(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 541 501**

(21) Número de solicitud: 201331869

(51) Int. CI.:

C07F 15/00 (2006.01)
B82Y 10/00 (2011.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

19.12.2013

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

20.07.2015

(56) Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2014/070944

(71) Solicitantes:

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) (90.0%)
SERRANO, 117
28006 MADRID ES y
UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA (10.0%)

(72) Inventor/es:

RUIZ MOLINA, Daniel;
NOVIO VÁZQUEZ, Fernando y
LORENZO RIVERA, Julia

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

(54) Título: **SISTEMA POLIMÉRICO METALOORGÁNICO DE COORDINACIÓN A ESCALA MICRO-/NANOMÉTRICA, PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y APLICACIONES**

(57) Resumen:

Sistema polimérico metaloorgánico de coordinación a escala micro-/nanométrica procedimiento de obtención y aplicaciones.

El objeto de la presente invención es un sistema polimérico metaloorgánico de coordinación de partículas de gran estabilidad y que presentan grupos funcionales en la superficie susceptibles de actuar de puntos de anclaje de diferentes especies que poseen propiedades como luminiscencia, actividad química, catalítica y/o actividad biológica. Son igualmente objetos de la presente invención un procedimiento para la síntesis a nivel micro- y nanométrico del sistema polimérico metaloorgánico, así como las aplicaciones del mismo.

ES 2 541 501 A1

DESCRIPCIÓN

Sistema polimérico metaloorgánico de coordinación a escala micro-/nanométrica, procedimiento de obtención y aplicaciones.

SECTOR Y OBJETO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se enmarca en el área científico-técnica de la Nanotecnología, Biotecnología, Medicina, Ciencia de los Materiales y Química dentro del sector de la fabricación, encapsulación y funcionalización de sistemas metal-orgánicos multifuncionales.

El objeto de la presente invención es un sistema polimérico metaloorgánico de coordinación de partículas de gran estabilidad y que presentan grupos funcionales en la superficie susceptibles de actuar de puntos de anclaje de diferentes especies que poseen propiedades como luminiscencia, actividad química, catalítica y/o actividad biológica. Son igualmente objetos de la presente invención un procedimiento para la síntesis a nivel micro- y nanométrico del sistema polimérico metaloorgánico, así como las aplicaciones del mismo.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Las aplicaciones de las nanopartículas a nivel tecnológico han experimentado un crecimiento exponencial en la última década. Las notables ventajas que presentan respecto a los materiales a nivel micro- o macroscópico ha permitido desarrollar sistemas con propiedades muy beneficiosas para su uso en diferentes áreas científicas e industriales. A nivel de la biomedicina, una de las primeras aplicaciones de las nanopartículas había sido como sistemas transportadores de enzimas, proteínas o vitaminas. Ya en los años 80 se comenzó a desarrollar la aplicación dentro del campo de la bioimagen como agentes de contraste en imagen por resonancia magnética (MRI), nanocontenedores para el transporte de sustancias activas y liberación controlada de drogas. En los últimos años se ha implementado todo un desarrollo tecnológico centrado en la biocompatibilidad de estos sistemas, inmunoensayos, terapia génica y vectorización de las nanopartículas para la detección y actuación específica sobre células tumorales. A nivel industrial (electrónica, aeronáutica, militar) se han descrito aplicaciones basadas en nanopartículas como lubricantes, sensores magnéticos, aditivos en composites para la mejora de propiedades físico-químicas, para el desarrollo de superficies super-hidrofóbicas, adhesivos, etc.

A nivel biomédico, se puede hacer una clasificación de los tipos de nanopartículas en función del material que las integra. Así, se puede hablar de partículas basadas en sistemas puramente orgánicos, como vesículas lipídicas o polímeros orgánicos (poliestireno, poliamida, polietilenglicol derivados, etc.) sistemas inorgánicos, como nanopartículas metálicas (oro, hierro, plata, etc.) o silica mesoporosa; y sistemas híbridos (gel-nanoparticulas, péptidos-nanoparticulas. Sin embargo las nanopartículas constituidas por polímeros de coordinación representan un nuevo reto sintético y de aplicación, como consecuencia de una tecnología avanzada emergente. Los nanosistemas desarrollados con esta tecnología han mostrado interesantes propiedades magnéticas, electrónicas, ópticas y catalíticas asociadas a la cuidadosa selección de los ligandos y metales que contienen. Las posibles aplicaciones van desde el uso como agentes de contraste en bioimagen hasta la detección y actuación sobre células cancerígenas. El adecuado diseño experimental permite obtener tamaños idóneos para su aplicación a nivel biomédico y favorecer el transporte intracelular de diferentes biomoléculas evitando su eliminación por el sistema retículo endotelial o la acumulación en tejidos.

Las limitaciones de uso de nanopartículas a nivel tecnológico están relacionadas con su estabilidad, la posibilidad de incorporar diferentes funcionalidades en la superficie y su biocompatibilidad. La mayoría de veces los procedimientos sintéticos aportan nanopartículas con baja estabilidad, baja capacidad de funcionalización y escasa biocompatibilidad. Para mejorar estas prestaciones, normalmente se recurre al recubrimiento de las nanopartículas con materiales que confieren una mejor estabilidad y permiten una posterior funcionalización. Así se han utilizado recubrimientos que contienen silicio [WO2006/055447], diferentes polímeros orgánicos (dextrano [US4452773], proteínas [US2010/0029902], polímeros sintéticos [WO2009/135937, y compuestos de bajo peso molecular con afinidad por la superficie de las nanopartículas [WO 03/016217] o cadenas orgánicas ambifílicas de origen lipídico [Hasan, W et al. NANO LETTERS (2012), 12, 287-292].

Sin embargo, el recubrimiento de las nanopartículas con una capa estabilizadora normalmente acarrea dificultades y está muy limitada por la afinidad entre la superficie de la nanopartícula y el nuevo material. Las interacciones electrostáticas suelen ser muy sensibles al medio (condiciones de pH, presencia de iones, potenciales eléctricos, etc.) y las condiciones de reacción para generar los enlaces covalentes pueden alterar el sistema de partida. Además, el añadir un nuevo material en la superficie puede modificar notablemente las propiedades de la nanopartícula inicial (porosidad, propiedades ópticas, propiedades catalíticas, magnéticas, etc.). Por ello, la situación ideal correspondería a un sistema sintético de elevada estabilidad y que directamente presente una superficie con grupos funcionalizables.

En los últimos años, los polímeros de coordinación se han presentado como una novedosa clase de materiales con propiedades fácilmente modificables y adaptables a una aplicación en concreto. Las prácticamente ilimitadas posibilidades de combinación de multitud de ligandos orgánicos y/o iones metálicos permiten diseñar materiales con estabilidades, dimensiones, morfologías y funcionalidades a la carta. Una de las familias de polímeros de coordinación más ampliamente estudiadas es la de los “metal-organic frameworks” (MOFs).

Estos compuestos permiten un gran control sobre la liberación de determinadas especies activas o fármacos por modificación del tamaño de poro o el área superficial de estos materiales, que implica un aumento en sus capacidades de carga. El hecho de que sean materiales cristalinos facilita el análisis estructural y el estudio de las interacciones host-guest, lo que permite una sistematización a la hora de modificar capacidades de encapsulación y liberación controlada de una determinada sustancia.

Otra familia de compuestos que ha atraído una atención especial es la que concierne a las partículas amorfas de polímeros de coordinación (CPPs). Hay que destacar que, hasta la fecha, se ha descrito la síntesis de diferentes sistemas basados en la conjugación de iones metálicos con ligandos orgánicos para generar materiales micro-/nanometricos con aplicaciones tales como absorción de gases, catálisis, intercambiadores de iones, sensores, magnetismo, óptica y “drug delivery”. La preparación de estos materiales a la nanoescala se puede realizar mediante diferentes técnicas (reacciones solvotermales, técnicas de emulsión o precipitación forzada) que implican precipitaciones muy rápidas, lo que repercute en la formación de sistemas amorfos. Los CPPs han emergido como una alternativa a los metal-organic frameworks (MOF) como consecuencia de sus inherentes ventajas como son el fácil control de su morfología y tamaño, estabilidad, escalabilidad, capacidad de carga y reducido coste. Como consecuencia, se ha observado un incremento exponencial en la publicación de estudios con estos sistemas en los últimos 5 años y se han obtenido resultados muy

prometedores a nivel de su aplicación biomédica [F. Novio et al. Coo*d. Chem. Rev.* (2013), 257**,** 2839– 2847].

La primera referencia de síntesis a nivel nanoscópico de partículas esféricas metaloorgánicas a partir de la polimerización de iones metálicos y ligandos orgánicos bifuncionales es la patente y la correspondiente publicación científica de Mirkin et al. en 2005 [Chemically tailorable nanoparticles realized through metal-metalloligand coordination chemistry. C. A. Mirkin, M. Oh, B.-K. Oh, WO2007053181]. En este caso se trataba de polímeros formados por diferentes iones metálicos provenientes de sales metálicas (Zn, Cu, Mn, Pb, Ni, Co, Cd, y Cr) y ligandos bases de Schiff. Las partículas amorfas de tamaño nanométrico se obtenían cuando se precipitaba el polímero por adición de un disolvente no polar (pentano, éter etílico, tolueno, hexano y benceno). Otra referencia de síntesis de polímeros metaloorgánicos, utilizando una metodología similar, se publicó ese mismo año por parte de Wang et al. [X. Sun, S. Dong, E. Wang, J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 13102]. En este caso eran polímeros sintetizados en agua utilizando platino como ion metálico y la p-fenilendiamina como ligando orgánico. Posteriormente, se publicó una nueva ruta sintética para la síntesis de partículas metaloorgánicas formadas por iones de Fe y ligandos triazol o iones de Gd y un ligando dicarboxílico sintetizadas con una técnica basada en microemulsiones [E. Coronado, J. R. Galán-Mascarás, M. Monrabal-Capilla, J. García-Martínez, P. Pardo-Ibañez, Adv. Mater. (2007), 19, 1359-1361.

La primera vez que se describió el uso de estas partículas metaloorgánicas como sistemas de encapsulación y transporte de sustancias o especies activas fue en el 2008 con la solicitud de patente de Ruiz-Molina et al. (P200801230; PCT/ES2009/070128). En los últimos años se han publicado multitud de trabajos basados en polímeros metaloorgánicos amorfos con propiedades fluorescentes que muestran propiedades de intercambio catiónico selectivo [M. Oh, C. A. Mirkin, Angew. Chem. Int. Ed. (2006), 45, 5492-5494]**,** almacenamiento de hidrógeno [Y.-M. Jeon, G. S. Armatas, J. Heo, M. G. Kanatzidis, C. A. Mirkin, Adv. Mater. (2008), 20, 2105-2110] o con comportamientos magnéticos muy interesantes como la tautomería de valencia [I. Imaz, D. Maspoch, C. Rodríguez-Blanco, J.-M. Pérez-Falcón, J. Campo, D. Ruiz-Molina, Angew. Chem. Int. Ed. 2008, 47, 1857-1860].

Sin embargo, a pesar de los últimos avances, no se ha descrito hasta la fecha una metodología desarrollada para conseguir la funcionalización de la superficie de estos sistemas de forma directa, sistemática y con un coste reducido. La funcionalización sistemática de estos materiales permite selectivamente modificar propiedades como estabilidad térmica, mecánica, resistencia a determinados agentes químicos, pH, o incluso incrementar su biocompatibilidad. La funcionalización también permite desarrollar uniones covalentes con las especies de interés y formar uniones que sean sensibles a determinados estímulos externos como luz, temperatura o cambio en el pH.

En el caso de los MOFs se han hecho significantes esfuerzos en desarrollar estos sistemas para aplicaciones novedosas a través del uso de ligandos funcionalizados [Seth M. Cohen *Chem. Rev.* (2012), *112* (2), 970–1000]. Sin embargo el uso de ligandos funcionales es muy limitado para la síntesis solvotermal convencional de estos sistemas, ya que la presencia de grupos funcionales en los ligandos puede inducir impedimentos estéricos, problemas de solubilidad y características de coordinación al metal que pueden interferir en la cristalización y formación de las redes tridimensionales.

Por el contrario, en el caso de las partículas de polímeros de coordinación amorfas estas limitaciones no existen. De hecho el uso de ligandos funcionales puede aportar un valor

añadido a los sistemas ya que la acertada elección de los ligandos conectores y los ligandos funcionales puede repercutir en la modificación de la estabilidad, porosidad o el número de grupos funcionales en la superficie susceptibles de servir como punto de anclaje de diferentes moléculas o biomoléculas.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LA INVENCIÓN

Se entiende por “nanopartículas” en la presente invención las partículas de polímeros de coordinación con un tamaño comprendido entre 1nm y 200nm. Y se entiende por “micropartículas” las partículas mayores de 200nm.

Constituye el objeto de la presente invención un sistema polimérico metaloorgánico de coordinación a escala micro-/nanométrica útil para encapsular y unir covalentemente diferentes sustancias en su superficie que comprende:

(a) una sal o complejo de un ion metálico de la serie de transición o de la familia de las tierras raras, seleccionado de la lista que comprende zinc, cobre, hierro, cadmio, manganeso, níquel, cobalto, gadolinio, europio, terbio, uranio, aluminio o galio que constituyen los centros metálicos del sistema polimérico metaloorgánico.
(b) al menos, un ligando orgánico que actúa como conector entre centros metálicos;
(c) al menos un ligando orgánico funcional quelato con afinidad por el centro metálico y que presenta un grupo funcional libre que no coordina al centro.
(d) una sustancia de interés a encapsular, seleccionadas del grupo que comprende: una entidad biológica, un fármaco, una vacuna, un agente de contraste de diagnóstico, un marcador, un compuesto orgánico, un compuesto inorgánico, un compuesto metalorgánico o un nanomaterial.

En sucesivas realizaciones particulares del objeto de la presente invención:

- el ion metálico proviene del compuesto Co(CH3OO)2•4H2O.
- el ligando orgánico que actúa como conector entre centros metálicos es un compuesto orgánico con al menos un grupo funcional, que se selecciona de la lista que comprende ácidos carboxílicos, grupos fosfóricos, alcoholes, tioles, aminas, catecoles y cualquier grupo funcional derivado del nitrógeno, particularmente imidazoles, piridina y bases de Schiff, siendo particularmente preferido que el ligando orgánico que actúa como conector entre centros metálicos sea el 1,4-bis(imidazol-1-ilmetil) benceno (Bix).
- la sustancia de interés a encapsular es una entidad con actividad biológica seleccionada de una lista que comprende una bacteria, un virus, una célula eucariota, una proteína, un anticuerpo, azúcares, ADN, RNA o un fármaco.
- la sustancia de interés a encapsular es un nanomaterial seleccionado de una lista que comprende nanopartículas, nanotubos, nanohilos, nanocristales o nanodispositivos.
- el ligando orgánico funcional es un compuesto orgánico quelato con al menos un grupo funcional libre, donde el grupo funcional se selecciona de la lista que comprende ácidos carboxílicos, alcoholes, tioles, aminas, tiocianatos, isocianatos, isotiocianatos, catecoles y cualquier grupo funcional derivado del nitrógeno, menos un grupo funcional libre, donde el grupo funcional se selecciona de la lista que comprende ácidos carboxílicos, alcoholes, tioles, aminas, tiocianatos, isocianatos, isotiocianatos, catecoles y cualquier grupo funcional derivado del nitrógeno. Las interacciones secundarias no covalentes desarrolladas por los grupos funcionales libres en el ligando orgánico quelato modulan la estabilidad térmica de las nanopartículas, siendo

estas interacciones secundarias no covalentes puentes de hidrógeno, fuerzas de Van de Waals, interacciones iónicas o interacciones hidrofóbicas.

En un modo de realización preferente, el compuesto orgánico quelato lo constituye una mezcla en proporciones, respecto a las cantidades estequiométricas, comprendidas entre 75% y 25% de ácido 3,4-dihidroxicinámico que aporta el grupo -COOH libre, y entre el 25% y 75% de dopamina (3,4-dihidroxifenetilamina) que aporta el grupo –NH2.

En todas las realizaciones anteriores, el sistema polimérico metalorgánico presenta un tamaño comprendido entre 40 nm y 10 µm y se encuentra funcionalizado en su superficie exterior con otra especie o sustancia, la cual se selecciona de una lista que comprende un anticuerpo, una bacteria, un virus, una célula, una proteína, un azúcar, ADN, un fármaco, una droga, un compuesto orgánico, un compuesto fluorescente, un compuesto inorgánico, un compuesto metaloorgánico o un nanomaterial.

La funcionalización del sistema polimérico metaloorgánico se puede realizar:

- por reacciones de acoplamiento entre un grupo carboxílico y un grupo amino mediante el uso de carbodiimidas para formar un enlace amida (EDC/NHS).
- por una reacción de acilación de aminas entre un grupo cloruro de ácido y una amina para generar un enlace amida.
- por reacción entre un cloruro de sulfonilo y una amina para formar un enlace sulfonamida.
- por reacción entre un isocianato y alcoholes para generar un acoplamiento por enlace uretano.
- por reacción entre un isocianato y aminas para generar un acoplamiento por enlace urea.
- por reacción entre un isocianato y tioles para generar un acoplamiento por enlace tiocarbamato.

Constituye otro objeto de la presente invención un procedimiento de obtención del sistema metaloorgánico que comprende las siguientes etapas:

(a) una etapa de adición de la sal o complejo de un ion metálico, del ligando orgánico que actúa como conector de los centros metálicos y del ligando quelato con afinidad por el centro metálico que deja un grupo funcional libre, a una única solución de reacción, la cual se encuentra en agitación;
(b) precipitación del sistema polimérico metaloorgánico formado;
(c) separación de los sistemas poliméricos metalorgánicos

La etapa de adición puede llevarse a cabo mediante la adición de la sal o complejo de ion metálico a una solución que contiene los dos tipos de ligandos manteniéndose una relación molar 1:1:2 correspondiente a la mezcla ion metálico: ligando conector: ligando funcionalizado iniciándose la formación del sistema polimérico metalorgánico o bien mediante la adición de los dos tipos de ligandos orgánicos dentro de la solución que contiene la sal o complejo de un ión metálico.

La agitación puede ser mecánica, magnética o mediante ultrasonidos a temperatura ambiente. En algunos casos, el material formado tras la etapa de adición presenta baja solubilidad en el medio de reacción. En el caso en que el material formado tras la etapa de adición muestre una elevada solubilidad en el medio de reacción, se induce la precipitación

mediante la adición de un solvente que se selecciona entre disolventes no polares como pentano, éter etílico, tolueno, hexano y benceno, o agua, separándose los sistemas metaloorgánicos obtenidos mediante centrifugación y lavados con un disolvente que no solubilice el material, pero que disuelva las impurezas o restos de reactivos de partida que puedan impurificar el material, almacenándose el material metalorgánico como sólido o en una suspensión coloidal.

Constituyen también objetos de la invención los diversos usos del sistema polimérico metaloorgánico:

- para la liberación y/o protección y/o almacenamiento y/o variación de las propiedades de las sustancias de interés encapsuladas.
- para la elaboración de catalizadores, sensores, agentes de contraste, biomarcadores, semiconductores magnéticos o dispositivos para grabación magnética.
- para la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica, diagnóstica o terapéutica.

También es objeto de la presente invención la composición farmacéutica, diagnóstica o terapéutica que comprende el sistema polimérico metalorgánico.

Problema técnico que resuelve:

1. Permite la funcionalización in situ de las nanopartículas (one pot). Evita el tener que recubrir las nanopartículas con un polímero funcionalizado posteriormente a su síntesis.
2. Se puede funcionalizar de la superficie de la nanoparticula con uno o más grupos funcionales diferentes en una sola reacción (one pot).
3. Incremento de la estabilidad térmica y frente al pH. Los sistemas detallados anteriormente mostraban una temperatura de fusión baja (entorno a los 60-70ºC) y elevada sensibilidad al cambio de pH.
4. Control de la hidrofila de los nanosistemas y por tanto la posibilidad de redispersar adecuadamente el material en medios or*gánicos o acuosos.*
5. Aumento de la biocompatibilidad al poder anclar en la superficie moléculas y biomoléculas que evitan respuestas inmunológicas, por ejemplo cadenas derivadas de PEG.

Ventajas que aporta respecto al estado de la técnica actual:

1. Posibilidad de anclar prácticamente cualquier molécula y/o biomolécula de forma covalente y reversible en la superficie de los nanosistemas.
2. Capacidad para controlar la carga en superficie en función de los grupos funcionales utilizados, que es un factor clave en la internalización celular de estos nanosistemas (E. Fröhlich, International Journal of Nanomedicine 2012:7 5577–5591).
3. Se puede controlar la estabilidad térmica y la sensibilidad al pH mediante la elección adecuada de los ligandos bifuncionales conectores y los ligandos que dotan de grupos funcionales libres al polímero de coordinación resultante. La diversidad de grupos funcionales libres utilizados, que son los que controlan las fuerzas de cohesión entre cadenas poliméricas, permite modular “a la carta” la estabilidad de las nanopartículas. Así es posible diseñar partículas con una gran estabilidad o que se degraden rápidamente en un entorno determinado.

Posibles aplicaciones:

- Catálisis,

- Biosensores,
- Biomarcadores,
- Agentes de contraste,
- Cancer Cell targeting,
- Encapsulación de fármacos en general (anticancerígenos, antiparasitarios, antimaláricos etc.),
- Nanocontenedores inteligentes (capaces de responder a un estímulo externo) para liberación controlada de fármacos u otras especies activas o de interés,
- Dispositivos moleculares

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1: a) Esquema de la formación de las cadenas poliméricas y el confinamiento en una nanoestructura conteniendo grupos carboxilo en la superficie fabricadas según el ejemplo 1, b) aspecto de las partículas vistas mediante microscopía electrónica de barrido, c) aspecto en sólido y d) dispersas en agua.

Fig. 2: a) Imagen de SEM de nanopartículas funcionalizadas con un dye fluorescente (6-aminofluoresceina; ANF). En el recuadro se puede ver la imagen de las nanopartículas obtenidas mediante espectroscopia de fluorescencia. b) Espectro de absorción normalizada (línea continua) y emisión (línea discontinua) para las nanopartículas funcionalizadas con la 6-aminofluoresceina.

Fig. 3: a) Espectros FT-IR de partículas de hierro y cobalto funcionalizadas con PEG en la superficie y comparación con el ligando NH2-PEG libre, b,c) Imágenes SEM de partículas funcionalizadas con PEG en la superficie, d) Medidas de potencial Zeta de las partículas funcionalizadas con PEG y la comparación con las nanopartículas no funcionalizadas.

Fig. 4: a) Esquema de la reacción de acoplamiento entre nanoparticulas conteniendo grupos carboxilo en la superficie y la octadecilamina (ODA) mediante los agentes de acoplamiento EDC/NHS, b) Imagen de SEM de nanoparticulas conteniendo cadenas de ODA en la superficie, c) Separación de fases en una mezcla tolueno/agua conteniendo partículas no funcionalizadas y funcionalizadas con ODA en la superficie. Se puede observar cómo es posible controlar la hidrofobicidad de las nanopartículas mediante la inclusión de cadenas hidrofóbicas.

Fig. 5: Imágenes de a) SEM, y b) Microscopio óptico de fluorescencia de nanopartículas conteniendo camptotecina (CPT) encapsulada, c) Espectros de absorción y emisión de la CPT libre y encapsulada.

Fig. 6: Viabilidad celular de la línea celular MCF-7 después de 24 h de incubación con nanopartículas organometálicas de a) hierro y b) cobalto, funcionalizadas con una molécula fluorescente (aminofluoresceina) en la superficie; c) y d) Efecto de la citotoxicidad de las nanopartículas conteniendo camptotecina encapsulada y comparación con la camptotecina libre a 24h y 72h.

Fig. 7: Análisis de estabilidad térmica de las partículas mediante TGA/DSC y SEM de las partículas obtenidas en el ejemplo 7. Comparación entre las partículas conteniendo el ligando *dhc* (a, b) y las que contienen el ligando *dtbucat* (c, d).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención aporta un procedimiento de obtención de nanopartículas basadas en polímeros de coordinación funcionalizadas en la superficie, con elevada estabilidad en estado sólido y en dispersión en medio líquido, y con gran potencialidad para su uso en el campo de la biomedicina.

El procedimiento de la invención se basa en la polimerización de un sistema metal-orgánico en un único paso, sencillo, de bajo coste, en disolventes no contaminantes y con elevado rendimiento. El resultado es un material que presenta grupos funcionales en la superficie susceptibles de actuar como punto de anclaje de diferentes moléculas y biomoléculas que pueden aportar un valor añadido al sistema.

El sistema metal-orgánico de esta invención, no solo complementa a los sistemas metalorgánicos existentes sino que permite la obtención de nuevos sistemas con nuevas propiedades, más resistentes a la degradación, resistentes a pH extremos y con la posibilidad de una funcionalización posterior del nanomaterial generando sistemas o plataformas multifuncionales. La facilidad y sencillez de obtención de estos sistemas que presentan determinados grupos funcionales o una mezcla de grupos funcionales diferentes en la misma nanoestructura abre todo un campo de utilización de estos materiales en nanomedicina como elementos para teragnosis (terapia + diagnosis). Es decir, un mismo sistema puede mostrar propiedades para encapsular diferentes especies activas o drogas (fármacos, partículas magnéticas, drogas, proteínas, agentes de contraste de diagnóstico, vacunas, etc.), mientras en la superficie se pueden disponer diferentes moléculas o biomoléculas que aportan una o varias funcionalidades añadidas. Algún ejemplo puede ser la inclusión de moléculas fluorescentes (para bioimagen), anticuerpos (para localización selectiva de un tipo de células tumorales o de otro tipo), biomarcadores, agentes de detección de determinados analitos y/o moléculas o biomoléculas que incrementen la biocompatibilidad de la nanoestructura como pueden ser derivados del polietilenglicol, polisacáridos o determinadas proteínas.

La invención propuesta se centra en la descripción de una nueva metodología para generar un sistema metalorgánico multifuncional, con la principal característica de que se utiliza para su síntesis una mezcla de ligandos con diferente cometido. Por un lado se utilizan ligandos orgánicos bifuncionales flexibles, que actúan como conectores entre centros metálicos y que favorecen la polimerización. Por otro lado se incluyen, en la mezcla de reacción, ligandos que contengan un grupo funcional que favorezcan su coordinación al centro metálico y otro grupo funcional que no se coordine al catión metálico y quede libre posteriormente a la síntesis. El hecho de que un grupo funcional quede libre una vez sintetizado el material micro-/nanoscópico permitirá el anclaje posterior de diferentes moléculas o biomoléculas. Además, el uso de grupos funcionales libres que son capaces de generar interacciones secundarias no covalentes (puentes de hidrógeno; fuerzas de Van der Waals; interacciones iónicas e interacciones hidrofóbicas) permiten modular la estabilidad de las nanopartículas a voluntad y adecuarlas a un determinado uso.

La presente invención se basa en la síntesis de un sistema metalorgánico conteniendo ligandos con elevada afinidad por una gran cantidad de iones metálicos y que a su vez presentan grupos funcionales libres susceptibles de ser utilizados como puntos de anclaje de diferentes sustancias a una fase posterior a su síntesis. El sistema metalorgánico de esta invención que contiene ligandos con grupos funcionales libres no sólo añade un nuevo sistema a los ya existentes sino que permite el diseño y la obtención de nuevos sistemas

funcionales donde se combinan las propiedades propias de las partículas metalorgánicas (porosidad, capacidad de encapsulación y liberación controlada, magnetismo, electrónica, fluorescencia, etc.) con las ventajas propias de obtener sistemas con grupos funcionales en la superficie que permite anclar, de forma covalente, diferentes moléculas y biomoléculas con importantes aplicaciones a nivel tecnológico o médico. A modo de ejemplo, con dicha invención se pueden obtener sistemas inteligentes, que pueden responder a la aplicación de un estímulo externo, para la liberación de fármacos, almacenamiento y protección de diferentes sustancias orgánicas-inorgánicas, sensores, sistemas para bioimagen, dispositivos magnéticos, etc. con aplicaciones en sectores tan diversos como la electrónica, catálisis, control medioambiental o medicina.

Aparte de los beneficios derivados de la funcionalización de la superficie de estos sistemas, la elección cuidadosa de los ligandos nos permite diseñar nanoplataformas con diferente porosidad, densidad, solubilidad, resistencia a diferentes pH o temperatura. Además se pueden diseñar sistemas “inteligentes” en los que la aplicación de un estímulo externo induce cambios a nivel físico-químico que repercuten en sus propiedades. Todas estas propiedades pueden ser controladas y sistematizadas en base a determinadas interacciones internas entre las cadenas de los polímeros y propiciadas por los grupos funcionales libres que pueden generar interacciones secundarias (tipo van der Waals, electrostáticas, de puentes de hidrógeno o tipo p-p) que repercutirán en las propiedades físico-químicas del material. Asimismo la inclusión de enlaces sensibles al pH, luz o temperatura formando parte de los ligandos flexibles utilizados para la polimerización nos permite generar sistemas sensibles a determinados estímulos que puedan modificar o degradar los sistemas metalorgánicos. Estos sistemas podrían formar parte de plataformas idóneas para la liberación selectiva de fármacos, controlada por la aplicación de un estímulo externo que la desencadene.

MODO DE REALIZACION DE LA INVENCIÓN

El sistema polimérico metalorgánico de coordinación a escala micro-/nanométrica, en adelante CPP, comprende diferentes partes que se detallan a continuación:

(a) Una sal o complejo de un catión metálico que actúa como nodo de conexión de los diferentes ligandos; perteneciente al siguiente grupo: manganeso, hierro, cobalto, níquel, cobre, zinc, tecnecio, rutenio, rodio, osmio, iridio y platino, aluminio, galio, indio y plomo. También se incluyen elementos de la familia de tierras raras como gadolinio, terbio y uranio.

(b) Un ligando orgánico que actúa como conector de los centros metálicos y promueve la polimerización del sistema de coordinación; perteneciente al siguiente grupo: sistemas bi- o polifuncionales derivados de ácidos carboxílicos, grupos fosfóricos, alcoholes, tioles, aminas, catecoles y cualquier grupo funcional derivado del nitrógeno (imidazoles, piridina y bases de schiff).

(c) Un ligando quelato con elevada afinidad por el centro metálico y que presente grupos funcionales libres que no tengan afinidad por el centro metálico o dicha afinidad sea muy inferior a la parte quelatante; perteneciente a siguiente grupo: derivados substituidos de 1,2-bencenoditiol, 1,2-bencenodiol, 1,2-bencenodiamina, 2-mercaptofenol, 2-aminofenol o 2-aminobencenotiol. Los sustituyentes de los anillos aromáticos pueden estar constituidos por una cadena alquílica saturada o no saturada terminada en uno o varios grupos funcionales tales como grupos carboxílicos, alcoholes, tioles, aminas, isocianatos o isotiocianatos.

(d) Una sustancia de interés a unir covalentemente a los grupos funcionales libres presentes en la superficie de los polímeros de coordinación micro-/nanoestructurados mediante un grupo funcional complementario para la reacción de acoplamiento. A modo de ejemplo podemos citar las reacciones de acoplamiento entre un grupo carboxílico y un grupo amino mediante el uso de carbodiimidas para formar un enlace amida (EDC/NHS), entre un grupo aldehído y un grupo amina para generar una imina mediante catálisis ácida, entre un grupo cloruro de ácido y una amina para generar un enlace amida (acilación de aminas), entre un cloruro de sulfonilo y una amina para formar un enlace sulfonamida, o entre un isocianato y alcoholes, aminas o tioles para generar acoplamientos por enlaces uretano, urea o tiocarbamato, respectivamente.

Un aspecto particular de la invención lo constituye la obtención del sistema polimérico metalorgánico de la invención, en adelante procedimiento de la invención, que comprende las siguientes etapas:

(a) Una etapa de adición de los distintos elementos (sal o complejo metálico, ligandos orgánicos y sustancia de interés) en una única mezcla de reacción, la cual se mantiene en agitación desde un inicio, y que puede ser llevada a cabo por una de las formas siguientes: i) la adición de una sal o complejo de un ión metálico a una solución que contiene los ligandos orgánicos y la sustancia de interés a encapsular o viceversa. Al añadir la sal o complejo de un ion metálico dentro de la solución que contiene los ligandos orgánicos se inicia la polimerización y formación de la partícula metal-orgánica que directamente presenta grupos funcionales en la superficie (véase Ejemplo 1); ii) la adición de los ligandos orgánicos dentro de la solución que contiene la sal o complejo de un ión metálico y la sustancia de interés a encapsular o viceversa; iii)la sustancia de interés se adiciona a una solución que contiene la sal o complejo de un ión metálico y uno o varios ligandos orgánicos o viceversa; o iv)la adición de la sal o complejo de un ión metálico, ligandos orgánicos y sustancia de interés a un disolvente en donde el sistema metalorgánico resultante sea insoluble o viceversa.
(b) Preferentemente se realiza a temperatura ambiente
(c) La separación de los sistemas metalorgánicos obtenidos se realiza mediante centrifugación. La posterior redispersión se puede llevar a cabo en diferentes disolventes, en los que el material es insoluble, mediante la agitación y aplicación de ultrasonidos.

Otro aspecto de la invención lo constituye el uso de la superficie funcionalizada de las micro-/ nanopartículas de la presente invención para el anclaje, inmovilización, y almacenamiento de sustancias de interés, o para modificar las propiedades de las nanoestructuras, como por ejemplo, dotarlas de propiedades fluorescentes (véase Ejemplo 2), aumentar o disminuir su hidrofobicidad (véase Ejemplo 3), disminuir su toxicidad o aumentar la biocompatibilidad. Preferiblemente, los grupos funcionales presentes en la superficie y susceptibles de actuar como punto de anclaje de diferentes moléculas y biomoléculas se seleccionan de la lista que comprende: amino, amina primaria, amina secundaria, amina terciaria, imina, hidracina, nitro, isotiocianato, isocianato, alcohol, aldehído, grupo carboxílico, fosfina, tiol, sulfonilo compuestos organometálicos, haluro y cualquiera de sus combinaciones.

Otro aspecto de la invención lo constituye la molécula o biomolécula que se puede inmovilizar mediante enlace químico covalente por medio de una reacción de acoplamiento con los grupos funcionales presentes en la superficie de las micro-/nanopartículas. Las moléculas y biomoléculas se seleccionan de la lista de sustancias que dispongan de un grupo funcional accesible que comprende: amino, amina primaria, amina secundaria, amina

terciaria, imina, hidracina, nitro, isotiocianato, isocianato, alcohol, aldehído, grupo carboxílico, fosfina, tiol, sulfonilo compuestos organometálicos, haluro y cualquiera de sus combinaciones.

Otro aspecto particular de la invención lo constituye el uso del sistema polimérico metalorgánico en la elaboración de nanocontenedores de especies activas (véase Ejemplo 4), catalizadores, sensores, agentes de contraste, biomarcadores, semiconductores magnéticos y de dispositivos para grabación magnética.

Otro aspecto particular de la invención lo constituye un sistema metalorgánico donde el complejo de un ión metálico es $Co(CH_3OO)_2 \cdot 4H_2O$, donde el ligando orgánico que actúa de conexión entre centros metálicos es el 1,4-bis(imidazol-1-ylmetil)benceno (Bix), el ligando quelato lo constituye una mezcla en distintas proporciones del ácido cafeico (Ácido 3,4-dihidroxicinámico) que aporta el grupo -COOH libre y la dopamina (3,4-dihidroxifenetilamina) que aporta el grupo –NH2. De esta manera se obtienen nanopartículas con dos grupos funcionales distintos en la superficie (-COOH + -NH2).

Otro aspecto particular de la invención lo constituye un sistema metalorgánico donde se inmoviliza mediante un enlace covalente una molécula o biomolécula de interés donde la molécula pertenece al grupo: un fármaco, un compuesto orgánico, un compuesto fluorescente, un compuesto inorgánico, un compuesto metalorgánico o un nanomaterial (nanopartículas, nanotubos, nanohilos y nanocristales), y la biomolécula pertenece al grupo: un anticuerpo, una bacteria, un virus, una célula, una proteína, un azúcar, ADN y ARN.

Los sistemas metalorgánicos descritos en la presente invención pueden presentar diferentes tamaños en el rango de 40nm-10micras con un buen control en la dispersión de tamaños durante la síntesis.

Otro aspecto de la invención lo constituye el procedimiento de obtención del sistema metalorgánico de la invención, que comprende las siguientes etapas:

(a) una etapa de adición de los distintos elementos bajo agitación – sal o complejo de un ión metálico, ligando orgánico que actúa como conector de los centros metálicos y ligando quelato con afinidad por el centro metálico que deja un grupo funcional libre- en una única solución de reacción, y que se puede llevar a cabo de una de las formas siguientes: i) mediante la adición de una sal o complejo de un ión metálico a una solución que contiene los dos tipos de ligandos manteniéndose una relación molar 1:1:2 correspondiente a la mezcla ión metálico:ligando conector:ligando funcionalizado -al añadir la sal o complejo de un ión metálico dentro de la solución que contiene los dos tipos de ligandos orgánicos se inicia la formación de la partícula metalorgánica que generalmente es un material con baja solubilidad en el medio de reacción; ii) la adición de los dos tipos de ligandos orgánicos dentro de la solución que contiene la sal o complejo de un ión metálico.

(b) precipitación del polímero metalorgánico formado – normalmente el producto de la reacción es insoluble en el medio de reacción, pero en el caso en que el polímero formado muestre una elevada solubilidad en el medio se induce la precipitación mediante la adición de un solvente pobre (generalmente disolventes no polares como pentano, éter etílico, tolueno, hexano y benceno, o incluso agua).

(c) separación de los sistemas metalorgánicos obtenidos mediante centrifugación y varios lavados con un disolvente que no solubiliza el material nanoestructurado, pero que disuelva las impurezas o restos de reactivos de partida que puedan impurificar el

material (generalmente disolventes no polares como pentano, éter etílico, tolueno, hexano y benceno o agua).

En términos generales, el procedimiento de obtención se realiza a temperatura ambiente y manteniendo la agitación durante el proceso de polimerización. La agitación puede ser mediante agitación mecánica, magnética o por ultrasonidos.

El tamaño de los sistemas metalorgánicos se puede controlar variando las condiciones de reacción, por ejemplo, modulando las concentraciones de las soluciones (del metal y los ligandos orgánicos) iniciales. La velocidad de adición de los distintos reactivos también puede modular el tamaño de las nanopartículas, pero su efecto no es tan crítico en comparación con la variación en las concentraciones de los reactivos. Otra forma de control del tamaño está relacionada con la velocidad de agitación durante la síntesis. El tamaño característico de partícula para un sistema metalorgánico concreto bajo unas determinadas condiciones de reacción no es extrapolable a otro sistema metalorgánico diferente, ya que también es dependiente de la naturaleza del metal y ligandos utilizados. En términos generales se observa que a mayores velocidades de adición de la sal metálica sobre los ligandos o viceversa, se obtienen partículas metalorgánicas más pequeñas que cuando se hace más lentamente. En el mismo sentido, a mayor concentración de los reactivos, mayor es el tamaño de las nanoestructuras. Y un aumento en la velocidad de agitación repercute en la disminución del tamaño de las partículas.

De esta manera, dependiendo del sistema metalorgánico de la invención concreto, un experto medio en la materia y con la información suministrada en la presente invención podría diseñar fácilmente las condiciones de reacción adecuadas para obtener un tamaño de partícula idóneo.

Por su enorme versatilidad, estos sistemas metalorgánicos tienen un gran campo de aplicación dentro de la nanomedicina, ya que son sistemas con gran capacidad de carga para diferentes moléculas y biomoléculas [D. Maspoch, I. Imaz, D. Ruiz-Molina. Patent Number: P200801230 y PCT nº PCT/ES2009/070128; I. Imaz, J. Hernando, D. Ruiz-Molina, D. Maspoch Angew. Chem. Int. Ed. (2009) 48, 2325 –2329.]. Además permite diseñar sistemas con un tamaño adecuado para su aplicación en terapia y diagnosis como elementos para bioimagen y liberación controlada de fármacos [F. Novio et al. Coo*d. Chem. Rev.* ((2013), 257**,** 2839– 2847]. Dentro de esta área, la invención aquí presentada aporta unos nuevos sistemas con ventajas sustanciales respecto a los ya descritos, ya que se incrementa su funcionalidad al presentar grupos funcionales libres en su estructura para anclar en una etapa post-sintética una gran variedad de moléculas y/o biomoléculas (fármacos, vacunas, drogas, péptidos, proteínas o secuencias de ácidos nucleicos) y luego liberarlas de forma controlada en puntos específicos del cuerpo humano. La posibilidad de anclar, en la superficie de las partículas de estos polímeros inorgánicos, diferentes moléculas (ligandos, aptámeros) que reconozcan específicamente a determinadas células tiene un gran interés de cara al tratamiento terapéutico selectivo hacia células tumorales, lo que minimizaría los efectos secundarios de los actuales tratamientos anticancerígenos basados en quimio y radioterapia. A modo de ejemplo, podemos pensar en un sistema estable en medios fisiológicos basado en un polímero de coordinación fluorescente (conteniendo zinc o iones metálicos de la familia de tierras raras que emiten por encima de los 500nm), con la capacidad de encapsular uno o varios fármacos anticancerígenos, funcionalizado en la superficie con moléculas que lo dotan de biocompatibilidad (derivados de PEG) y funcionalizado a la vez con una familia de moléculas que reconocen específicamente una determinada célula cancerígena. Este sistema representa una

plataforma multifuncional que facilita su seguimiento in vitro o en el interior de organismos vivos por bioimagen, que protege y aísla los fármacos anticancerígenos hasta que llega al lugar preciso para su liberación y es capaz de reconocer una determinada célula cancerígena por la presencia en la superficie de una diana adecuada (anticuerpos, receptores, enzimas etc.).

Otro aspecto particular de la invención lo constituye la modificación de la hidrofobicidad de la superficie mediante la inclusión o anclaje de cadenas hidrofílicas o hidrofóbicas en la superficie de los polímeros de coordinación. Un caso particular (véase Ejemplo 5) lo constituye el sistema metalorgánico del ejemplo 1 funcionalizado en la superficie con: a) cadenas derivadas de polietilenglicol, que es un material altamente hidrofílico, y b) cadenas de octadecilamina, que presentan una elevada hidrofobicidad. Anclando uno u otro material en la superficie del polímero organometálico es posible controlar la hidrofilia de estos sistemas. Este control de la hidrofilia permite diseñar sistemas que se acumulen en determinados tejidos o atraviesen determinadas barreras fisiológicas dotando de una elevada potencialidad de uso de estos sistemas en el campo de la medicina.

Otro aspecto particular de la invención lo constituye la toxicidad de los sistemas generados. Los estudios de toxicidad in vitro nos indican que la toxicidad referida a dosis terapéuticas es muy baja (véase Ejemplo 6). La baja concentración de metal en relación al peso del polímero y la compatibilidad de los ligandos utilizados generan estos buenos resultados que indican la idoneidad del uso de estos sistemas en el campo de la biomedicina como elementos de terapia y diagnosis. Tanto en el caso de los polímeros de la invención conteniendo metales biocompatibles (Fe, Zn) como aquellos que contienen elementos considerados más tóxicos (Co), las pruebas de citotoxicidad in vitro muestran resultados más que remarcables para su uso dentro de la nanomedicina.

Otro aspecto particular de la invención lo constituye el uso del sistema metalorgánico, funcionalizado o no, en la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica diagnóstica o terapéutica. Y por ende, forma parte de la presente invención una composición farmacéutica que comprenda el sistema metalorgánico de la invención.

Otro aspecto particular de la invención lo constituye el uso del sistema metalorgánico, funcionalizado o no, en la elaboración de catalizadores, de sensores, agentes de contraste, biomarcadores, semiconductores magnéticos y de dispositivos para grabación magnética.

Otro aspecto particular de la invención lo constituye el uso de diferentes ligandos que se coordinen al centro metálico y otro grupo funcional que no se coordine al catión metálico. La capacidad de estos grupos funcionales libres para generar interacciones secundarias (puentes de hidrógeno; fuerzas de Van der Waals; interacciones iónicas e interacciones hidrofóbicas) determinan la mayor o menor estabilidad térmica e incluso química (véase Ejemplo 7).

Ejemplo 1: Síntesis de nanopartículas de polímeros de coordinación de hierro conteniendo grupos carboxilo en la superficie.

La metodología aquí presentada permite la obtención de nanopartículas de entre 50-200 nm. Según el método usado, el polímero metal-orgánico se obtiene por adición, a temperatura ambiente y bajo agitación magnética, de una solución (agua milli-Q; 5 ml) de Fe(CH3COO)2 (100 mg; 95% pureza, Sigma-Aldrich) sobre una solución (etanol; 25 ml) que contiene el ligando orgánico 1,4-bis(imidazol-1-ilmetil)benceno (Bix; 138 mg; sintetizado mediante el

procedimiento descrito por Dhal, (P. K. Dhal, F. H. Arnold, *Macromolecules*, 1992, 25, 7051) y el ligando comercial ácido 3,4-dihidroxicinámico (dhc; 205 mg; ≥98.0% pureza, Sigma-Aldrich). Inmediatamente, se observa la precipitación de un sólido disperso violeta oscuro, que corresponde al polímero en cuestión (Figura 1).

Las nanopartículas son separadas por centrifugación (5000 rpm; 15 minutos) y redispersados en etanol. El proceso se repite varias veces (entre 4-6 veces), dependiendo del material sintetizado, para obtener las nanopartículas lo más puras posibles y evitar la presencia de impurezas provenientes de los reactivos de partida. Normalmente la ausencia de turbidez o color en el disolvente posteriormente a la centrifugación indica un correcto lavado del material. Finalmente, el material puede ser secado al aire o mediante sistemas de vacío y las nanopartículas pueden ser conservadas en estado sólido o redispersados en diferentes disolventes o soluciones salinas como tampones fosfato.

El análisis químico, espectrometría infrarroja y las imágenes por microscopía electrónica (SEM/TEM) nos muestran una composición química y estructura correspondiente a polímeros 1D confinados en nanopartículas de entre 150-200nm en las que varios grupos carboxilo están presentes en la superficie de la nanopartícula, siendo en todos los casos fácil de determinar por un experto.

Ejemplo 2: Funcionalización con aminofluoresceina de nanopartículas de polímeros de coordinación de hierro conteniendo grupos carboxilo en la superficie.

La metodología aquí presentada permite la funcionalización de la superficie de las nanopartículas metal-orgánicas mediante un tipo de reacción de acoplamiento mediada por agentes de acoplamiento carbodiimida (EDC). Según el método usado, la funcionalización de las superficies del polímero metal-orgánico con 6-aminofluoresceina se obtiene por adición, a temperatura ambiente y bajo agitación magnética, de una solución etanólica (agua milli-Q/etanol 4:1; 5 ml) de 6-amino fluoresceína (15 mg; 95% pureza, Sigma-Aldrich) sobre una solución que contiene una dispersión de las nanopartículas sintetizadas en el Ejemplo 1 (100 mg nanopartículas; agua milli-Q/etanol 4:1; 50 ml). Pasados 10 minutos, se añade el agente de acoplamiento *N*-(3-Dimetilaminopropil)-*N*′-etilcarbodiimida (EDC) (30mg; ≥99.0% pureza, Sigma-Aldrich) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS)(17.25 mg; 98% pureza, Sigma-Aldrich). Se mantiene la agitación durante 6 horas y posteriormente se precipitan por centrifugación las nanopartículas funcionalizadas (5000 rpm; 15 minutos). Se realizan diferentes lavados con etanol, hasta que no se detecten rastros de fluorescencia en la solución, lo que nos indica que no quedan restos de la especie fluorescente libre.

Finalmente, el material puede ser secado al aire o mediante sistemas de vacío y las nanopartículas pueden ser conservadas en estado sólido o redispersados en diferentes disolventes o soluciones salinas como tampones fosfato. La caracterización mediante análisis químico, medidas de absorbancia, espectroscopia infrarroja, microscopía óptica y fluorescencia corroboran el acoplamiento de la molécula fluorescente en la superficie de la nanopartícula mediante enlace covalente (amida). Las partículas presentan fluorescencia tanto en estado sólido como en una solución coloidal (figura 2).

Ejemplo 3: Acoplamiento de derivados de PEG en el sistema metalorgánico de la invención

La metodología aquí presentada permite la funcionalización de la superficie de las nanopartículas metal-orgánicas con cadenas hidrofílicas derivadas del PEG que dotan a las

nanopartículas de mayor hidrofilia, biocompatibilidad y baja toxicidad. Partiendo de las nanopartículas sintetizadas en el Ejemplo 1, la fijación mediante enlace covalente de un polímero PEG funcionalizado en un extremo con un grupo amina se produce la generación de un enlace peptídico mediado por los agentes de acoplamiento (EDC/NHS) del mismo modo que en el ejemplo anterior. La funcionalización de la superficie externa de dichos sistemas se realiza por adición, a temperatura ambiente y bajo agitación, de una solución (tampón fosfato 50mM, pH7.4; 5 ml) conteniendo 30 mg de O-(2-aminoetil) polietilenglicol 3.000 sobre una solución conteniendo una dispersión de las nanopartículas sintetizadas en el Ejemplo 1 (100 mg nanopartículas; tampón fosfato 50mM, pH7.4; 25 ml). Pasados 10 minutos, se añade el agente de acoplamiento *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC) (60mg; ≥99.0% pureza, Sigma-Aldrich) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS)(34.5 mg; 98% pureza, Sigma-Aldrich). Se mantiene la agitación durante 6 horas y posteriormente se precipitan por centrifugación las nanopartículas funcionalizadas (5000 rpm; 15 minutos). Se realizan diferentes lavados con etanol (un mínimo de cuatro veces). Finalmente, los sistemas separados, limpios y secos bajo vacío pueden ser conservados en estado sólido o redispersados en diferentes solventes.

La caracterización mediante análisis químico, medidas de absorbancia, espectroscopia infrarroja y microscopía óptica corroboran el acoplamiento de las cadenas de PEG en la superficie de la nanopartícula mediante enlace covalente amida (Figura 3). Las partículas presentan una mejora notable de su estabilidad coloidal en soluciones acuosas.

Ejemplo 4: Acoplamiento de cadenas hidrofóbicas en el sistema metalorgánico de la invención

Se utiliza como cadena hidrofóbica la octadecilamina, una cadena hidrocarbonada con una función amino en uno de sus extremos que constituye el punto de unión con los grupos carboxílicos de las nanopartículas sintetizadas en el ejemplo 1.

La formación del enlace covalente imino se produce mediante el procedimiento descrito en los ejemplos 2 y 3 mediante los agentes de acoplamiento EDC/NHS en medio etanólico. Se adiciona, a temperatura ambiente y bajo agitación, una solución etanólica de octadecilamina (ODA) (25 mg ODA; etanol/agua miliQ 4:1, 5 ml) sobre una solución conteniendo una dispersión de las nanopartículas sintetizadas en el Ejemplo 1 (100 mg nanopartículas; etanol/agua miliQ 4:1, 25 ml). Pasados 10 minutos, se añade el agente de acoplamiento *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*- etilcarbodiimida (EDC) (60mg; ≥99.0% pureza, Sigma-Aldrich) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS)(34.5 mg; 98% pureza, Sigma-Aldrich). Se mantiene la agitación durante 6 horas y posteriormente se precipitan por centrifugación las nanopartículas funcionalizadas (5000 rpm; 15 minutos). Se realizan diferentes lavados con etanol (un mínimo de cuatro veces). Finalmente, los sistemas separados, limpios y secos bajo vacío pueden ser conservados en estado sólido (figura 4).

Ejemplo 5: Encapsulación de fármacos con sistemas metal-orgánicos de la invención

Se utiliza el mismo procedimiento que para obtener las nanopartículas descritas en el ejemplo 1. Como adición, se incluye una concentración de un fármaco (e.g. camptotecina-CPT) en una concentración ([CPT] = 3.0 x 10-3 M) en la solución etanólica de los ligandos. Las nanopartículas resultantes fueron purificadas mediante centrifugación y lavadas varias veces con etanol. Este proceso se repite hasta que no se detectan especies fluorescentes en solución mediante medidas fluorimétricas. Imágenes de SEM y EM revelan la formación

de nanopartículas con un tamaño medio de 112±19 nm y una eficiencia de encapsulación del 15% en peso de la nanopartícula (Figura 5).

Ejemplo 6: Estudios de toxicidad

Para evaluar el efecto de la toxicidad de las nanopartículas metal-orgánicas libres y conteniendo un fármaco antitumoral se realizaron diferentes pruebas in vitro para evaluar el índice IC50. Para este cálculo se incubaron células MCF-7 con diferentes concentraciones de nanopartículas conteniendo un marcador fluorescente en la superficie como las obtenidas en el ejemplo 2. La cuantificación de las nanopartículas que son capaces de introducirse en las células se realizó mediante medidas espectrofluorimétricas y se observó una internalización mayor del 30%. La toxicidad de las nanopartículas metal-orgánicas es sorprendentemente baja. Además se observó un incremento notable (más de 6 veces) de la actividad tumoral del fármaco encapsulado respecto al fármaco libre (Figura 6).

Ejemplo 7: Estudios de estabilidad térmica comparando dos sistemas de nanopartículas conteniendo diferentes ligandos con grupos funcionales libres que generan diferentes interacciones secundarias.

Se comparó la estabilidad térmica del sistema sintetizado en el Ejemplo 1 con otro análogo, en el que se sustituyó el ligando comercial ácido 3,4- hidroxicinámico (*dhc*) por cantidades equimolares del ligando comercial 3,4-di(tert-butil) catecol (*dtbucat*). La síntesis, aislamiento y caracterización del material es análoga. El tamaño de las partículas conteniendo el *dtbucat* está en el mismo rango que las que contienen *dhc.*

El seguimiento por microscopía electrónica (SEM) y termogravimetría (TGA/DSC) muestra que las partículas sintetizadas en el ejemplo 1 comienzan a fundirse a 105 ºC y descomponerse sobre 220 ºC, debido a la estabilidad térmica conferida por los numerosos enlaces de hidrógeno generados por los grupos carboxílico dentro de la partícula. El reemplazo de los ligandos *dhc* por *dtbucat* induce un decrecimiento bastante notable del punto de fusión que baja a cerca de los 60 ºC. (Figura 7).

REIVINDICACIONES

1.- Sistema polimérico metaloorgánico de coordinación a escala micro-/nanométrica útil para encapsular y unir covalentemente diferentes sustancias en su superficie que comprende:
(a) una sal o complejo de un ion metálico de la serie de transición o de la familia de las tierras raras, seleccionado de la lista que comprende zinc, cobre, hierro, cadmio, manganeso, níquel, cobalto, gadolinio, europio, terbio, uranio, aluminio o galio que constituyen los centros metálicos del sistema polimérico metaloorgánico.
(b) al menos, un ligando orgánico que actúa como conector entre centros metálicos;
(c) al menos un ligando orgánico funcional quelato con afinidad por el centro metálico y que presenta un grupo funcional libre que no coordina al centro.
(d) una sustancia de interés a encapsular, seleccionadas del grupo que comprende: una entidad biológica, un fármaco, una vacuna, un agente de contraste de diagnóstico, un marcador, un compuesto orgánico, un compuesto inorgánico, un compuesto metalorgánico o un nanomaterial.

2.- Sistema polimérico metaloorgánico según la reivindicación 1, caracterizado porque el ion metálico proviene del compuesto $Co(CH_3OO)_2 \cdot 4H_2O$.

3.- Sistema polimérico metaloorgánico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado porque el ligando orgánico que actúa como conector entre centros metálicos es un compuesto orgánico con al menos un grupo funcional, que se selecciona de la lista que comprende ácidos carboxílicos, grupos fosfóricos, alcoholes, tioles, aminas, catecoles y cualquier grupo funcional derivado del nitrógeno, particularmente imidazoles, piridina y bases de Schiff.

4.- Sistema polimérico metaloorgánico según la reivindicación 3, caracterizado porque el ligando orgánico que actúa como conector entre centros metálicos es el 1,4-bis(imidazol-1-ilmetil) benceno (Bix).

5.- Sistema polimérico metaloorgánico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la sustancia de interés a encapsular es una entidad con actividad biológica seleccionada de una lista que comprende una bacteria, un virus, una célula eucariota, una proteína, un anticuerpo, azúcares, ADN, RNA o un fármaco.

6.- Sistema polimérico metaloorgánico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la sustancia de interés a encapsular es un nanomaterial seleccionado de una lista que comprende nanopartículas, nanotubos, nanohilos, nanocristales o nanodispositivos.

7.- Sistema polimérico metaloorgánico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el ligando orgánico funcional es un compuesto orgánico quelato con al menos un grupo funcional libre, donde el grupo funcional se selecciona de la lista que comprende ácidos carboxílicos, alcoholes, tioles, aminas, tiocianatos, isocianatos, isotiocianatos, catecoles y cualquier grupo funcional derivado del nitrógeno.

8.- Sistema polimérico metalorgánico según la reivindicación 7, caracterizado porque las interacciones secundarias no covalentes desarrolladas por los grupos funcionales libres en el ligando orgánico quelato modulan la estabilidad térmica de las nanopartículas.

9.- Sistema polimérico metalorgánico según la reivindicación 8, caracterizado porque las interacciones secundarias no covalentes son puentes de hidrógeno, fuerzas de Van de Waals, interacciones iónicas o interacciones hidrofóbicas.

10.- Sistema polimérico metaloorgánico según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, caracterizado porque el compuesto orgánico quelato lo constituye una mezcla en proporciones, respecto a las cantidades estequiométricas, comprendidas entre 75% y 25% de ácido 3,4-dihidroxicinámico que aporta el grupo -COOH libre, y entre el 25% y 75% de dopamina (3,4-dihidroxifenetilamina) que aporta el grupo –NH2.

11.- Sistema polimérico metalorgánico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque presenta un tamaño comprendido entre 40 nm y 10 µm.

12.- Sistema polimérico metalorgánico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque se encuentra funcionalizado en su superficie exterior con otra especie o sustancia.

13.- Sistema polimérico metaloorgánico según la reivindicación 12, caracterizado porque la especie o sustancia se selecciona de una lista que comprende un anticuerpo, una bacteria, un virus, una célula, una proteína, un azúcar, ADN, un fármaco, una droga, un compuesto orgánico, un compuesto fluorescente, un compuesto inorgánico, un compuesto metaloorgánico o un nanomaterial.

14.- Sistema polimérico metaloorgánico según las reivindicaciones 12 y 13, caracterizado porque la funcionalización se realiza por reacciones de acoplamiento entre un grupo carboxílico y un grupo amino mediante el uso de carbodiimidas para formar un enlace amida (EDC/NHS).

15.- Sistema polimérico metaloorgánico según las reivindicaciones 12 y 13, caracterizado porque la funcionalización se realiza por una reacción de acilación de aminas entre un grupo cloruro de ácido y una amina para generar un enlace amida.

16.- Sistema polimérico metaloorgánico según las reivindicaciones 12 y 13, caracterizado porque la funcionalización se realiza por reacción entre un cloruro de sulfonilo y una amina para formar un enlace sulfonamida.

17.- Sistema polimérico metaloorgánico según las reivindicaciones 12 y 13, caracterizado porque la funcionalización se realiza por reacción entre un isocianato y alcoholes para generar un acoplamiento por enlace uretano.

18.- Sistema polimérico metalorgánico según las reivindicaciones 12 y 13, caracterizado porque la funcionalización se realiza por reacción entre un isocianato y aminas para generar un acoplamiento por enlace urea.

19.- Sistema polimérico metaloorgánico según las reivindicaciones 12 y 13, caracterizado porque la funcionalización se realiza por reacción entre un isocianato y tioles para generar un acoplamiento por enlace tiocarbamato.

20.- Procedimiento de obtención del sistema polimérico metaloorgánico como se define en las reivindicaciones 1 a 19, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

a) una etapa de adición de la sal o complejo de un ion metálico, del ligando orgánico que actúa como conector de los centros metálicos y del ligando quelato con afinidad por el centro metálico que deja un grupo funcional libre, a una única solución de reacción, la cual se encuentra en agitación;
b) precipitación del sistema polimérico metaloorgánico formado;
c) separación de los sistemas poliméricos metalorgánicos

21.- Procedimiento según la reivindicación 20, caracterizado porque la etapa de adición se lleva a cabo mediante la adición de la sal o complejo de ion metálico a una solución que contiene los dos tipos de ligandos manteniéndose una relación molar 1:1:2 correspondiente a la mezcla ion metálico: ligando conector: ligando funcionalizado iniciándose la formación del sistema polimérico metalorgánico

22.- Procedimiento según la reivindicación 20, caracterizado porque la etapa de adición se lleva a cabo mediante la adición de los dos tipos de ligandos orgánicos dentro de la solución que contiene la sal o complejo de un ión metálico.

23.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, caracterizado porque la agitación es mecánica, magnética o mediante ultrasonidos a temperatura ambiente.

24.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, caracterizado porque el material formado tras la etapa de adición presenta
baja solubilidad en el medio de reacción.

25.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23 caracterizado porque en el caso en que el material formado tras la etapa de adición muestre una elevada solubilidad en el medio de reacción, se induce la precipitación mediante la adición de un solvente que se selecciona entre disolventes no polares como pentano, éter etílico, tolueno, hexano y benceno, o agua.

26.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 25, caracterizado porque la separación de los sistemas metaloorgánicos obtenidos se realiza mediante centrifugación y lavados con un disolvente que no solubilice el material, pero que disuelva las impurezas o restos de reactivos de partida que puedan impurificar el material, almacenándose el material metalorgánico como sólido o en una suspensión coloidal.

27.- Uso del sistema polimérico metaloorgánico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 para la liberación y/o protección y/o almacenamiento y/o variación de las propiedades de las sustancias de interés encapsuladas.

28.- Uso del sistema polimérico metaloorgánico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 para la elaboración de catalizadores, sensores, agentes de contraste, biomarcadores, semiconductores magnéticos o dispositivos para grabación magnética.

29.- Uso del sistema metalorgánico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 19 para la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica, diagnóstica o terapéutica.

30.- Composición farmacéutica, diagnóstica o terapéutica caracterizada porque comprende el sistema polimérico metalorgánico según las reivindicaciones 1 a 19.

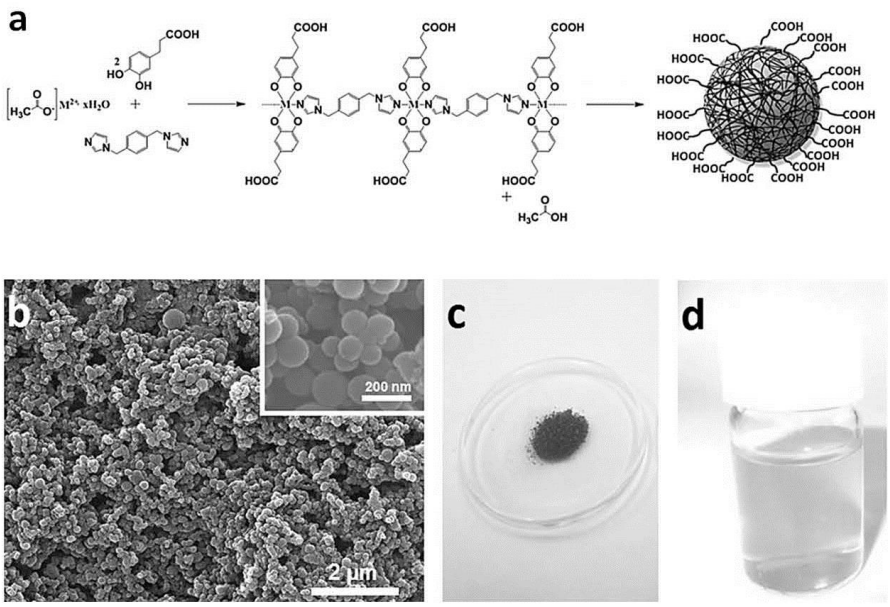

FIG. 1

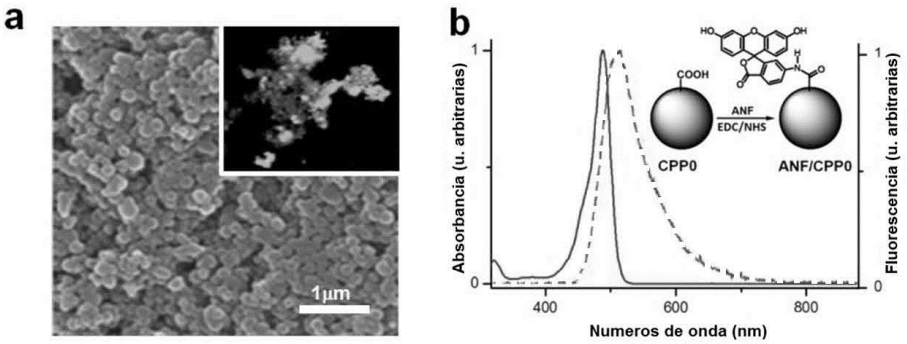
a
1µm
b
Absorbancia (u. arbitrarias)
Fluorescencia (u. arbitrarias)
Numeros de onda (nm)
400
600
800
COOH
ANF
EDC/NHS
CPP0
ANF/CPP0

FIG. 2

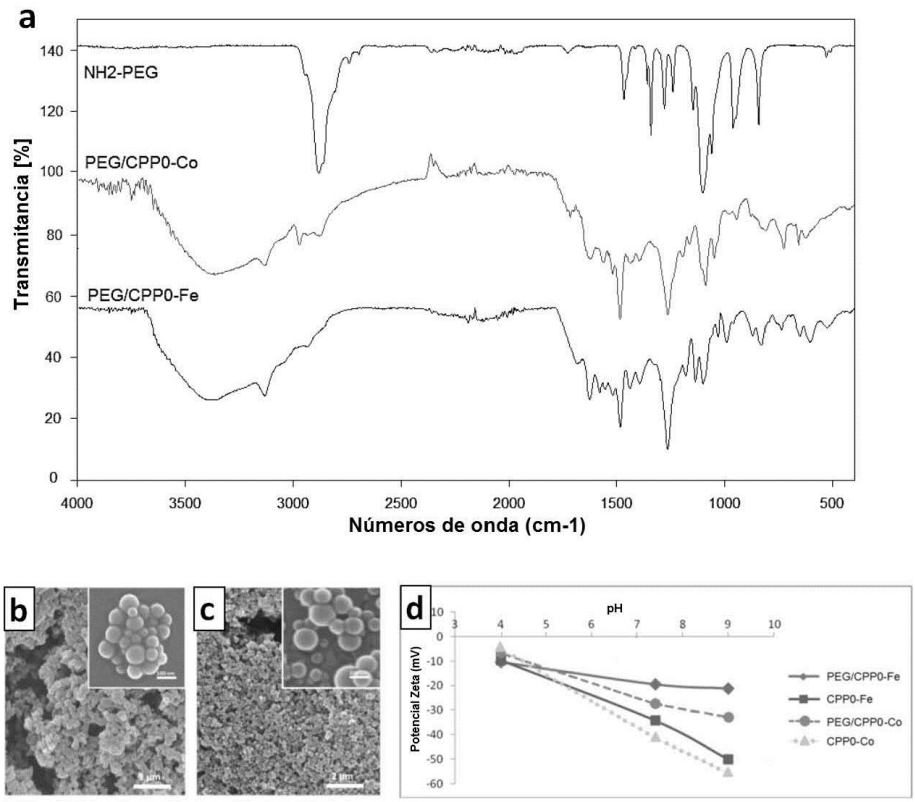
a
NH2-PEG
PEG/CPP0-Co
PEG/CPP0-Fe
Transmitancia [%]
Números de onda (cm-1)
b
c
d
pH
Potencial Zeta (mV)
PEG/CPP0-Fe
CPP0-Fe
PEG/CPP0-Co
CPP0-Co

FIG. 3

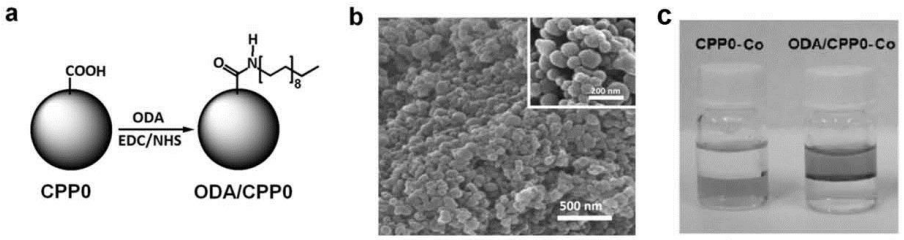
a
COOH
ODA
EDC/NHS
CPP0
ODA/CPP0
b
200 nm
500 nm
c
CPP0-Co
ODA/CPP0-Co

FIG. 4

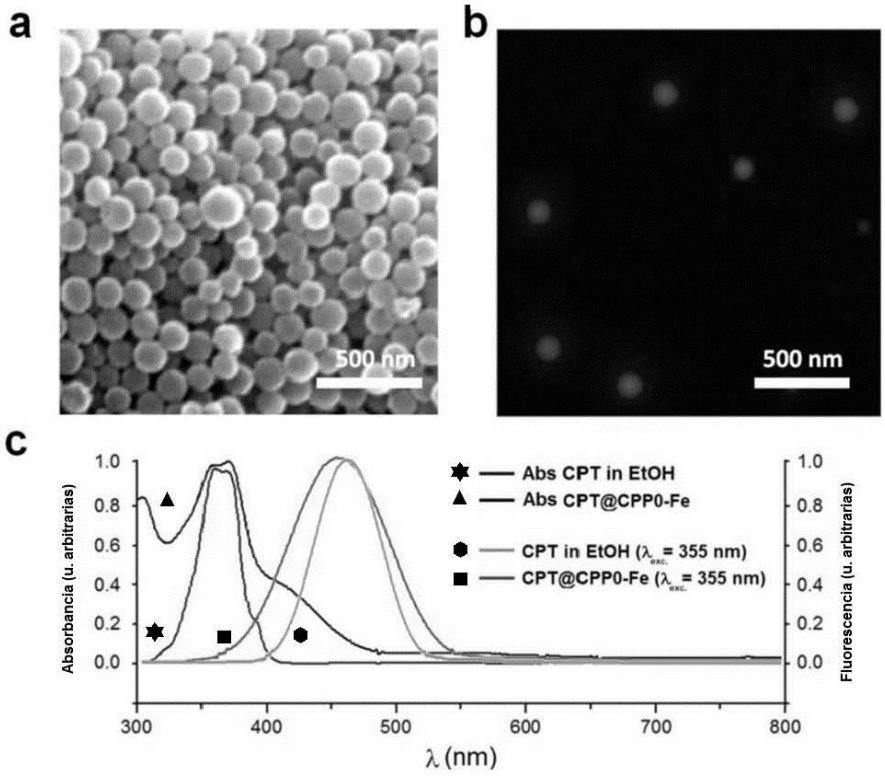
a
500 nm
b
500 nm
c
Absorbancia (u. arbitrarias)
Fluorescencia (u. arbitrarias)
Abs CPT in EtOH
Abs CPT@CPP0-Fe
CPT in EtOH (λexc. = 355 nm)
CPT@CPP0-Fe (λexc. = 355 nm)
λ (nm)

FIG. 5

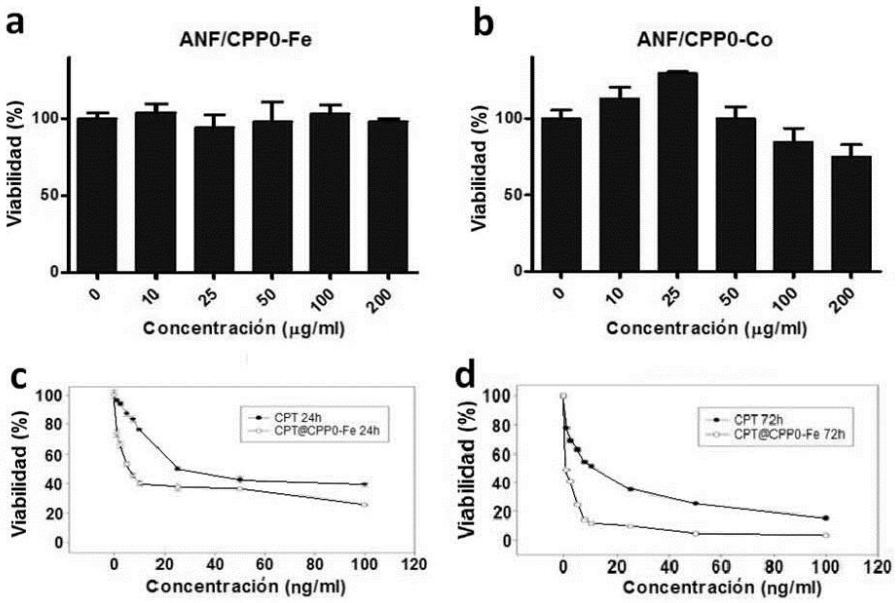
a
ANF/CPP0-Fe
Viabilidad (%)
100
50
0
0
10
25
50
100
200
Concentración (µg/ml)
b
ANF/CPP0-Co
Viabilidad (%)
100
50
0
0
10
25
50
100
200
Concentración (µg/ml)
c
Viabilidad (%)
100
80
60
40
20
0
CPT 24h
CPT@CPP0-Fe 24h
0
20
40
60
80
100
120
Concentración (ng/ml)
d
Viabilidad (%)
100
80
60
40
20
0
CPT 72h
CPT@CPP0-Fe 72h
0
20
40
60
80
100
120
Concentración (ng/ml)

FIG. 6

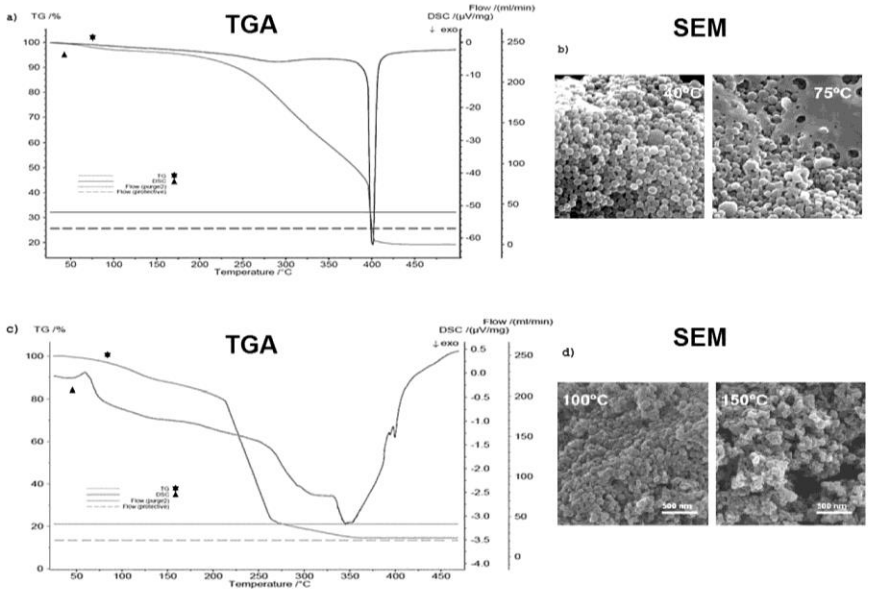
a)
TG /%
TGA
DSC /(µV/mg)
Flow /(ml/min)
↓ exo
Temperature /°C
b)
SEM
40°C
75°C
c)
TG /%
TGA
DSC /(µV/mg)
Flow /(ml/min)
↓ exo
Temperature /°C
d)
SEM
100°C
150°C

FIG. 7