2004, 85(13), 2517-9; Bisi, O. *et al.*, *Surface Science Reports*, 2000, 38, 1-126], No obstante, en una realización particular, el tamaño de los poros de la matriz de silicio se encuentra comprendido entre 5 y 60 nm.

Las nanopartículas del material magnético infiltrado presentan típicamente un tamaño promedio inferior a 50 nm, preferiblemente entre 1 y 40 nm, más preferiblemente entre 5 y 30 nm. El material constitutivo de las mismas incluye un material superparamagnético, paramagnético o ferromagnético, más preferiblemente ferromagnético. En una realización particular, el material magnético es un óxido metálico, tal como por ejemplo óxido de cobalto, hierro, níquel o manganeso, o un elemento metálico tal como hierro y/o cobalto.

La matriz de silicio poroso se caracteriza por presentar propiedades luminiscentes intrínsecas. Aunque ninguna teoría está plenamente aceptada, se cree ampliamente que la emisión es debida a efectos cuánticos de tamaño debido al confinamiento de portadores. Dicho confinamiento tiene como resultado un aumento de la energía de emisión. Así, presenta una luminiscencia de alta eficiencia en el espectro de infrarrojo cercano y en todo el espectro visible. Este amplio intervalo de energías de emisión proviene de distintas bandas luminiscentes a aproximadamente 470 nm

(azul-verde), 400-800 nm (azul-rojo) y 1100-1500 nm (IR cercano), siendo la banda entre 400-800 nm la más característica.

El máximo de la banda de emisión en el intervalo señalado se encuentra por lo general en torno a los 650 nm (zona del rojo-naranja), no obstante, dicho máximo puede variar en función del tamaño de los nanocristales de silicio. La duración de luminiscencia suele oscilar entre 24-72 horas tras la síntesis de la matriz. Posteriormente, además de perder intensidad se desplaza a longitudes de onda menores. La degradación de la luminiscencia en el intervalo del rojo se atribuye fundamentalmente a la oxidación progresiva de los centros luminiscentes del silicio. No obstante, aunque esta luminiscencia se pierda finalmente en la zona del rojo, la oxidación debida a la acción de soluciones salinas donde las partículas se encuentran dispersas genera la aparición de nuevos centros luminiscentes emisores en el azul que permiten una aplicación mucho más prolongada en el tiempo.

En una realización particular de la invención, la superficie de las partículas se modifica para incorporar grupos o moléculas funcionales capaces de unirse de forma covalente a una bio-molécula o de conjugarse con ella. Ejemplos de grupos funcionales que pueden incorporarse a su superficie incluyen -COOH, -CHO y -NH<sub>2</sub> y todos aquellos que proporcionen grupos silano a dicha superficie. La funcionalización de la superficie de las partículas permite además aumentar la duración de luminiscencia hasta una semana, como es el caso de las partículas funcionalizadas con grupos aminosilanos.

En una realización preferente, las nanopartículas se modifican en su superficie con moléculas capaces de unirse tanto a la matriz de silicio poroso como a una bio-molécula de forma covalente formando un recubrimiento biocompatible. Este recubrimiento actúa además de capa protectora, dado que permite alargar la vida de luminiscencia de la matriz de silicio poroso al retardar considerablemente la oxidación de la estructura y la subsiguiente pérdida de luminiscencia.

En una realización más preferente, la superficie de las partículas se recubre con moléculas de polietilenglicol o con otro polímero de tipo polisacárido como por ejemplo dextrano. En una realización aún más preferente, la superficie se recubre con moléculas de polietilenglicol.

En otra realización particular, las partículas de la invención comprenden además una bio-molécula unida o conjugada a través de los grupos o moléculas funcionales mencionados anteriormente. Preferentemente, dicha biomolécula se encuentra unida de forma covalente a los grupos o moléculas funcionales ubicados sobre la superficie de las partículas.

Por el término bio-molécula se entiende cualquier molécula sintética o natural que juega un papel concreto en los sistemas biológicos. Ejemplos de bio-moléculas incluyen glúcidos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, a partir de las cuales se pueden sintetizar todas las moléculas de alta especificidad de las células para conseguir energía, realizar funciones y reproducirse. Así, estas moléculas incluyen por tanto un aminoácido, un péptido, una proteína, un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleótido, un ácido nucleico, una vitamina, un monosacárido, un oligosacárido, un carbohidrato o un lípido, entre otros.

En un segundo aspecto, la invención se relaciona

con un procedimiento para la preparación de las partículas de la invención que comprende:

- a) someter obleas de silicio a un proceso de galvanización en una disolución que comprende una mezcla de un ácido fuerte inorgánico y un alcohol, aplicando una densidad de corriente comprendida entre 10 mA/cm<sup>2</sup> y 150 mA/cm<sup>2</sup> para obtener obleas de silicio poroso;
- b) someter las obleas de silicio poroso a un proceso de electroinfiltración del material magnético mediante un modo pulsado de corriente-equilibrio por inmersión de las obleas de silicio poroso en una disolución que comprende sales de metales que constituyen el material magnético y catalitos.
- c) convertir las obleas de silicio poroso infiltradas con material magnético en partículas de silicio poroso.

La etapa a) del procedimiento supone el ataque electroquímico de obleas o láminas de silicio mediante la introducción de éstas en una disolución que comprende la mezcla de un ácido fuerte inorgánico y un alcohol, y la aplicación de una densidad de corriente comprendida entre 10 mA/cm<sup>2</sup> y 150 mA/cm<sup>2</sup>. En una realización particular, se emplean obleas de silicio monocristalino tipo p, obleas de silicio monocristalino tipo n u obleas de silicio multicristalino o policristalino. Más preferentemente, se emplean obleas de silicio monocristalino tipo p.

En una realización más particular, se emplean obleas de silicio tipo p monocristalino dopadas con boro, y que presentan una orientación <100> y una resistividad comprendida entre 0.1 y 0.05 Ω·cm. Estas obleas permiten un mejor control del tamaño de las estructuras resultantes.

Como ácido fuerte inorgánico se entiende aquel ácido capaz de disociarse completamente en agua proporcionando iones H<sup>+</sup> y su base conjugada. Ejemplos de ácidos fuertes incluyen el ácido clorhídrico, ácido fluorhídrico, ácido yodhídrico, ácido bromhídrico, ácido perclórico, ácido nítrico y ácido sulfúrico. En una realización preferente de la presente invención, el ácido fuerte empleado es ácido fluorhídrico por su especial involucración en la transferencia de carga en la superficie durante la activación anódica.

Por su parte, el término alcohol incluye alcoholes de cadena C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, como metanol, etanol, propanol o butanol, no obstante, en una realización preferida se emplea etanol.

En una realización particular de la invención, la mezcla ácido fuerte:alcohol se emplea en una proporción en volumen de aproximadamente 1:1. Esta combinación permite la fabricación de estructuras nanométricas en profundidad al proporcionar una tensión superficial optimizada.

Por lo que a la densidad de corriente se refiere, es preferible la aplicación de una densidad comprendida por encima de 60 mA/cm<sup>2</sup> para generar estructuras con tamaños característicos por debajo de la micra. En una realización particular, la aplicación de corriente se realiza bajo condiciones de iluminación con lámpara halógena de 100 W.

La etapa b) del procedimiento supone la incorporación de las nanopartículas magnéticas en el interior de los poros de la matriz de silicio. Dicha etapa se lleva a cabo mediante un proceso denominado electro

infiltración utilizando un modo pulsado de corriente-equilibrio. Para ello, las obleas de silicio poroso previamente obtenidas en la etapa anterior se sumergen en una disolución que comprende sales de metales que constituirán el material magnético, aplicando a dicha disolución pulsos de corriente repetidas veces, dejando un intervalo entre ellos (denominando "tiempo de reposo") que permite el reequilibrado iónico de la disolución. Adicionalmente, se incorporan a la disolución catalitos que favorecen la nucleación en superficie de los metales en forma de monocristales. Preferentemente, se emplea la sacarina sódica.

En una realización particular, la disolución que comprende las sales de metales que constituyen el material magnético es una disolución de Watts de cobalto/hierro. Dicha disolución es ampliamente conocida por un experto y consiste en una mezcla de sulfatos y cloruros metálicos, junto con la adición de ácidos o bases que controlan el pH.

La etapa c) del procedimiento supone la obtención de las partículas de silicio poroso nanoestructurado a partir de las obleas de silicio poroso infiltradas con las nanopartículas magnéticas. En una realización particular, las obleas formadas e infiltradas se dispersan por sonicación en un aparato de ultrasonidos durante el tiempo suficiente para permitir la obtención de las partículas con tamaños inferiores a las tres micras. La trituración con mortero de ágata y una nueva sonicación permite reducir el tamaño medio hasta los 500 nm.

Además de por sonicación en medio líquido, las partículas se pueden obtener a partir de las láminas de silicio poroso por otros medios mecánicos, como raspado o pulverización en mortero de ágata.

El procedimiento de la invención puede comprender además una etapa en la cual las partículas son funcionalizadas en su superficie. La superficie de las partículas se modifica mediante la incorporación de grupos o moléculas funcionales capaces de unirse de forma covalente a una bio-molécula o de conjugarse con ella. Ejemplos de grupos funcionales que pueden incorporarse a su superficie incluyen -COOH, -CHO y -NH<sub>2</sub> (accesibles comercialmente) y todos aquellos que proporcionen grupos silano a dicha superficie. La incorporación de dichos grupos se puede efectuar mediante condensación superficial de los grupos hidroxilo o intercambio de cloro siendo procesos de autoensamblado en disolución ampliamente conocidos por un experto en la materia [Youli Qi, *et al.*, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2007, 302, 383-7, Hydrophobation and self-assembly of core-shell Au@SiO<sub>2</sub> nanoparticles].

En una realización preferente, las nanopartículas se modifican en su superficie con moléculas capaces de unirse tanto a la matriz de silicio poroso como a una bio-molécula de forma covalente formando un recubrimiento biocompatible. En una realización más preferente, la superficie de las partículas se recubre con moléculas de polietilenglicol. Para ello, las obleas obtenidas tras las etapas a) y b) del procedimiento anteriormente descrito se sumergen en una disolución que contiene polietilenglicol. Posteriormente, se lleva a cabo la etapa c) del mencionado procedimiento.

El procedimiento de la invención puede incluir una etapa adicional en la cual se incorpora una bio-molécula sobre la superficie de las partículas. Dicha molécula queda unida o conjugada a las partículas a través de los grupos funcionales incorporados según

se ha explicado anteriormente. Preferentemente, dicha bio-molécula se encuentra unida de forma covalente a los grupos o moléculas funcionales ubicados sobre la superficie de las partículas. La incorporación de dicha bio-molécula se lleva a cabo por procedimientos estándar conocidos por un experto en la materia.

Una vez obtenidas las partículas, es conveniente dejarlas reposar durante un tiempo suficiente como para permitir la estabilización de los centros luminiscentes, como paso previo a su aplicación. En una realización preferente, dichas partículas se dejan reposar durante aproximadamente una hora.

Suele ser también recomendable efectuar un lavado de las partículas en medio líquido antes de su aplicación en el cultivo celular.

Por otra parte, como se demuestra en los ejemplos aportados en la presente invención, las partículas magnético luminiscentes desarrolladas, tanto funcionalizadas como no funcionalizadas, no han resultado citotóxicas tras la realización de ensayos *in vitro*, mostrando una tasa de viabilidad celular similar al de las células control cultivadas y una tasa de supervivencia de un 95-98% tras 72 horas de cultivo. Además, se ha observado con estudios *in vitro* que el sistema de la invención permite la internalización eficiente de las partículas dentro de las células debido a la interacción con receptores específicos de la membrana celular, revelando además la supervivencia de estas células tras 72 horas de cultivo. A la vista de estas propiedades, los sistemas de partículas desarrollados son particularmente útiles en el campo de la biomedicina.

En una realización particular, las partículas magnético-luminiscentes pueden ser empleadas como marcadores celulares con la posibilidad adicional de permitir su manipulación con campos magnéticos. La aplicación de estos campos magnéticos permite además la manipulación mecánica de células y organismos unicelulares.

En otra realización particular, las partículas de la invención pueden ser empleadas en aplicaciones de hipertermia con monitorización óptica, como agentes de contraste en resonancia magnética con seguimiento óptico, o para separación magnéticamente asistida de productos químicos o bioquímicos.

Todas estas aplicaciones cuentan con la ventaja añadida de poder hacer una monitorización óptica de la situación espacial de las partículas en cada proceso.

En otra realización particular, las partículas de la invención se emplean como dispensadores de fármacos en zonas definidas del organismo, siendo posible guiarlas mediante campos magnéticos y ser localizadas ópticamente. En este sentido, el fármaco o molécula biológicamente activa se incorpora a las partículas a través de los grupos o moléculas funcionales que recubren su superficie y posteriormente se libera en el medio biológico deseado.

Así, en otro aspecto la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende las partículas magnético luminiscentes de la invención y una molécula biológicamente activa. Por el término "molécula biológicamente activa" se entiende cualquier sustancia que se utiliza en el tratamiento, cura, prevención o diagnóstico de una enfermedad o que se utiliza para mejorar el bienestar físico y mental de seres humanos y animales.

Ejemplos de moléculas biológicamente activas

incluyen proteínas, péptidos, lípidos, oligonucleótidos, corticosteroides, vitaminas, agentes antifúngicos, agentes bacteriostáticos, agentes cicatrizantes, agentes antihistamínicos, agentes anestésicos, agentes antibióticos, agentes antivirales, agentes antisépticos, agentes inmunosupresores, agentes antiinflamatorios, entre otros.

Ejemplos de composiciones farmacéuticas incluyen cualquier composición líquida (es decir, suspensión o dispersión de la nanopartículas de la invención) para aplicación por vía oral, bucal, sublingual, tópica, ocular, nasal o vaginal, o cualquier composición en la forma de gel, pomada, crema o bálsamo para su administración por vía tópica, ocular, nasal o vaginal.

En un aspecto adicional, la presente invención se dirige por tanto al uso de un sistema de partículas como el definido en la presente invención para la preparación de un medicamento.

La capacidad demostrada de las partículas de la invención para penetrar en las células permite emplear dichas partículas como sistemas de liberación de material genético, haciéndolas especialmente útiles en terapia génica. En consecuencia, un aspecto adicional de la presente invención lo constituye el uso del sistema de partículas de la invención en la preparación de un medicamento para terapia génica.

Así, cuando las partículas se unen a genes cargados negativamente (como por ejemplo plásmidos de ADN) o a ácidos nucleicos, éstas pueden penetrar en las células diana, pasando a través de la membrana celular y liberando el material genético en el interior de dichas células.

Asimismo, mediante la introducción de un anticuerpo en la superficie de las partículas funcionalizadas, éstas pueden unirse de forma selectiva a ciertas células, permitiendo la separación de dichas células mediante la inducción de un campo magnético externo y la detección de las mismas mediante fluorescencia, por lo que también son particularmente útiles para su aplicación en biodetección.

A continuación, se describen algunos ejemplos ilustrativos que revelan las características y ventajas de la invención, sin embargo, no deben interpretarse como limitantes del objeto de la invención tal como se define en las reivindicaciones.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

##### *Preparación de las capas de silicio poroso nanoestructurado*

El silicio poroso nanoestructurado se sintetizó por ataque electroquímico de obleas de silicio tipo p monocristalino (dopado con boro, orientación <100> y resistividad comprendida entre 0.1 y 0.05  $\Omega$ -cm) en una disolución 1:1 de HF (48% wt): Etanol (98% wt).

Las obleas fueron atacadas galvanostáticamente durante 300-1000 s con diferentes densidades de corriente 80 mA/cm<sup>2</sup> y 120 mA/cm<sup>2</sup>, bajo condiciones de iluminación con lámpara halógena de 100 W.

#### Ejemplo 2

##### *Preparación de las partículas magnético - luminiscentes (PSPml)*

Para la preparación de las partículas magnético luminiscentes (PSPml), se realizó una electro infiltración de Co y Fe sobre las capas de silicio poroso anteriormente preparadas mediante un modo pulsado de corriente-equilibrio. Dicha electro infiltración fue llevada a cabo por inmersión de las obleas de silicio poroso nanoestructurado previamente atacadas, en una

disolución de Watts de sales de Cobalto/Hierro y sacarina sódica.

Las muestras así obtenidas fueron sumergidas en una disolución de Polietilenglicol (PEG) en tolueno (al 1% en volumen) y dispersadas por sonicación en un aparato de ultrasonidos durante 20 minutos. Mediante este procedimiento, se obtienen partículas funcionalizadas de silicio poroso nanoestructurado con propiedades luminiscentes y magnéticas, con tamaños comprendidos entre los 500 nm y 3 micras. La figura 1 muestra un esquema de dichas partículas tras la funcionalización con PEG.

Dichas partículas se dejan reposar por un periodo aproximado de una hora, para permitir la estabilización de los centros luminiscentes, antes de una ulterior aplicación o caracterización.

Tanto para el cultivo celular, como para un posterior procesado, se requirió un lavado de las muestras en medio líquido. Para ello se llevaron a cabo cuatro ciclos de centrifugación (12 krpm, 5 min), eliminación de sobrenadante y redispersión por ultrasonidos (10 min) en etanol absoluto.

#### Caracterización

La caracterización por microscopía electrónica de barrido (SEM) se utilizó para controlar el proceso de electro infiltración mediante la observación de la sección transversal de las muestras. Con este fin las muestras fueron seccionadas transversalmente y se dispusieron perpendicularmente al plano focal, sin requerir tratamientos adicionales. Los análisis elementales por espectroscopia de dispersión energética de rayos X (EDAX) se realizaron en el mismo microscopio.

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) se realizó en un sistema JEOL-JEM1010 (100 KV). Una muestra de PSPml en polvo se diluyó y prensó en un mortero de ágata y se redispersó. A continuación se depositó en los portamuestras del TEM (Lacey Formvar 300 mesh copper grids- TED PELLA INC.).

La figura 2(a) muestra la morfología de un conglomerado desecado de PSPml inmediatamente tras la biofuncionalización, en la que se aprecia claramente la forma esférica que adoptan. Además se ha determinado que las PSPml adquieren tamaños que varían entre los 500 nm y las 3 micras de diámetro. Se verificó, gracias a imágenes como ésta, que la forma esférica no se ve afectada cuando se lleva a cabo el proceso de biofuncionalización con PEG. El análisis químico por EDX de las secciones transversales confirmó además la presencia de cobalto y hierro electroinfiltrados en el interior de la capa de silicio poroso nanoestructurado. Se comprobó además, al igual que en el caso general para el silicio poroso nanoestructurado, la presencia de silicio y oxígeno. Además, los análisis EDX semicuantitativos mostraron un gradiente de concentración de metal en el interior del poro que variaba desde más del 10% en concentración a poco menos del 2% a profundidades de 40 a 50 micras, que constituyen la longitud total del poro. De esta forma se integró y se obtuvo una concentración media superior al 3%.

Un punto a destacar es la no presencia de posibles impurezas procedentes de los productos de síntesis, lo cual es de vital importancia en el caso de los sistemas biológicos, dada su sensibilidad a elementos tóxicos.

La utilización de TEM se tomó como esencial para discernir claramente la estructura y configuración interna de las PSPml. Así, el análisis TEM (imagen inferior de la figura 2) confirmó la presencia de na-

nopartículas esféricas de los metales infiltrados en el interior de los poros del silicio poroso nanoestructurado. El rango de tamaños de las nanopartículas observadas está comprendido entre aproximadamente 5 y 30 nm.

#### Propiedades Magnéticas

El comportamiento magnético de las PSPml fue analizado cualitativamente mediante la utilización de un imán. Como se muestra en la figura 3, las partículas se ven claramente atraídas por la cercanía de un campo magnético. Una vez que el imán se separa lo suficiente de la vecindad de las mismas, éstas caen lentamente al fondo del tubo de ensayo.

#### Fluorescencia

Como muestra la figura 4, se determinó la luminiscencia de las PSPml. En primer lugar, mediante un análisis cualitativo con el microscopio de fluorescencia (figura 4 (a)). En un segundo paso, se determinaron la intensidad, el rango de excitación y de emisión, así como la estabilidad. También se estudió la degradación de los principales centros luminiscentes, mediante la medición a sucesivos tiempos de la luminiscencia. En la figura 4(b) se puede observar un espectro típico.

Las medidas espectrofotométricas demuestran que el intervalo de excitación se encuentra en el rango ultravioleta y que el espectro de la luz emitida se encuentra en el óptico, normalmente centrado en el rojo, como muestra la figura 4 (b). El máximo de la banda de emisión aparece en la zona del rojo-naranja (650 nm, aprox.) a las 24 horas de su síntesis (día 0), tras el cual, en sucesivos días además de perder intensidad se desplaza ligeramente a longitudes de onda menores, para finalmente (día 2, 72 h) desaparecer casi por completo la luminiscencia en dicho rango. La degradación de la luminiscencia en el intervalo del rojo se ha atribuido originalmente a la oxidación progresiva de los centros luminiscentes del silicio. La medición de las muestras no funcionalizadas mostró una pérdida total de luminiscencia tras 24 horas, por lo que hemos concluido que la capa protectora contribuye determinadamente a retardar la oxidación de la estructura y su subsiguiente pérdida de luminiscencia. Por otro lado, si bien esta luminiscencia roja se pierde, una fuerte oxidación como la debida a la acción de una disolución altamente salina como el PBS, genera la aparición de unos nuevos centros luminiscentes emisores en el azul, que permiten que las PSPml sigan siendo útiles para las aplicaciones anteriormente expuestas.

#### Ejemplo 3

##### Ensayos *in vitro*: internalización de las PSPml y análisis de citotoxicidad

Las partículas magnético luminiscentes sintetizadas como se indica anteriormente se trataron para los posteriores ensayos biológicos como se describe a continuación. Se realizaron ciclos de lavado-centrifugado en fracciones de 300  $\mu$ l de concentraciones de 5 g/L de las PSPml. Tres ciclos de centrifugado (10 minutos), lavado con PBS y redispersión por ultrasonidos se requirieron para eliminar todas las posibles trazas de disolvente y para equilibrar el pH. A continuación se repitieron los lavados utilizando 1 ml de Dulbecco's Modified Eagle Medium [DMEM] en ciclos como el arriba descrito. El último lavado se realizó sin centrifugación y se dejó reposar una noche para comprobar que el pH era estable. Se procedió entonces a exponer las células mesenquimáticas humanas

[hMSCs] a las partículas preparadas como se indica a continuación.

Para el aislamiento y expansión del cultivo de las hMSCs se utilizaron de dos a cuatro mililitros de muestras de médula ósea humana, pertenecientes a donantes sanos [7, 8, 9, 10, 11]. Las células se recogieron por centrifugación en un gradiente de Percoll al 70%, y sembradas en una concentración de 200,000/cm<sup>2</sup> en DMEM-LG (Gibco) al que se le añadió un 10% de FBS (Sigma).

Las MSCs fueron utilizadas para analizar si las nanopartículas eran internalizadas o no por las células y su posible citotoxicidad. Con este fin, se sembraron 15.000 células en cubreobjetos de vidrio cubiertos con gelatina al 0.5% (piel bovina, Sigma). Las hMSCs se incubaron con DMEM-LG con un 10% de FBS durante 24 h. A continuación, en el caso de ensayos de internalización, se expusieron a las nanopartículas disueltas en DMEM-LG a una concentración de 0.15 mg/ml.

En los dos casos, expuestas y no expuestas, se mantuvieron a 37°C y a una atmósfera de CO<sub>2</sub> del 5%, durante dos periodos de tiempo, 4 y 72 horas respectivamente. Posteriormente, las células adheridas se lavaron dos veces con PBS y fijadas durante 20 minutos con formaldehído al 3.7% en PBS a temperatura ambiente. Tras la fijación, los cubreobjetos se lavaron dos veces en PBS, se deshidrataron las muestras con etanol absoluto (Merck) y montadas con Mowiol/Dabco (Calbiochem). Las células fueron observadas con un microscopio vertical de fluorescencia (OLYMPUS IX81) con un dispositivo CCD acoplado.

#### *Internalización de las PSPml*

Las hMSCs al ser expuestas a las PSPml han demostrado una clara tendencia a internalizar las partículas presentes en el medio, las cuales proporcionan al sistema célula-partícula una luminiscencia observable en el microscopio. El estudio a sucesivos tiempos de los cultivos ha revelado la supervivencia de las células que habían internalizado las partículas (figuras 5a y 5b). El hecho importante aquí es el desplazamiento de la banda de emisión de la luminiscencia al

ser excitada con luz UV, que ha pasado al azul. Este cambio en la luminiscencia se debe a la rápida oxidación del silicio en presencia del medio salino PBS. Según algunos autores, el origen de esta luminiscencia puede ser debida a la formación de grupos silanoles en el silicio [Tamura, H. *et al.*, Thin Solid Films, 1995, 255, 92-5; Kanemitsu, Y. *et al.*, Physics Review B, 1993, 48, 2827],

#### *Ensayos de Citotoxicidad*

La posible citotoxicidad de las partículas en cultivo con las hMSCs se determinó tras 4 y 72 horas de cultivo en DMEM-LG, evaluando la viabilidad celular por el test colorimétrico MTT (Sigma). Este ensayo se basa en la capacidad de las células viables de convertir dentro de la mitocondria una sal de tetrazol, denominada MTT (de color amarillo) (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) a una forma reducida denominada formazán (de color azul).

Dicha reducción sólo es posible que ocurra cuando las enzimas succinato-deshidrogenasas están activas, por lo que dicha transformación está directamente relacionada con la presencia de células viables (vivas). Se añadieron 20 µl de una disolución de 5 mg/ml MTT en PBS en cada pocillo de una placa M96 donde las células fueron cultivadas con las PSPml. Tras 4 horas de incubación a 37°C se retiró el medio y se añadieron 150 µl disolución MTT (4 mM HCl, 0.1% Nonidet P-40 (NP40) en isopropanol (Merck)). Tras otros 15 minutos de solubilización, se determinó la absorbancia de cada muestra en un espectrofotómetro SmartSpec™ Plus BIO-RAD a 590 nm, usando un filtro de referencia a 620 nm. Cada muestra se comprobó por triplicado.

El test MTT, el cual reveló que las células en presencia de las PSPml eran totalmente viables y que dichas partículas no son citotóxicas. En este caso se estudiaron tanto partículas funcionalizadas con PEG, como sin funcionalizar y ambas mostraron una altísima tasa de viabilidad, prácticamente la misma que las células control cultivadas (Fig. 6), siendo las tasas de supervivencia tan altas como de un 95-98% tras 72 horas de cultivo.



## REIVINDICACIONES

1. Un sistema de partículas magnético luminiscentes de tamaño inferior a 3 micras, que comprende una matriz de silicio poroso nanoestructurado, donde dicha matriz comprende en sus poros nanopartículas de material magnético y monocristales nanométricos de silicio.

2. Sistema según reivindicación 1, donde el tamaño de los poros de la matriz de silicio se encuentra comprendido entre 5 nm y 60 nm.

3. Sistema según reivindicaciones 1 ó 2, donde las nanopartículas de material magnético presentan un tamaño comprendido entre 5 nm y 30 nm.

4. Sistema según reivindicación 1, donde el tamaño de los nanocristales de silicio se encuentra comprendido entre 1 nm y 200 nm.

5. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el material magnético es un metal ferromagnético.

6. Sistema según reivindicación 5, donde el metal ferromagnético es hierro y/o cobalto.

7. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la superficie de las partículas comprende además moléculas o grupos funcionales capaces de unirse de forma covalente a una bio-molécula o de conjugarse con ella.

8. Sistema según reivindicación 7, donde la molécula funcional es polietilenglicol o un polímero de tipo polisacárido.

9. Sistema según reivindicación 7, donde los grupos funcionales se seleccionan entre -COOH, -CHO, NH<sub>2</sub> y todos aquellos que proporcionen grupos silano a la superficie de la partícula.

10. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 que comprende además una bio-molécula.

11. Sistema según reivindicación 10, donde la bio-molécula se encuentra unida a las partículas de forma covalente.

12. Sistema según reivindicaciones 10 ó 11, donde la bio-molécula se selecciona entre el grupo consistente en un aminoácido, un péptido, una proteína, un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleótido, un ácido nucleico, una vitamina, un monosacárido, un oligosacárido, un carbohidrato y un lípido.

13. Procedimiento para la preparación de un sistema de partículas como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende:

a) someter obleas de silicio a un proceso de galvanización en una disolución que comprende una mezcla de un ácido fuerte inorgánico y un alcohol, aplicando una densidad de corriente comprendida entre 10 mA/cm<sup>2</sup> y 150 mA/cm<sup>2</sup> para obtener obleas de silicio poroso;

b) someter las obleas de silicio poroso a un proceso de electro infiltración del material magnético mediante un modo pulsado de corriente-equilibrio por inmersión de las obleas de silicio poroso en una disolución que comprende sales de metales que constituyen el material magnético y catalitos.

c) convertir las obleas de silicio poroso infiltradas con material magnético en partículas de silicio poroso.

14. Procedimiento según reivindicación 13, donde las obleas de silicio son obleas de silicio monocristalino tipo p.

15. Procedimiento según reivindicación 14, donde las obleas de silicio monocristalino tipo p se encuentran dopadas con boro, presentan una orientación <100> y una resistividad comprendida entre 0.1 y 0.05 Ω·cm.

16. Procedimiento según reivindicaciones 13 a 15, donde el ácido fuerte inorgánico es HF y el alcohol es etanol.

17. Procedimiento según reivindicación 16, donde el HF y el etanol se encuentran en una proporción en volumen de aproximadamente 1:1.

18. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, donde la densidad de corriente en la etapa a) se lleva a cabo bajo condiciones de iluminación con lámpara halógena.

19. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, donde la disolución que comprende las sales de metales que constituyen el material magnético es una disolución de Watts de cobalto/hierro.

20. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 19, que además comprende una etapa de funcionalización de la superficie de las partículas.

21. Procedimiento según reivindicación 20, donde las partículas se funcionalizan con polietilenglicol.

22. Composición farmacéutica que comprende partículas magnético luminiscentes como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y una molécula biológicamente activa.

23. Composición según reivindicación 22, donde la molécula biológicamente activa se selecciona entre proteínas, péptidos, lípidos, oligonucleótidos, corticosteroides, vitaminas, agentes antifúngicos, agentes bacteriostáticos, agentes cicatrizantes, agentes antihistamínicos, agentes anestésicos, agentes antibióticos, agentes antivirales, agentes antisépticos, agentes inmunosupresores y agentes antiinflamatorios.

24. Uso de un sistema de partículas como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para la preparación de un medicamento.

25. Uso de un sistema de partículas como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para la preparación de un medicamento para terapia génica.

26. Uso de un sistema de partículas como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 como marcadores celulares.

27. Uso de un sistema de partículas como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 como agentes de contraste en resonancia magnética nuclear.

28. Uso de un sistema de partículas como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para separación magnética asistida de productos químicos o bio-químicos.

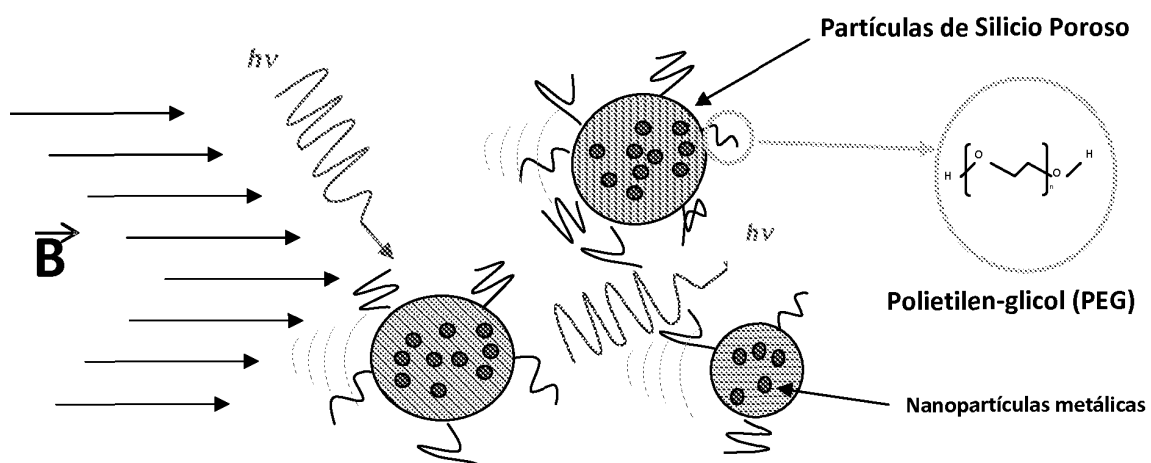
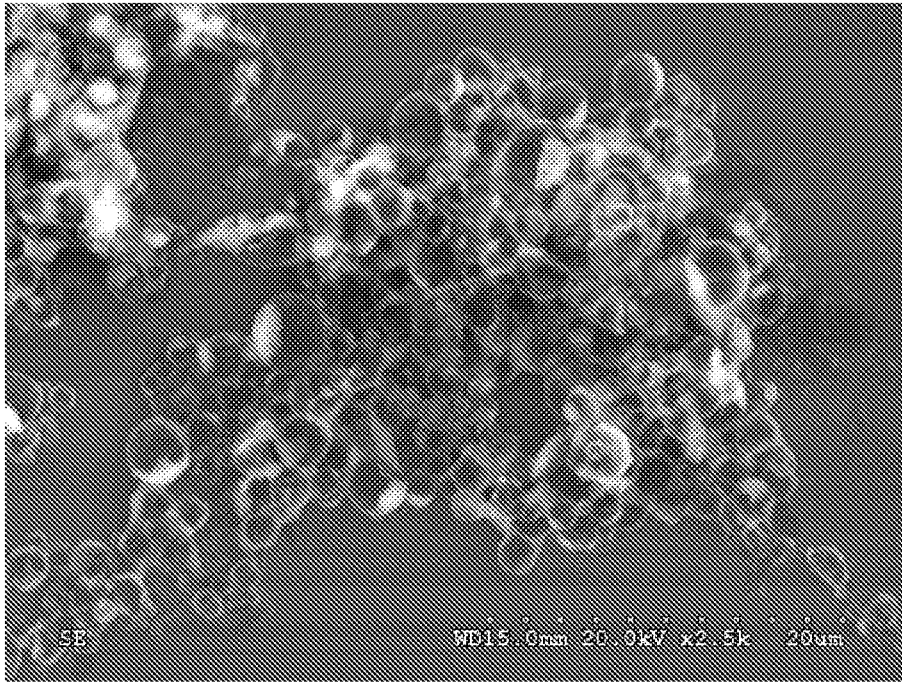
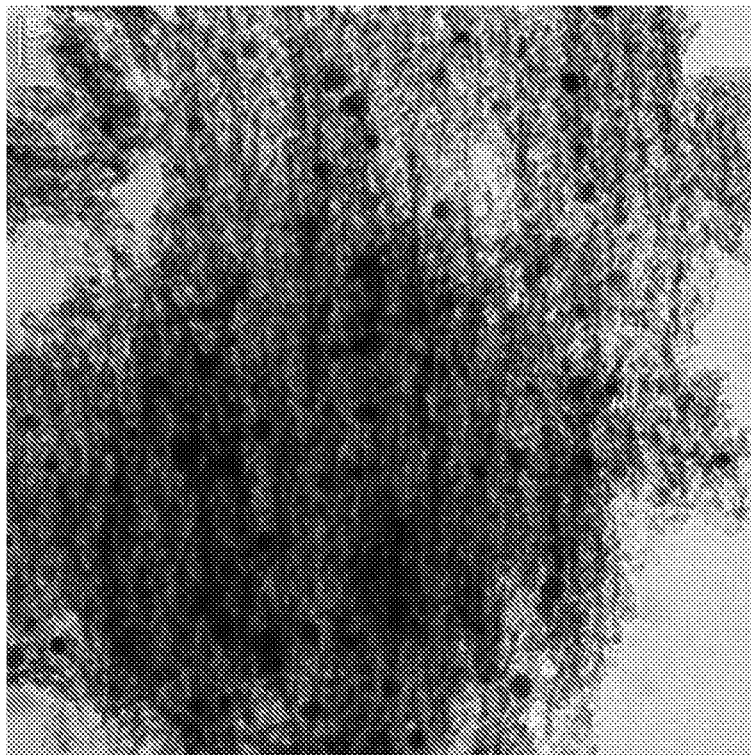


Figura 1

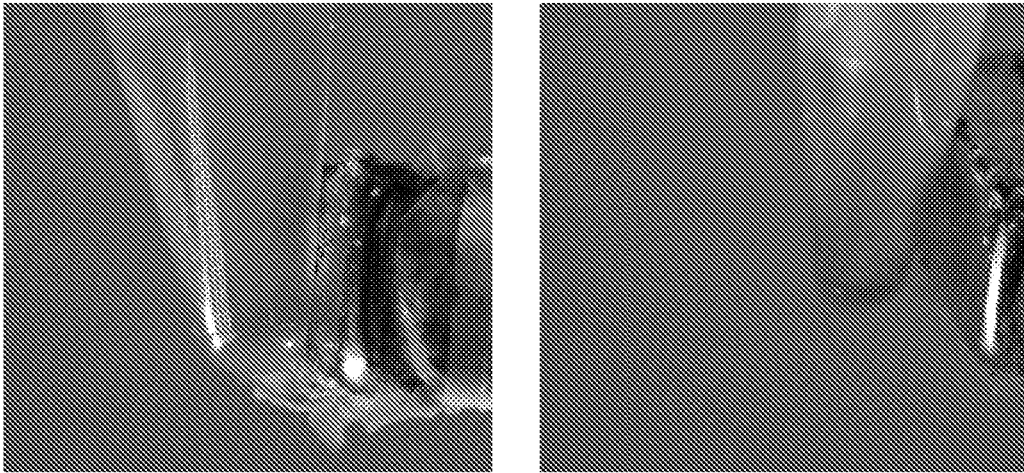


(a)

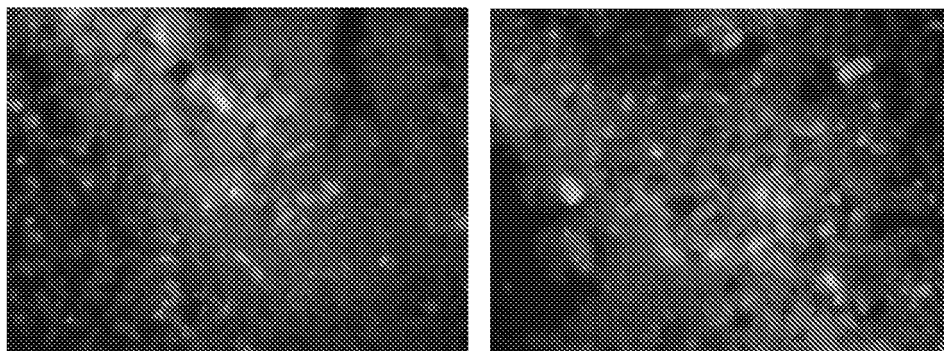


(b)

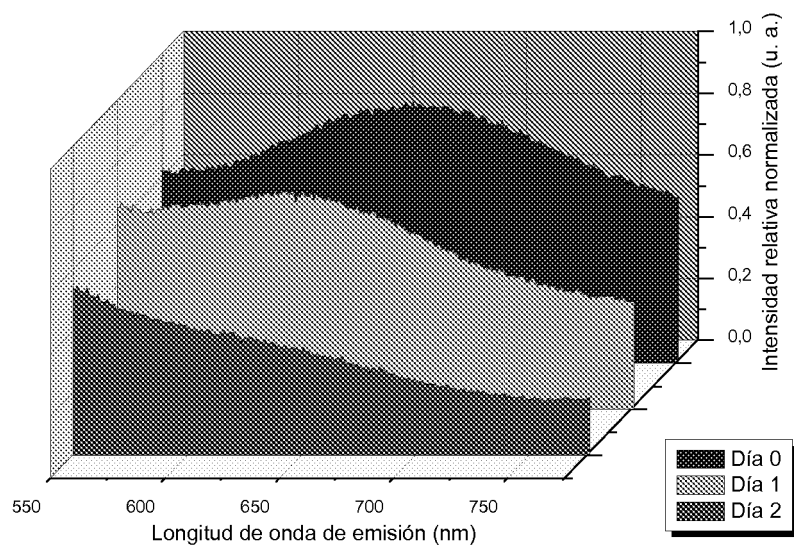
**Figura 2**



**Figura 3**



(a)



(b)

**Figura 4**

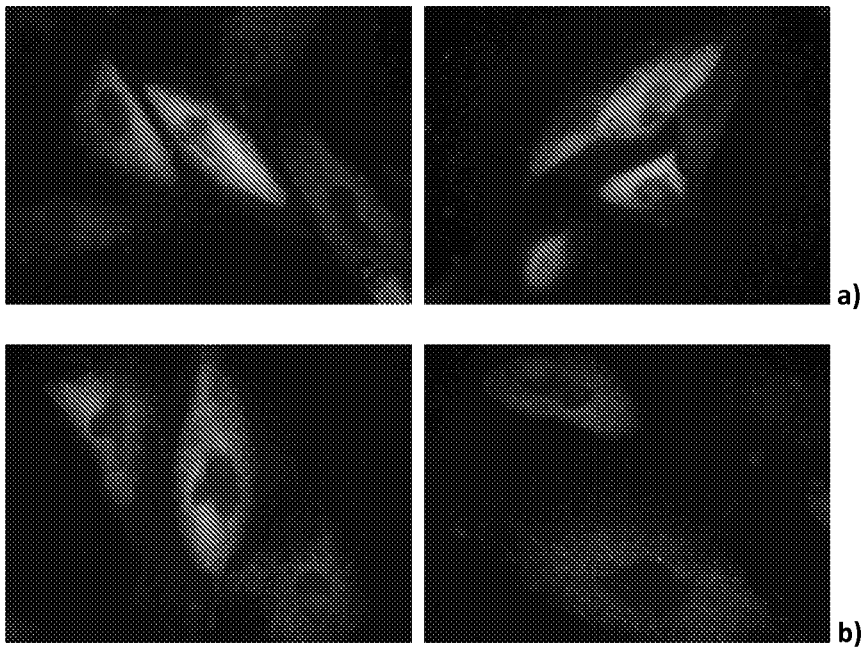


Figura 5

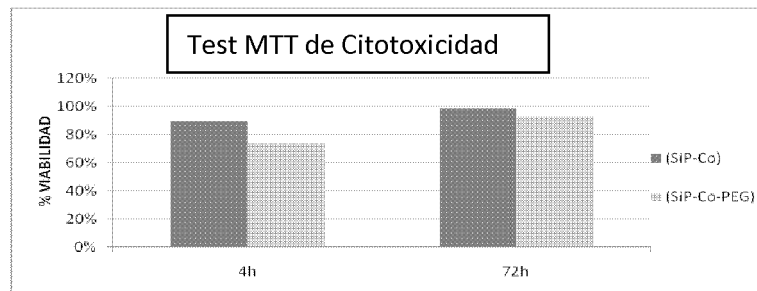
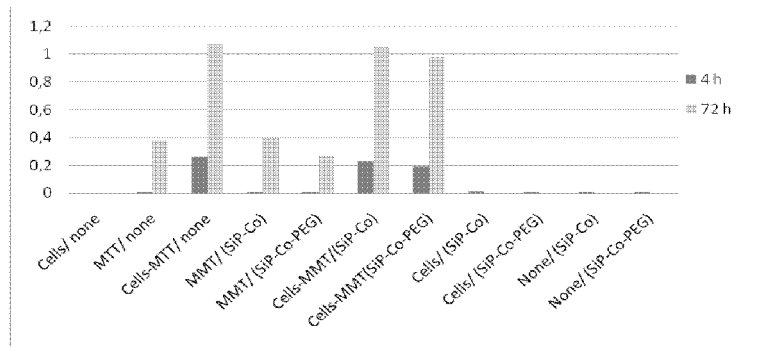


Figura 6



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200931234

②② Fecha de presentación de la solicitud: 22.12.2009

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	P. GRANITZER et al. Investigation of a mesoporous silicon based ferromagnetic nanocomposite. Nanoscale Res Lett vol.5 no. 2, febrero de 2010, páginas 374-378 [en línea], publicado on line el 15 de noviembre de 2009 [recuperado el 17.05.2011], recuperado de internet. < <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2894348/?tool=pubmed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2894348/?tool=pubmed</a> > <DOI:10.1007/s11671-009-9491-7>. Página 2, párrafo 4: experiments y página 3, párrafos 1 y 4.	1-6,13-21
A	J. CHRISTOPHER THOMAS et al. "Delivery of nanogram payloads using magnetic porous silicon microcarriers" LAB ON A CHIP. Vol. 6, 2006, páginas 782-787. Resumen, página 784, columna izquierda, párrafo 2.	1-28
A	R.J. MARTIN-PALMA et al. "HRTEM analysis of the nanostructure of porous silicon". MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING C Vol. 26, 2006, páginas 830-834. Páginas 830-831, apartado: experimental.	1-28
A	CLIVE A. PRESTIDGE et al. "Mesoporous silicon: a platform for the delivery of therapeutics" EXPERT OPINION DRUG DELIV, Vol 4, no. 2, 2007, páginas 101-110. Página 102, apartado 2 y página 105, apartado 8.	1-28
A	US 20080311182 A1 (FERRARI et al.) 18.12.2008, reivindicación 7; párrafos [0067],[0074],[0076].	1-28

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
24.10.2011

Examinador  
S. González Peñalba

Página  
1/5



## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K9/14** (2006.01)

**A61K9/51** (2006.01)

**B82Y5/00** (2011.01)

**B82Y15/00** (2011.01)

**B82Y25/00** (2011.01)

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

A61K, B82Y

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

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

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.10.2011

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 7-28	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-6	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 7-12, 22-28	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-6, 13-21	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	P. GRANITZER et al. Investigation of a mesoporous silicon based ferromagnetic nanocomposite. Nanoscale Res Lett vol.5 no. 2, febrero de 2010, páginas 374-378 [en línea], publicado on line el 15 de noviembre de 2009 [recuperado el 17.05.2011], recuperado de internet. < <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2894348/?tool=pubmed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2894348/?tool=pubmed</a> > <DOI: 10.1007/s11671-009-9491-7>. Página 2, párrafo 4: experiments y página 3, párrafo 1 y 4.	
D02	J. CHRISTOPHER THOMAS et al. "Delivery of nanogram payloads using magnetic porous silicon microcarriers" LAB ON A CHIP. Vol. 6, 2006, páginas 782-787. Resumen, página 784, columna izquierda, párrafo 2.	
D03	R.J.MARTIN-PALMA et al. "HRTEM analysis of the nanostructure of porous silicon". MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING C Vol. 26, 2006, páginas 830-834. Páginas 830-831, apartado: experimental.	
D04	CLIVE A. PRESTIDGE et al. "Mesoporous silicon: a platform for the delivery of therapeutics" EXPERT OPINION DRUG DELIV, Vol 4, no. 2, 2007, páginas 101-110. Página 102, apartado 2 y página 105, apartado 8.	
D05	US 20080311182 A1 (FERRARI et al.)	18.12.2008

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud de patente tal y como ha sido redactada hace referencia a un sistema de partículas magnético luminiscente de tamaño inferior a 3 micras, que comprende una matriz de silicio poroso nanoestructurado donde dicha matriz comprende en sus poros nanopartículas de material magnético y monocristales nanométricos de silicio (reivindicaciones 1-4). El material magnético es un metal ferromagnético tal como hierro y cobalto (reivindicaciones 5-6). La superficie de la partícula comprende además moléculas o grupos funcionales capaces de unirse de forma covalente a una biomolécula o de conjugarse con ella, siendo dicha molécula funcional polietilenglicol (reivindicaciones 7-9). El sistema de partículas comprende además una biomolécula (reivindicaciones 10-12). Por otro lado se reivindica también el procedimiento para la preparación de dicho sistema de partículas (reivindicaciones 13-21), así como la composición farmacéutica que comprende dicho sistema de partículas magnético luminiscente (reivindicaciones 22-23), además de su uso para la preparación de un medicamento para terapia génica, como marcador celular, como agente de contraste en resonancia magnética nuclear o para la separación magnética asistida de productos químicos o bio-químicos (reivindicaciones 24-28)

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA: LP ARTS. 6 Y 8.

El documento D01 hace referencia a un nanocompuesto formado por silicio poroso que comprende en sus poros nanoestructuras ferromagnéticas. Se trata de un sistema híbrido que posee tanto propiedades electrónicas debido al silicio como magnéticas debido al material ferromagnético incorporado (véase resumen y página 2, párrafo 2). Además, el hecho de que ambos componentes tengan baja toxicidad hace que sea un compuesto biocompatible en aplicaciones biomédicas tales como liberación de fármacos, o como marcados biomédico (véase resumen). Dicho documento indica además que el silicio microporoso que posee canales interconectados con diámetros comprendidos entre 2 y 4 nm muestra una fuerte luminiscencia en el visible causada por efectos de confinamiento cuántico (véase página 1, apartado: introduction). Por otro lado, el tamaño promedio de los poros de la capa de silicio poroso es de 55 nm (véase página 3, párrafo 4). Los precipitados metálicos que se incorporan en los poros de la capa de silicio poroso pueden estar en forma esférica o elíptica y medir en torno a 60 nm (véase página 3, párrafo 1). El material magnético que se introduce en los poros de silicio es una magnetita ( $Fe_3O_4$ ) que es un material ferromagnético.

Dicho documento D01 describe también el procedimiento de preparación del nanocompuesto, en el que primero se lleva a cabo la fabricación de silicio poroso, sometiendo obleas de silicio del tipo n a un proceso de anodización, en una solución de ácido fluorhídrico, aplicando una densidad de corriente de 80 mA/cm<sup>2</sup>. En segundo lugar se realiza la deposición electroquímica de un material ferromagnético. En el caso de deposición de Ni en el interior de los poros se utiliza un electrolito llamado Watts (véase página 2, apartado: experiments).

El documento D02 trata sobre micropartículas de silicio poroso magnético capaces de transportar y liberar cargas enzimáticas. Las partículas de silicio altamente poroso (60%) se convierten en magnéticas mediante infusión de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , magnetita) bajo condiciones oxidativas. Después de la incorporación de magnetita, las partículas porosas están todavía suficientemente vacías para incorporar cantidades en nanogramos de cargas moleculares (véase resumen y página 784, columna izquierda, segundo párrafo).

El documento D03 hace referencia al estudio de la estructura de silicio poroso nanoestructurado mediante análisis HRTEM. Para dicho estudio se utilizan obleas de silicio poroso tipo p dopado con boro. Los lados posteriores de las obleas se revistieron con capas de aluminio, se cortaron y se sometieron a una solución electroquímica, en donde el electrolito consistía en una mezcla de HF y etanol en relación 2:1. A continuación, las obleas fueron sometidas a un procedimiento de galvanización bajo condiciones de iluminación con lámpara halógena (véase páginas 830-831, apartado: experimental).

El documento D04 se refiere a las propiedades de silicio poroso y su importancia en aplicaciones biomédicas. En dicho documento se hace referencia también a las técnicas electroquímicas utilizadas para la obtención de silicio poroso entre las que se encuentran la anodización y la galvanización (véase página 102, apartado 2), y se estudia también el uso de silicio poroso para el transporte y liberación de agentes terapéuticos entre ellos fármacos y péptidos/proteínas (véase página 105, apartado 8).

El documento D05 trata sobre un vehículo de liberación que incluye una primera partícula y una segunda partícula, en el que la primera partícula es una micro o nanopartícula que contiene a la segunda partícula (véase resumen). La primera partícula puede ser, entre otros, de silicio nanoporoso (véase reivindicación 7). Además, en la superficie de dicha primera partícula puede encontrarse una biomolécula (véase página 5, párrafo [0067]). En algunas realizaciones, la localización física o liberación de la primera partícula puede verse condicionada por estimulaciones externas tales como activación electromagnética, radiación magnética, entre otras (véase párrafo [0074]). Y por último dicha primera partícula puede tener en su superficie cadenas de polímeros tales como polietilenglicol (PEG) (véase párrafo [0076]).

Por lo tanto, a la vista de los documentos citados anteriormente, las reivindicaciones 1-6 carecen de novedad y actividad inventiva según los artículos 33(2) y 33(3) del PCT. Carecen de novedad y actividad inventiva porque se ha encontrado un sistema de partículas que comprende una matriz de silicio poroso (véase documento D01) con tamaño de poro de 55 nm, que comprende en sus poros material ferromagnético. Y aunque en dicho documento no se indica la presencia de monocristales nanométricos, se sabe por el propio estado de la técnica de la presente solicitud de patente que el silicio poroso nanoestructurado presenta luminiscencia intrínseca como consecuencia de monocristales nanométricos de silicio dentro de la estructura de silicio amorfo, que actúan como puntos cuánticos, hecho que también viene descrito en el documento D01, donde se indica que el silicio microporoso, tiene fuerte luminiscencia en el visible debido a efectos de confinamiento cuánticos. Sin embargo, en dicho documento D01, no se ha encontrado que dicho sistema de partículas comprenda además moléculas o grupos funcionales capaces de unirse de forma covalente a una biomolécula o de conjugarse con ella.

En cuanto a las reivindicaciones 13-21 carecen de actividad inventiva según el artículo 33(3) del PCT. Dichas reivindicaciones carecen de actividad inventiva porque se ha encontrado en el documento D01 un procedimiento de preparación que comprende someter las obleas de silicio poroso a un proceso de anodización en una solución de ácido fluorhídrico, aplicando una densidad de corriente de 80mA/cm<sup>2</sup>, y a continuación realizar la deposición electroquímica de un material ferromagnético. Aunque en dicho documento D01 se utiliza en lugar de galvanización, anodización, como no se ha encontrado en la presente solicitud de patente referencia al hecho de que dicha etapa de galvanización sea la responsable del efecto técnico deseado (en este caso la preparación de silicio poroso nanoestructurado), esa diferencia (galvanización/anodización) no se puede considerar como una solución al problema técnico planteado (obtención de silicio poroso nanoestructurado), sino que se considera una mera alternativa. Además en el documento D03 para obtener silicio poroso nanoestructurado se utilizaron obleas de silicio poroso del tipo p dopadas con boro que se sometieron a una solución electrolítica cuyo electrolito estaba compuesto por HF y etanol, y por último fueron sometidas a un procedimiento de galvanización bajo condiciones de iluminación con lámpara halógena (véase páginas 830-831, apartado: experimental de dicho documento D03). Y por último el documento D04 hace referencia a la utilización de anodización y galvanización para la síntesis de silicio poroso nanoestructurado.

Por otro lado, en dicha solicitud de patente dice que el proceso de galvanización y posterior infiltración ha permitido la incorporación de forma controlada de nanopartículas magnéticas dentro de los poros de la matriz. Y en el documento D01 citado se indica que la distribución geométrica y espacial de los precipitados metálicos dentro del poro puede ser ajustada mediante los parámetros del procedimiento, tales como densidad de corriente y duración del pulso de corriente (véase página 3, párrafo 1).

Y por último, en cuanto a las reivindicaciones 7-12 y 22-28, son nuevas y tienen actividad inventiva según los artículos 33(2) y 33(3) del PCT porque no se ha encontrado, en los documentos citados, ningún sistema de partículas magnético luminiscente como el de la solicitud de invención que presente grupos funcionales de polietilenglicol y una biomolécula unida covalentemente, tal como, aminoácido, péptidos etc. Se han encontrado documentos (véase documento D05) que presentan polietilenglicol en la superficie del sistema de partículas, pero dicho sistema de partículas es completamente distinto al de la presente solicitud de patente. Y se han encontrado documentos que transportan biomoléculas (véase documento D04) pero de manera distinta a la presente solicitud de patente.

Por lo tanto, las reivindicaciones 1-6 se consideran que no cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva según los arts 6 y 8 de la LP, y las reivindicaciones 13-21 no cumplen el requisito de actividad inventiva según el art 8 de la LP.