

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 172**

21 Número de solicitud: 201031944

51 Int. Cl.:

B82Y 40/00 (2011.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

24.12.2010

43 Fecha de publicación de la solicitud:

19.07.2012

Fecha de la concesión:

13.05.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

24.05.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE GRANADA (100.0%)
Hospital Real, Cuesta del Hospicio s/n
18071 Granada (Granada) ES**

72 Inventor/es:

**FERNANDEZ SANCHEZ, Jorge Fernando;
FERNANDEZ GUTIERREZ, Alberto;
SANTOYO GONZALEZ, Francisco;
MEDINA CASTILLO, Antonio Luis;
MORALES SANFRUTOS, Julia y
MEGIA FERNANDEZ, Alicia**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **COMPUESTOS POLIMÉRICOS CON PROPIEDADES INMOVILIZANTES**

57 Resumen:

Compuestos poliméricos con propiedades inmovilizantes.

La presente invención se refiere a compuestos poliméricos con propiedades inmovilizantes sobre biomoléculas. Dichos materiales comprenden un núcleo de nanopartículas híbridas súper-paramagnéticas y grupos vinilsulfona para llevar a cabo la inmovilización de las biomoléculas. Además la presente invención se refiere a un procedimiento de síntesis de dichos compuestos poliméricos.

ES 2 385 172 B1

DESCRIPCIÓN

Compuestos poliméricos con propiedades inmovilizantes.

5 La presente invención se refiere a compuestos poliméricos con propiedades inmovilizantes sobre biomoléculas. Dichos materiales comprenden un núcleo de nanopartículas híbridas súper-paramagnéticas y grupos vinilsulfona para llevar a cabo la inmovilización de las biomoléculas. Además la presente invención se refiere a un procedimiento de síntesis de dichos compuestos poliméricos.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

10 Las nano-partículas súper-magnéticas están generalmente compuestas por elementos magnéticos, tales como, hierro, níquel, cobalto y sus óxidos. Las nanopartículas magnéticas más conocidas son óxidos de hierro, magnetita (Fe_3O_4), magemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) u otras ferritas, que son insolubles en agua. Nano-partículas magnéticas sin agentes de recubrimiento de su superficie poseen una superficie hidrofóbica con alta superficie específica y una elevada tendencia a aglomerarse. El adecuado recubrimiento de la superficie de las nano-partículas magnéticas permite que se puedan dispersar y formar ferrofluidos homogéneos y aumentar su estabilidad. Diferentes materiales se han empleado para recubrir la superficie de nanopartículas magnéticas: (a) polímeros orgánicos, tales como, dextrano, 15 quitosano, polietilenglicol, etc, (b) surfactantes orgánicos, tales como, oleato sódico, dodecilamina, (c) metales inorgánicos, tales como, oro, (d) óxidos inorgánicos, tal como sílice, (e) moléculas bioactivas, tales como, liposomas, péptidos y ligandos. Las nano-partículas magnéticas recubiertas de un polímero orgánico constituyen un material macromolecular avanzado que posee las propiedades de ambos materiales: el uso de un material inorgánico magnético le confiere a las nanopartículas poliméricas propiedades súper-paramagnéticas que permiten su rápida 20 separación del medio de reacción mediante el uso de un campo magnético, el polímero orgánico permite su dispersión y aumenta su estabilidad.

En los últimos años ha habido un gran interés en el diseño y fabricación de partículas híbridas magnéticas. Estas partículas, por regla general, tienen una estructura de tipo "core-shell" donde el corazón (core) consiste en una o varias nanopartículas magnéticas, mientras que la cubierta (shell) es un polímero entrecruzado.

25 A este tipo de nanopartículas se les ha dado muy diversas aplicaciones que van desde sistemas de almacenaje de información, desarrollo de dispositivos electrónicos o de interferencia electromagnética (EMI), hasta sistemas de diagnóstico médico, biosensores ópticos (Svitel, J.; Surugiu, I.; Dzegoev, A.; Ramanathan, K.; Danielsson, B., *Functionalized surfaces for optical biosensors: Applications to in vitro pesticide residual analysis. Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 2001, 12, (10-12), 1075-1078) y liberación controlada de fármacos (Berry, C. C.; Curtis, A. S. G., *Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. Journal of Physics D-Applied Physics* 2003, 36, (13), R198-R206; Cheng, H.; Kastrup, C. J.; Ramanathan, R.; Siegwart, D. J.; Ma, M. L.; Bogatyrev, S. R.; Xu, Q. B.; Whitehead, K. A.; Langer, R.; Anderson, D. G., *Nanoparticulate Cellular Patches for Cell-Mediated Tumortropic Delivery. Acs Nano* 2010, 4, (2), 625-631) Además, también se están empezando a usar en la toma de imágenes de resonancia magnética debido al alto contraste que ofrecen y en nuevos tratamientos 35 terapéuticos contra el cáncer mediante el aumento térmico de estas nanopartículas cuando son expuestas a campos magnéticos fuertes (Ji, X. J.; Shao, R. P.; Elliott, A. M.; Stafford, R. J.; Esparza-Coss, E.; Bankson, J. A.; Liang, G.; Luo, Z. P.; Park, K.; Markert, J. T.; Li, C., *Bifunctional gold nanoshells with a superparamagnetic iron oxide-silica core suitable for both MR imaging and photothermal therapy. Journal of Physical Chemistry C* 2007, 111, (17), 6245-6251; Kim, D. H.; Nikles, D. E.; Johnson, D. T.; Brazel, C. S., *Heat generation of aqueously dispersed CoFe₂O₄ nanoparticles as heating agents for magnetically activated drug delivery and hyperthermia. Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2008, 320, (19), 2390-2396).

45 Actualmente, se están haciendo grandes esfuerzos en la funcionalización química y/o bioquímica de las superficies de estas nanopartículas híbridas súper-paramagnéticas ("super paramagnetic hybrid nanoparticles"; SP-HNPs). Así, la inmovilización de biomoléculas en su superficie está suponiendo un gran avance en la inclusión de diferentes funcionalidades, proporcionando sistemas más versátiles que el uso de estas biomoléculas libres (Jin, X.; Li, J. F.; Huang, P. Y.; Dong, X. Y.; Guo, L. L.; Yang, L.; Cao, Y. C.; Wei, F.; Zhao, Y. D.; Chen, H., *Immobilized protease on the magnetic nanoparticles used for the hydrolysis of rapeseed meals. Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2010, 322, (14), 2031-2037; Sheldon, R., *Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. Advanced Synthesis & Catalysis* 2007, 349, (8-9), 1289-1307).

50 La funcionalización de la superficie de las SP-HNPs con biomoléculas se puede llevar a cabo por diversos mecanismos: adsorción-entrecruzamiento, encapsulación, interacciones iónicas o uniones covalentes. No obstante, es bien conocido que la unión por interacciones de tipo iónico depende en gran medida del medio de reacción (pH y fuerza iónica) y, en la mayoría de los casos, llevan asociados una modificación de las propiedades características de la biomolécula tras su inmovilización.

55 La forma más simple de producir SP-HNPs consiste en la encapsulación de nanopartículas magnéticas de carácter lipófilo en una matriz polimérica. Existen gran variedad de nanopartículas magnéticas lipofílicas que se pueden usar, no obstante, las nanopartículas de magnetita recubiertas con ácido oleico ($\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4\text{-OA}$) son las que más se usan ya que con un protocolo sencillo y barato se obtienen nanopartículas (entre 10 y 20 nm) súper-paramagnéticas,

monodispersas y biocompatibles (Chorny, M.; Hood, E.; Levy, R. J.; Muzykantov, V. R., *Endothelial delivery of antioxidant enzymes loaded into non-polymeric magnetic nanoparticles. Journal of Controlled Release* 2010, 146, (1), 144-151; Sun, J.; Zhou, S.; Hou, P.; Yang, Y.; Weng, J.; Li, X.; Li, M., *Synthesis and characterization of biocompatible Fe₃O₄ nanoparticles. Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2007, 80A, (2), 333-341).

- 5 El encapsulamiento de γ -Fe₃O₄-OA en una matriz polimérica se puede llevar a cabo mediante precipitación-
evaporación, miniemulsión-evaporación, polimerización por precipitación, polimerización por miniemulsión o
polimerización por emulsión (Medina-Castillo, A. L.; Mistlberger, G.; Fernandez-Sanchez, J. F.; Segura-Carretero, A.;
Klimant, I.; Fernandez-Gutierrez, A., *Novel Strategy To Design Magnetic, Molecular Imprinted Polymers with Well-
Controlled Structure for the Application in Optical Sensors. Macromolecules* 2010, 43, (1), 55-61); Gong, T.; Yang,
10 D.; Hu, J. H.; Yang, W. L.; Wang, C. C.; Lu, J. Q., *Preparation of monodispersed hybrid nanospheres with high
magnetite content from uniform Fe₃O₄ clusters. Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*
2009, 339, (1-3), 232-239), pero en todos los casos una adecuada selección de la matriz polimérica a usar en la
encapsulación es crucial para la obtención de adecuadas SP-HNPs. La matriz polimérica define la química de la
15 superficie de la partícula y debe permitir la inmovilización y/o co-inmovilización ulterior de biomoléculas y otros
compuestos, también es responsable de la forma en la que la magnetita queda encapsulada.

Por lo tanto se hace necesario encontrar o desarrollar nuevos compuestos que solventen todos los problemas
anteriormente enunciados y que además su procedimiento de obtención permita obtener encapsulaciones elevadas
y homogéneas.

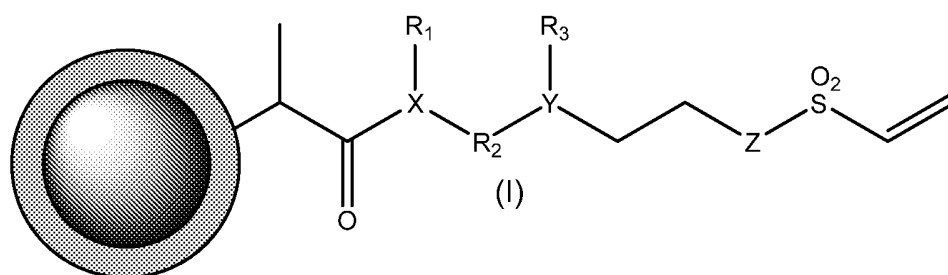
DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

- 20 La presente invención describe nuevos compuestos poliméricos de naturaleza súper-paramagnética que mejora lo
ya existente y solventa los problemas técnicos de los desarrollos actuales. Mediante estos nuevos compuestos, se
proporciona una técnica de inmovilización que no requiere ninguna estrategia de activación y que combina las
propiedades de las SP-HNPs como soporte con la reactividad de la función vinilsulfona con grupos presentes de
25 forma natural en las biomoléculas (amino y tioles) en condiciones de reacción suaves compatibles con su naturaleza
biológica.

El uso de las SP-HNPs como material para soportar grupos vinilsulfona supone una serie de importantes ventajas
tales como la posibilidad de usar campos magnéticos externos para recolectar las partículas y permitir su
reutilización, para implementarlas en dispositivos portátiles de medida como por ejemplo el extremo de una fibra
óptica o en un microchip, para conducir las y depositarlas en lugares poco accesibles, etc...

- 30 Además en la presente invención se han elegido y utilizado monómeros que, tras su polimerización en presencia de
un ferrofluido de partículas magnéticas, permiten una fácil funcionalización (o derivatización) de las mismas
haciendo factible la posterior inmovilización covalente de biomoléculas en su superficie, manteniendo las
propiedades magnéticas de dichas partículas.

Por lo tanto un primer aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I):



35

donde:

X se selecciona entre un átomo de oxígeno o uno de nitrógeno, de tal manera que cuando X es O, el grupo R₁ no
existe.

- 40 R₁ se selecciona entre H, un radical sustituido o no sustituido, seleccionado del grupo formado por un grupo alquilo
C₁-C₂₀, lineal o ramificado, alcoxilalquilo o polietilenglicol.

Según una realización preferida R₁ es un átomo de H.

R₂ es un radical sustituido o no sustituido, seleccionado del grupo formado por un radical alquilo -(CH₂)_n, un radical
dialquilarilo (C₁-C₁₀)Ar(C₁-C₁₀) ó un radical -(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂; donde n toma valores de 2 a 20.

- 45 Según una realización preferida R₂ es un radical -(CH₂)_n donde n toma valores de entre 2 a 10. De manera más
preferida, n toma valores de 2 a 5. Aún más preferiblemente n toma el valor de 2.

Y se selecciona entre un átomo de oxígeno, de azufre o de nitrógeno de tal manera que cuando Y es O ó S, el grupo R_3 no existe.

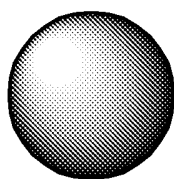
R_3 es un radical sustituido o no sustituido, seleccionado del grupo formado por un radical alquilo C_1-C_{20} lineal o ramificado, un resto de polietilenglicol, un resto de hidroxialquilo o un resto de alcoxialquilo.

5 Según una realización preferida, R_3 es un grupo CH_2CH_2OH .

Z puede existir o no y si existe es un grupo $-SO_2R_4-$,

R_4 puede o no existir, pero si existe es un radical sustituido o no sustituido, seleccionado del grupo formado por un radical alquilo C_1-C_{10} , un radical dialquilarilo $(C_1-C_{10})Ar(C_1-C_{10})$ ó un radical $(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2$; donde n toma valores de 2 a 20.

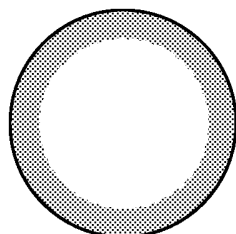
10 Según una realización preferida, R_4 es un grupo $(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2$ donde n toma valores de entre 2 a 10. De manera más preferida n toma valores de 2 a 5.



15 representa materiales tanto orgánicos (materiales poliméricos) como inorgánicos (partículas de óxidos metálicos con o sin propiedades magnéticas, nanocristales semiconductores (quantum dots), nanopartículas de plata, nanopartículas de oro), e híbridos formados por la combinación de los anteriores.

De manera preferida, los materiales orgánicos son partículas poliméricas del tipo poliacrilato, polimetacrilato, poliuretano, poliestireno, policarbonato, poliacetato, polivinilo, lineales o con diferente grado de entrecruzamiento.

20 Como materiales inorgánicos sin propiedades magnéticas partículas de óxido de silicio y óxido de titanio, y como materiales inorgánicos magnéticos ferritas súper-paramagnéticas MFe_2O_4 donde M se selecciona entre Zn, Mg, Mn, Ni, Co y Fe.



25 representa el polímero resultante de la polimerización de un monómero acrililo junto con un entrecruzador seleccionado del grupo formado por pentaeritritol triacrilato (PETRA), trimetilpropano trimetacrilato (TRIM), divinilbenceno (DVB), N,N'-metilendiácridamida, N,N'-1,4-fenilén diácridamida, etilén glicol dimetacrilato (EDMA) o 3,5-bis(acrililoil piperacina), preferiblemente EDMA.

Según otra realización preferida, X es un átomo de oxígeno, R_2 es un grupo $(CH_2)_n$, n es 2, Y es un átomo de nitrógeno, R_3 es un grupo $-CH_2-CH_2OH$ y Z no existe.

30 Por "alquilo" se entiende en la presente invención a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, saturadas o insaturadas que tienen de 1 a 20 átomos de carbonos. Los radicales alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como arilo, halógeno, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, acilo, alcoxicarbonilo, nitro, etc..., preferiblemente el alquilo está sustituido por un grupo hidroxilo (hidroxialquilo).

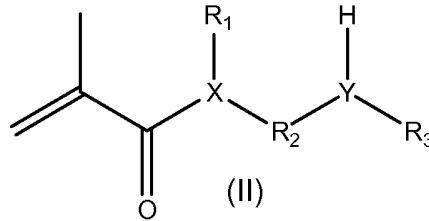
Por "Ar", se entiende en la presente invención a un grupo arilo.

35 Por "dialquilarilo" se entiende en la presente invención a un grupo arilo que está sustituido con dos grupos alquilo que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, más preferiblemente tienen de 1 a 5 átomos de carbono. Los grupos alquilo pueden ser iguales o diferentes, preferiblemente son iguales. Y por "arilo" se entiende en la presente invención a una cadena carbocíclica aromática, que tienen de 6 a 12 átomos de carbono, pueden ser de anillo único ó múltiple, separado y/o condensado. Los grupos arilo típicos contiene de 1 a 3 anillos separados o condensados y desde 6 hasta 10 aproximadamente 18 átomos de carbono de anillo, tales como radicales fenilo, naftilo, indenilo, fenantrilo o antracilo.

El término "alcoxilo" se refiere en la presente invención a un grupo de fórmula -ORa en la que Ra es un alquilo (C1-C8), por ejemplo, pero sin limitarse a metoxilo, etoxilo o propoxilo.

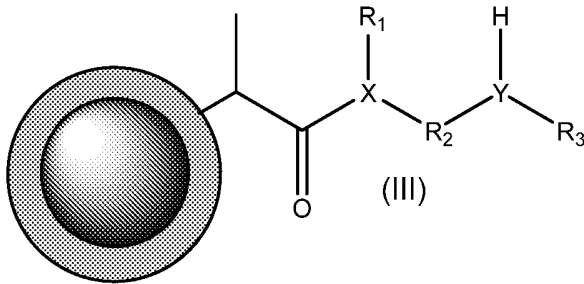
Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de síntesis del compuesto de fórmula general (I), que comprende las siguientes etapas:

- 5 a. adición de una miniemulsión de nanopartículas súper-paramagnéticas a una mezcla polimérica que comprende un monómero de fórmula general (II) y un agente entrecruzante;



donde X, R₁, R₂, Y y R₃ se describen como anteriormente;

- b. reacción del compuesto obtenido en la etapa a) de fórmula general (III)

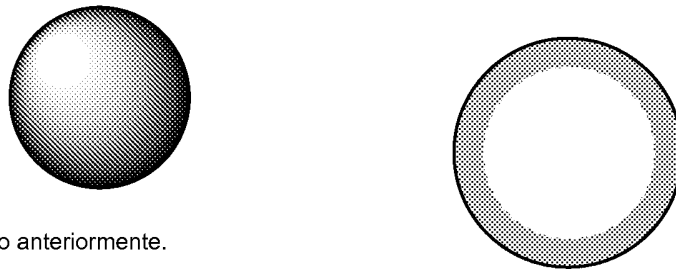


10

con una bis-vinilsulfona para obtener el compuesto de fórmula general (I) donde

y

15

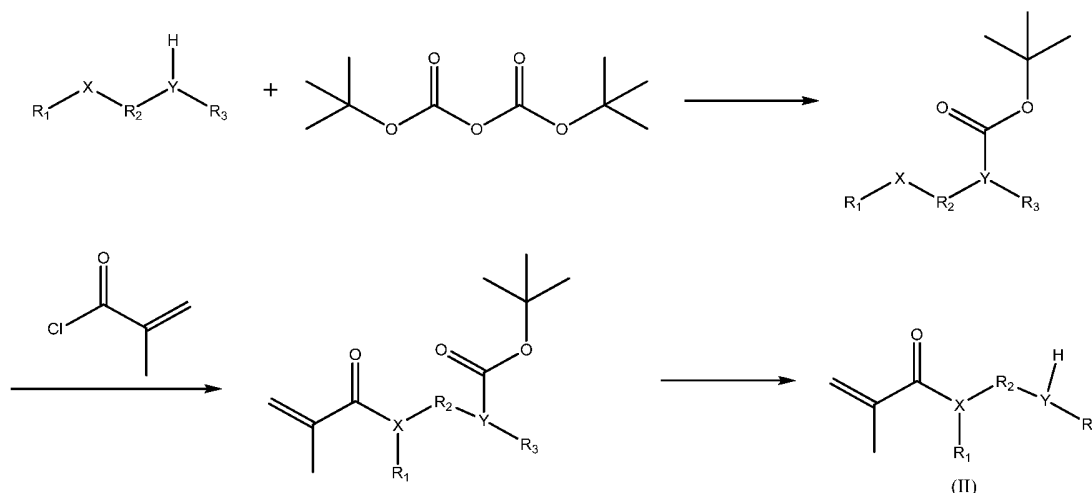


se definen como anteriormente.

20

Según una realización preferida, el compuesto el agente entrecruzante se selecciona del grupo formado por pentaeritritol triacrilato (PETRA), trimetilpropano trimetacrilato (TRIM), divinilbenceno (DVB), N,N'-metilendiácridamida, N,N'-1,4-fenilén diácridamida, etilén glicol dimetacrilato (EDMA) o 3,5-bis(acrilóil piperacina).

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de síntesis de un compuesto de fórmula general (II) que, comprende el siguiente esquema de reacciones:



donde X, R₁, R₂ y R₃ se describen como anteriormente e Y es N.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere al uso del compuesto de fórmula general (I), como inmovilizador de biomoléculas.

5 Según una realización preferida, la inmovilización es de tipo covalente.

Según una realización preferida, las biomoléculas se seleccionan del grupo formado por proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos o cualquier combinación de los mismos, como por ejemplo y sin sentido limitativo lipoproteínas, glicoproteínas, etc. De manera aún más preferida, las biomoléculas son enzimas que se inmovilizan mediante la reacción de sus grupos amina y/o tiol con la función vinylsulfona. Aún más preferiblemente las enzimas se seleccionan del grupo formado por invertasa, avidina o HRP.

10

Un quinto aspecto de la presente invención se refiere al uso del compuesto de fórmula general (I) como soporte cromatográfico para cromatografía de afinidad.

Un sexto aspecto de la presente invención se refiere al uso del compuesto de fórmula general (I) como biosensores de fibra óptica ((fibra óptica que se acopla a un colector magnético diseñado para coleccionar a las nanopartículas en la punta de la fibra óptica) capaces de seguir la reacción enzimática, mediante el aumento o disminución de la concentración de oxígeno en el medio, esto permitiría también la determinación indirecta de cualquier producto o reactivo que intervenga en la reacción enzimática) por unión con compuestos luminiscentes sensibles a oxígeno (atenuación de su luminiscencia dependiendo de la concentración de oxígeno del medio).

15

20

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25

Figura 1. Seguimiento fluorescente de la inmovilización de avidina en el compuesto de fórmula (I) (X es un átomo de oxígeno, R₂ es un grupo (CH₂)_n, n es 2, Y es un átomo de nitrógeno, R₃ es un grupo -CH₂-CH₂OH y Z no existe) en adelante compuesto de fórmula (Ia) y en el compuesto de fórmula general (III). a) Fotografías de microscopía de fluorescencia. b) Espectro de excitación (línea gris) y emisión (línea negra) fluorescente del compuesto fórmula (Ia) antes (---; línea discontinua) y después (—; línea continua) de la incubación con avidina-BFC; c) Espectro de excitación (línea gris) y emisión (línea negra) fluorescente del compuesto fórmula (III) antes (---; línea discontinua) y después (—; línea continua) de la incubación con avidina-BFC; d) Propiedades luminiscentes del BFC inmovilizado en el compuesto fórmula (Ia) (—; línea continua) y en el compuesto fórmula (III) obtenidos por la substracción de los espectros anteriores. IRF es la intensidad relativa de fluorescencia medida en unidades arbitrarias y λ es la longitud de onda de emisión.

30

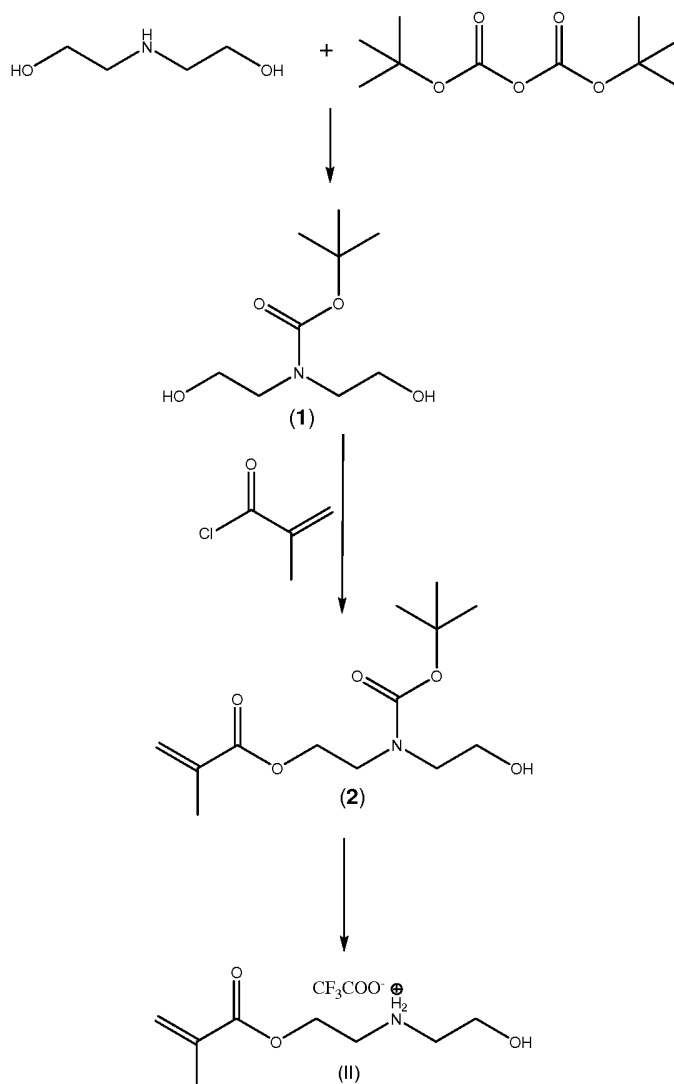
35

Figura 2. Actividad enzimática del compuesto fórmula (Ia) (—; línea continua) y del compuesto fórmula (III) (---; línea discontinua) incubados con invertasa. α es el poder rotario específico y t es el tiempo.

Figura 3. Actividad enzimática del compuesto fórmula (Ia) (—; línea continua) y del compuesto fórmula (III) (---; línea discontinua) incubados con HPR. A es absorbancia y t es tiempo.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1. Síntesis de compuestos de fórmula (II).



5 Compuesto 1: Una solución de 2-(2-aminoetilamino)etanol (2 g, 19 mmol) en MeOH (30 mL) se enfrió en un baño de hielo. Se le añadió di-*tert*-butil dicarbonato (4.57 g, 20.9 mmol) y la mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante una hora. El disolvente se eliminó a vacío y el crudo de reacción se purificó mediante cromatografía en columna. (AcOEt → AcOEt:MeOH 10:1). (3.6 g, 98%).

10 Compuesto 2: A una solución de cloruro de metacrililoilo (1 mL, 10 mmol) en Cl₂CH₂ anhidro (50 mL) se le añadió gota a gota una solución del compuesto 1 (4 g, 19.5 mmol) y Et₃N (4 mL, 28.8 mmol) en Cl₂CH₂ anhidro (70 mL). Tras 10 minutos la mezcla de reacción se lavó con salmuera (20 mL). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄), se filtró y el disolvente se eliminó a vacío. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía en columna (hexano:AcOEt 2:1 → AcOEt:MeOH 10:1) obteniéndose el compuesto 2 como un sirope (1.74 g, 64%). $v_{\max}(\text{film})/\text{cm}^{-1}$: 3443, 2972, 2929, 1717, 1473, 1408, 1364, 1292, 1245, 1159, 1049; ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 6.09 (s, 1H), 5.56 (s, 1H), 4.24 (br s, 2H), 3.72 (br s, 2H), 3.51 (br s, 2H), 3.42 (br s, 2H), 2.74 (s, 1H), 1.91 (s, 3H), 1.43 (s, 9H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 167.0, 135.2, 127.2, 55.9, 56.9, 50.0, 49.8, 46.5, 18.2; HRMS (m/z) (NALDI) calculado para C₁₃H₂₃NO₅Na [M + Na]⁺: 296.1468; encontrado: 296.1471.

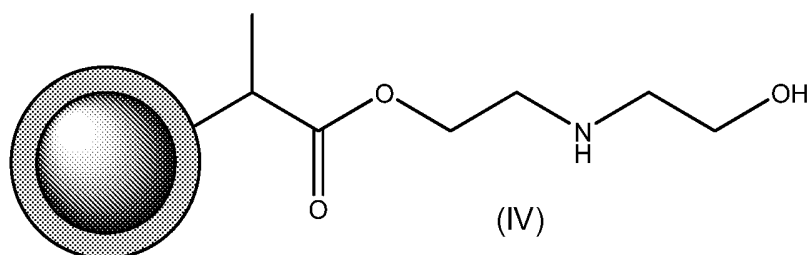
15 Compuesto (II): El compuesto 2 (850 mg, 3.1 mmol) se disolvió en ácido trifluoroacético: Cl₂CH₂ (1:5, 10 mL). La mezcla de reacción se mantuvo bajo agitación a temperatura ambiente durante 1.5 horas. El disolvente se eliminó a vacío y el crudo se purificó por cromatografía en columna empleando como eluyente (AcOEt → AcOEt:MeOH 3:1) obteniéndose el compuesto II en forma de sal del ácido trifluoroacético (885 mg, 99%). $v_{\max}(\text{film})/\text{cm}^{-1}$: 3417, 2970, 2815, 1676, 1453, 1320, 1293, 1201, 1136; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 6.07 (s, 1H), 5.55 (t, 1H, $J = 1.4$ Hz), 4.40

(t, 2 H, $J = 5.0$ Hz), 3.79 (t, 2 H, $J = 4.8$ Hz), 3.32 (t, 2 H, $J = 5.0$ Hz), 3.13 (t, 2 H, $J = 4.7$ Hz), 1.87 (s, 3 H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 167.3, 136.1, 125.6, 64.1, 60.7, 50.8, 47.7, 18.2; HRMS (m/z)(NALDI) calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{NO}_5\text{F}_3\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$: 310.0878; encontrado: 310.0890.

EJEMPLO 2. Preparación del compuesto de fórmula (Ia).

5 El compuesto de fórmula general (Ia) se obtuvo en un procedimiento de dos etapas:

A) En primer lugar se obtuvo el compuesto de fórmula (IV) que es el mismo que el compuesto de fórmula (III) pero donde X es O, R_2 es $-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, Y es N y R_3 es un grupo $-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$:



10 Las nanopartículas $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4\text{-OA}$ se prepararon siguiendo el procedimiento descrito (Zhang, Q. Y.; Zhang, H. P.; Xie, G.; Zhang, J. P., *Effect of surface treatment of magnetic particles on the preparation of magnetic polymer microspheres by miniemulsion polymerization. Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2007, 311, (1), 140-144).

El ferrofluido se preparó sonicando durante 40 min 2 g de $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4\text{-OA}$ en una mezcla de 4 mL de n-heptano y 4 mL de Cl_3CH .

15 Así, 8 mL de ferrofluido se adicionaron a 400 mL de agua destilada que contenía 250 mg de SDS. Esta dispersión se sonicó durante 20 minutos en un ultrasonidos de alta energía con una amplitud del 70% mientras se refrigeraba el sistema en un baño de hielo. La miniemulsión resultante se filtró y se transvasó cuidadosamente a un matraz bajo agitación mecánica (450 rpm) que contenía 1.6 mL de la mezcla polimérica (80% en peso del compuesto de fórmula (II) y 20% en peso de EDMA). La miniemulsión se mantuvo en agitación (450 rpm) a temperatura ambiente, y se midió el tamaño de las partículas cada 20 min por DLS hasta que se consiguió un tamaño de partícula constante y una adecuada polidispersidad (aproximadamente 1.3h). Posteriormente, se adicionaron 180 mg de peroxodisulfato potásico (KPS) y se aumentó la temperatura a 65°C para que comenzase la polimerización radicalaria. Ésta se llevó a cabo en ausencia de oxígeno, para ello se usó un flujo constante de N_2 , durante 24 h. Por último, las partículas resultantes (SP-HNPs) se lavaron 5 veces con agua milli Q y 5 veces con una disolución acuosa de metanol (50/50 v/v) para eliminar todos los compuestos que no habían reaccionado y se almacenaron en metanol a 4°C .

B) Funcionalización del compuesto de fórmula (IV) con grupos vinilsulfona:

La funcionalización con grupos vinilsulfona se llevó a cabo mediante reacción de los grupos amino secundarios de las nanopartículas híbridas con DVS (divinilsulfona); estos grupos están presentes debido al polímero entrecruzado de EDMA con el compuesto de fórmula general (II) que se usó para encapsular las partículas magnéticas.

30 Esta reacción se llevó a cabo en una disolución reguladora de fosfato a pH 8 y concentración 20mM, bajo agitación mecánica suministrada por un agitador orbital y durante 24h.

Posteriormente, las partículas resultantes (SP-HNPs-VS) fueron lavadas tres veces con disolución reguladora de fosfato de pH 8 y 5 veces con metanol, siendo por último conservadas en metanol a 4°C .

EJEMPLO 3. Inmovilización de Avidina.

35 La avidina es una glicoproteína de interés biotecnológico dado que el sistema avidina-biotina posee una alta especificidad, fortaleza y estabilidad y ha dado lugar a multitud de aplicaciones en diferentes campos, por ejemplo, en fusión celular, biosensores, preparación de neoglicoproteínas y en la producción de anticuerpos monoclonales.

40 6 mg del compuesto de fórmula (Ia) obtenidos tras eliminación del metanol, se lavaron con tampón fosfato 100mM y se resuspendieron en 1mL de tampón fosfato 10 mM pH 7.5 150mM NaCl. Sobre esta mezcla se adicionaron 300 μL de disolución 1 mg/mL de avidina en tampón fosfato 100 mM pH 8 y se mantuvo en agitación durante 24h en un agitador orbital.

Las partículas se lavaron 2 veces con 1 mL de tampón fosfato 100 mM pH 8, 4 veces con 1 mL de NaCl 2 M, y 2 veces con 1mL de tampón fosfato 10 mM pH 7.5. Usando esta última disolución reguladora para suspender las

partículas obtenidas y conservarlas para su posterior uso. El mismo experimento se llevo a cabo con una muestra del compuesto de formula general (III) como control negativo.

5 Para comprobar la inmovilización de avidina, la muestra y el control negativo se incubaron con 1 mL de disolución 15 μ M de biotina marcada con fluoresceína (BFC) durante 30 minutos. Posteriormente, las partículas obtenidas se lavaron 2 veces con 1 mL de tampón fosfato 100 mM pH 8, 4 veces con 1 mL de NaCl 2 M, y 4 veces con 1 mL de tampón fosfato 10 mM pH 7.5. Se tomaron fotografía de microscopía de fluorescencia y se registraron los espectros de excitación y emisión luminiscente del BFC retenido en la superficie de las partículas (FIGURA 1). Estos resultados ponen de manifiesto que se ha producido la inmovilización covalente de avidina sobre el compuesto de formula (Ia) que contiene grupos vinilsulfona y no sobre el compuesto de formula (III) el cual no contiene estos grupos.

EJEMPLO 4. Inmovilización de invertasa.

La invertasa {beta-fructofuranosidasa [EC3.2.1.26]}, enzima que cataliza la hidrólisis de sacarosa en fructosa y glucosa, es elegida como enzima modelo teniendo en cuenta su aplicación industrial.

15 Para llevar a cabo la inmovilización de invertasa se usaron 40 mg del compuesto de la invención de formula (Ia) tras la eliminación del metanol, que fueron lavados con tampón fosfato 100 mM pH 8 y se resuspendieron en 1 mL de este tampón. Se adicionaron 2.1 mL de disolución 1 mg/mL de invertasa en tampón fosfato 100 mM pH 8.0, agitando el medio de reacción durante 24 h a temperatura ambiente en un agitador orbital. Posteriormente, las partículas obtenidas se lavaron 2 veces con 8 mL tampón fosfato 100 mM pH 8, 4 veces con 8 mL de NaCl 2 M y 4 veces con 8 mL de tampón fosfato 10 mM pH 7.5. Usando esta última disolución reguladora para suspender las partículas obtenidas y conservarlas para su posterior uso. El mismo experimento se llevó a cabo con una muestra del compuesto de formula general (III) como control negativo.

25 Para estudiar la actividad de la enzima inmovilizada se midió el poder rotatorio específico de una muestra de sacarosa al 1% a distintos intervalos de tiempo (tanto en la muestra como en el control negativo). La invertasa cataliza la hidrólisis de sacarosa en glucosa y fructosa lo que origina una disminución en el poder rotatorio (FIGURA 2). Los resultados ponen de manifiesto que se ha producido la inmovilización covalente de invertasa sobre el compuesto de la invención de formula (Ia) y que el material así obtenido mantiene la actividad del enzima.

EJEMPLO 5. Inmovilización de HRP (horse-radish peroxidase).

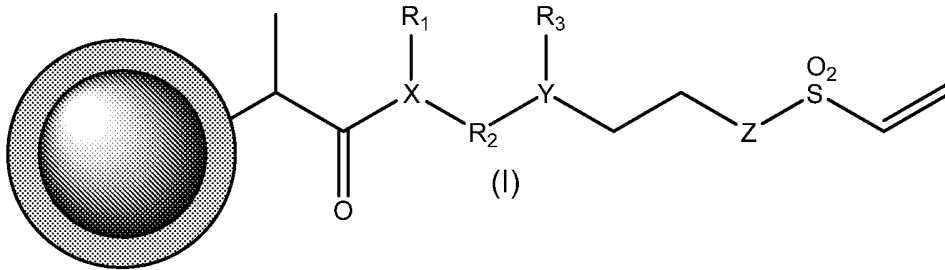
30 Las peroxidasas [EC1.11.1.x] son enzimas que catalizan la reducción de peróxido de hidrogeno con la ayuda de un sustrato que pierde dos átomos de hidrogeno Al tratarse de una glicoproteína es un buen modelo para demostrar la capacidad del compuesto de la invención (Ia) en la inmovilización de este tipo de biomoléculas. En concreto se trabajó con la peroxidasa de rábano picante (HRP).

35 Para llevar a cabo la inmovilización de HRP se usaron 12 mg del compuesto de la invención de formula (Ia) tras la eliminación del metanol, que fueron lavados con tampón fosfato 100 mM pH 8 se resuspendieron en tampón fosfato 100 mM pH 8.0. Se adicionaron 2.0 mL de disolución 1 mg/mL de peroxidasa de rábano picante (HRP) en tampón fosfato 100 mM pH 8.0, agitando el medio de reacción durante 24 h a 37°C en un agitador orbital. Posteriormente, las partículas obtenidas se lavaron 2 veces con 8 mL tampón fosfato 100 mM pH 8, 4 veces con 8 mL de NaCl 2 M, y 4 veces con 8 mL de tampón fosfato 10mM pH 7.5 para eliminar el exceso de NaCl. Usando esta última disolución reguladora para suspender las partículas obtenidas y conservarlas para su posterior uso. El mismo experimento se llevó a cabo con una muestra del compuesto de formula general (III) como control negativo.

40 Para demostrar la inmovilización de peroxidasa se midió la actividad enzimática, tanto en la muestra como en el control negativo (FIGURA 3). Los resultados ponen de manifiesto que se ha producido la inmovilización covalente de peroxidasa sobre el compuesto de la invención de formula (Ia) y que el material así obtenido mantiene la actividad del enzima.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula general (I):



5 donde:

X se selecciona entre un átomo de oxígeno o uno de nitrógeno, de tal manera que cuando X es O, el grupo R₁ no existe;

R₁ se selecciona entre H, un radical sustituido o no sustituido, seleccionado del grupo formado por un grupo alquilo C₁-C₂₀, lineal o ramificado, alcoialquilo o polietilenglicol;

10 R₂ es un radical sustituido o no sustituido, seleccionado del grupo formado por un radical alquilo -(CH₂)_n, un radical dialquilarilo (C₁-C₁₀)Ar(C₁-C₁₀) ó un radical -(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂; donde n toma valores de 2 a 20;

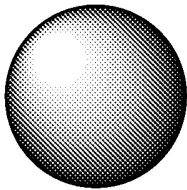
Y se selecciona entre un átomo de oxígeno, de azufre o de nitrógeno de tal manera que cuando Y es O ó S, el grupo R₃ no existe;

15 R₃ es un radical sustituido o no sustituido, seleccionado del grupo formado por un radical alquilo C₁-C₂₀ lineal o ramificado, un resto de polietilenglicol, un resto de hidroxialquilo o un resto de alcoialquilo;

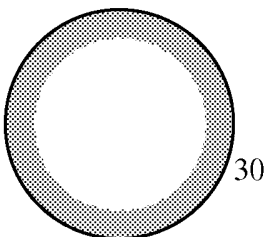
Z puede existir o no y si existe es un grupo -SO₂R₄-,

R₄ puede o no existir, pero si existe es un radical sustituido o no sustituido, seleccionado del grupo formado por un radical alquilo C₁-C₁₀, un radical dialquilarilo (C₁-C₁₀)Ar(C₁-C₁₀) ó un radical (CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂; donde n toma valores de 2 a 20;

20



25 representa materiales tanto orgánicos, como inorgánicos e híbridos formados por la combinación de los anteriores; y



representa el polímero resultante de la polimerización de un monómero acrililo junto con un entrecruzador.

2. El compuesto según la reivindicación 1, donde R₁ es un átomo de H.

3. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde R_2 es un radical $-(CH_2)_n$ donde n toma valores de entre 2 a 10.

4. El compuesto según la reivindicación 3, donde n toma valores de 2 a 5.

5. El compuesto según la reivindicación 4, donde n toma el valor de 2.

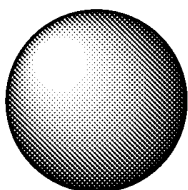
5 6. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde R_3 es un grupo CH_2CH_2OH .

7. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde R_4 es un grupo $(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2$ donde n toma valores de entre 2 a 10.

8. El compuesto según la reivindicación 7, donde n toma valores de 2 a 5.

9. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde

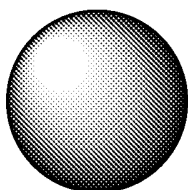
10



15 son materiales orgánicos de tipo poliméricos seleccionados del grupo formado por: poliacrilatos, polimetacrilatos, poliuretanos, poliestirenos, policarbonatos, poliacetatos, polivinilos, lineales o con diferente grado de entrecruzamiento

10. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde

20



25 son materiales inorgánicos seleccionados del grupo formado por partículas de óxidos metálicos con o sin propiedades magnéticas, nanocristales semiconductores, nanopartículas de plata o nanopartículas de oro.

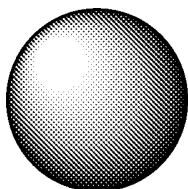
11. El compuesto según la reivindicación 10, donde los materiales inorgánicos son partículas de óxidos metálicos sin propiedades magnéticas seleccionados del grupo formado por óxido de silicio y óxido de titanio.

12. El compuesto según la reivindicación 10, donde los materiales inorgánicos son partículas de óxidos metálicos con propiedades magnéticas de tipo ferritas súper-paramagnéticas MFe_2O_4 , donde M se selecciona entre Zn, Mg, Mn, Ni, Co o Fe.

30

13. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde

35



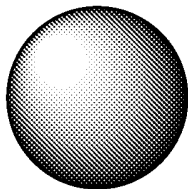
es un híbrido entre materiales orgánicos e inorgánicos.

14. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde el agente entrecruzante se selecciona del grupo formado por pentaeritritol triacrilato (PETRA), trimetilpropano trimetacrilato (TRIM), divinilbenceno (DVB), N,N'-metilendiácridamida, N,N'-1,4-fenilén diacrilamida, etilén glicol dimetacrilato (EDMA) o 3,5-bis(acrilóil piperacina)

40

15. El compuesto según la reivindicación 14, donde el agente entrecruzante es EDMA.

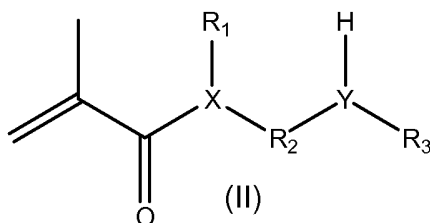
16. El compuesto según la reivindicación 1, donde X es un átomo de oxígeno, R₂ es un grupo (CH₂)_n, n es 2, Y es un átomo de nitrógeno, R₃ es un grupo -CH₂-CH₂OH, Z no existe,



es magnemita recubierta con ácido oleico (-Fe₃O₄-OA) y el agente entrecruzante es EDMA.

10 17. Procedimiento de síntesis del compuesto de fórmula general (I) de las reivindicaciones 1 a 16, que comprende las siguientes etapas:

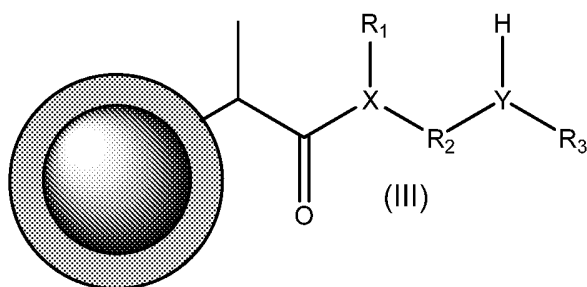
a. adición de una miniemulsión de nanopartículas súper-paramagnéticas a una mezcla polimérica que comprende un monómero de fórmula general (II) y un agente entrecruzante;



15

donde X, R₁, R₂, Y y R₃ se describen como en la reivindicación 1;

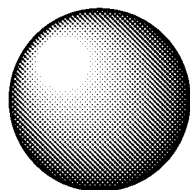
b. reacción del compuesto obtenido en la etapa a) de fórmula general (III)



20

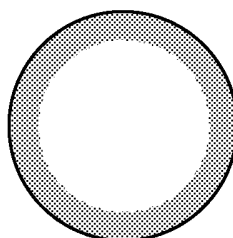
con una bis-vinilsulfona para obtener el compuesto de fórmula general (I) donde

y



25

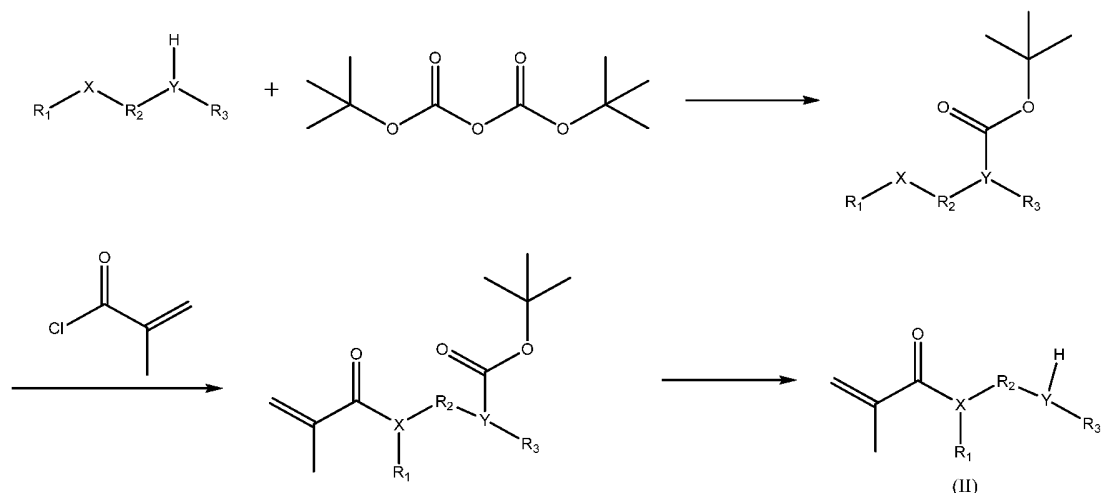
se definen como en la reivindicación 1.



18. El procedimiento según la reivindicación 17, donde el agente entrecruzante se selecciona del grupo formado por pentaeritritol triacrilato (PETRA), trimetilpropano trimetacrilato (TRIM), divinilbenceno (DVB), N,N'-metilendiacrilamida, N,N'-1,4-fenilen diacrilamida, etilen glicol dimetacrilato (EDMA) o 3,5-bis(acriiloil piperacina).

19. El procedimiento según la reivindicación 18, donde el agente entrecruzante es EDMA.

5 20. Procedimiento de síntesis del compuesto de fórmula general (II) de la reivindicación 17, que comprende el siguiente esquema de reacciones:



donde X, R₁, R₂ y R₃ se describen como en la reivindicación 1 e Y es N.

21. Uso del compuesto de fórmula general (I) de las reivindicaciones 1 a 16, como inmovilizador de biomoléculas.

10 22. El uso según la reivindicación 21, donde las biomoléculas se seleccionan del grupo formado por proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos o cualquier combinación de los mismos.

23. El uso según la reivindicación 22, donde las biomoléculas son enzimas que se inmovilizan mediante grupos amina y/o tiol.

15 24. El uso según la reivindicación 23, donde las enzimas se seleccionan del grupo formado por invertasa, avidina o HRP.

25. Uso del compuesto de fórmula general (I) de las reivindicaciones 1 a 16, como soporte cromatográfico para cromatografía de afinidad.

26. Uso del compuesto de fórmula general (I) de las reivindicaciones 1 a 16, como biosensores de fibra óptica.

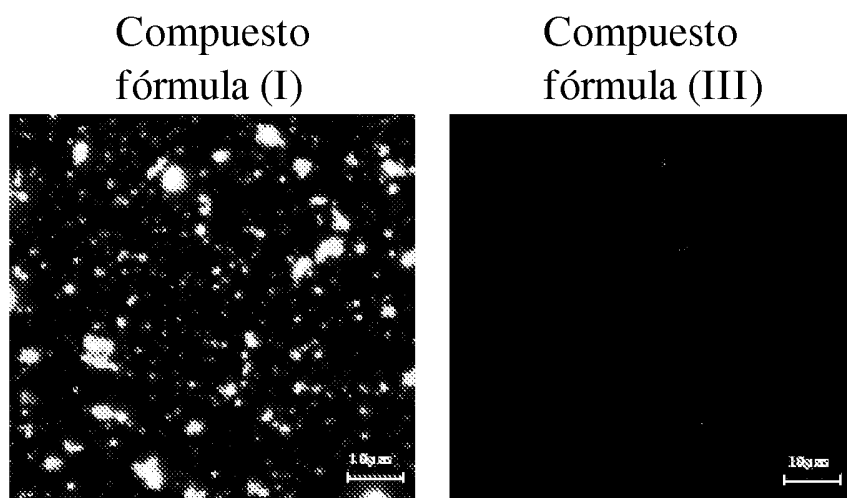


Fig. 1a

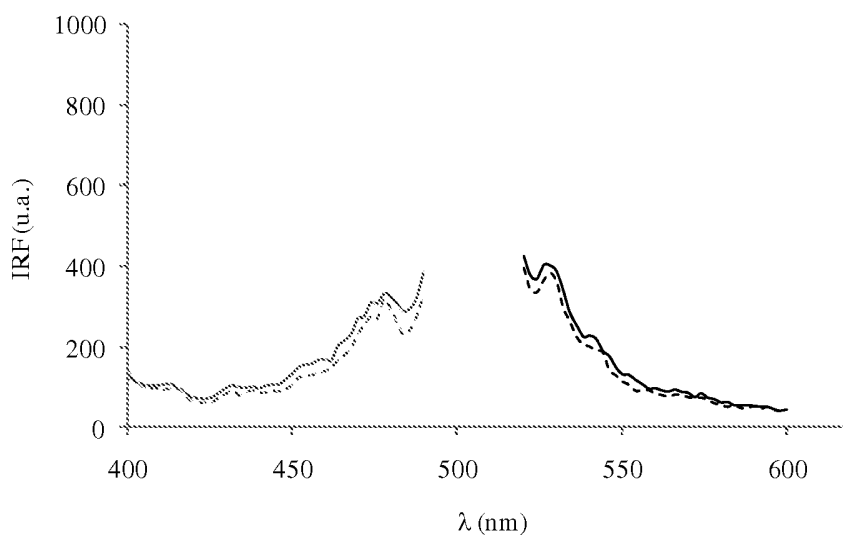


Fig. 1b

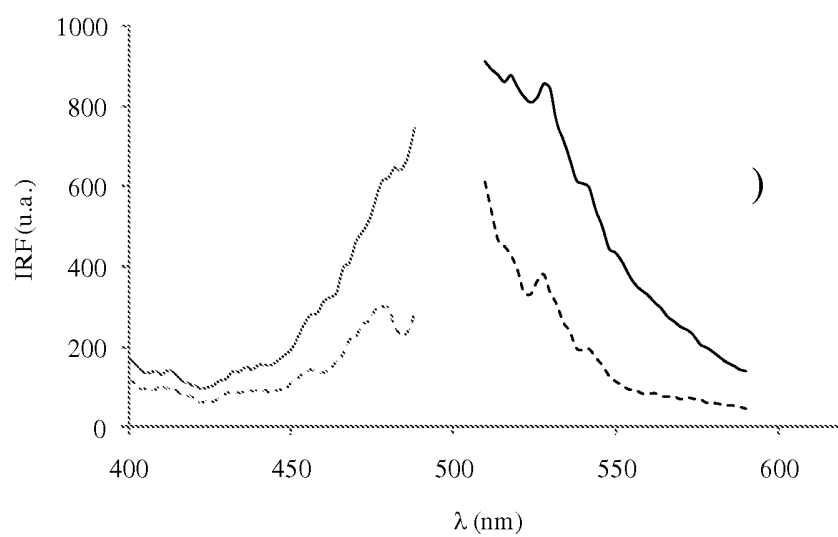


Fig. 1c

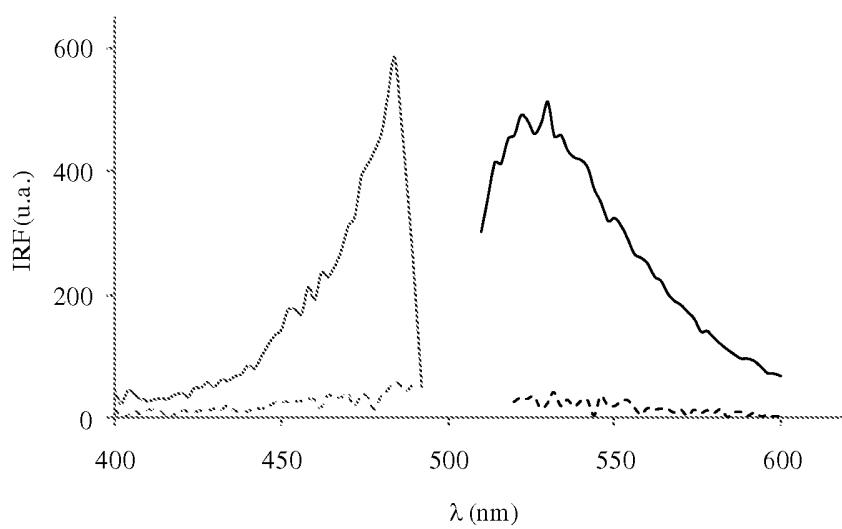


Fig. 1d

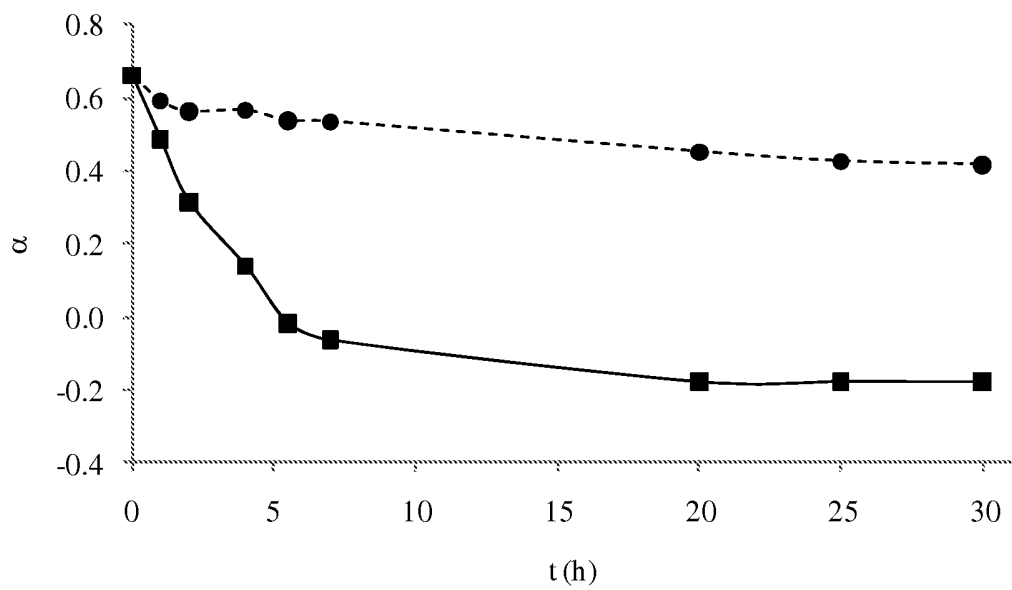


Fig. 2

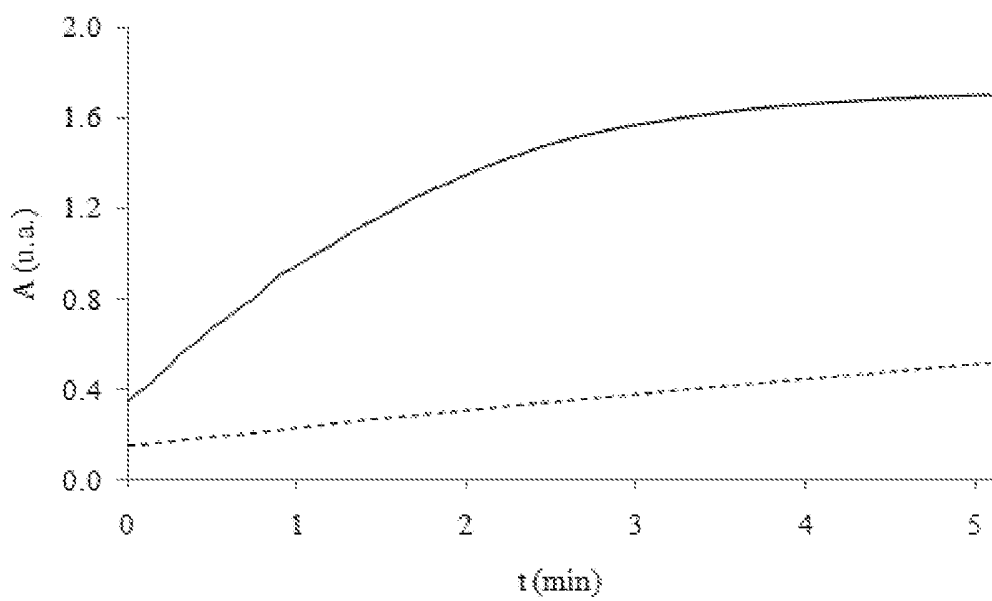


Fig. 3



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201031944

22 Fecha de presentación de la solicitud: 24.12.2010

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

5 Int. Cl. : **B82Y40/00** (2011.01)
A61K47/48 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2007/065933 A1 (QIAGEN GMBH) 14-06-2007, todo el documento	1-26
A	T GONG et al, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 05-2009, vol 339, págs 232-239. "Preparation of monodispersed hybrid nanospheres with high magnetite content from uniform Fe ₃ O ₄ clusters", todo el documento	1-26
A	US 7175912 B2 (SHANXI LIFEGEN) 13-02-2007,	1-26

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
27.04.2012

Examinador
M. d. Fernández Fernández

Página
1/4

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

B82Y, A61K

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, CAS, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.04.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-26	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-26	SI
	Reivindicaciones	NO

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	WO 2007/065933 A1 (QIAGEN GMBH)	14.06.2007
D02	T GONG et al, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 05-2009, vol 339, págs 232-239. "Preparation of monodispersed hybrid nanospheres with high magnetite content from uniform Fe ₃ O ₄ clusters", todo el documento	
D03	US 7175912 B2 (SHANXI LIFEGEN)	13.02.2007

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 solicitud se refiere al compuesto de fórmula (I) de la reivindicación 1 constituido por un núcleo de nanopartículas híbridas superparamagnéticas de materiales orgánicos o inorgánicos en un polímero de acrilato con un entrecruzador y una cadena que puede llevar o no grupos vinilsulfona (reivindicaciones 1-16), así como al procedimiento de síntesis de estos polímeros (reivindicaciones 17-20) y su uso como inmovilizadores de biomoléculas, como soporte cromatográfico y como biosensores de fibra óptica (reivindicaciones 21-26).

El documento D1 divulga partículas poliméricas con propiedades paramagnéticas en las que las partículas magnéticas (por ejemplo Fe₃O₄) están rodeadas por una matriz de poliacrilato o polialquilacrilato, procedimiento para su preparación y su uso para inmovilizar moléculas biológicas (ácidos nucleicos, proteínas...), ver reivindicaciones de D1 y en general todo el documento.

El documento D2 divulga nanoesferas híbridas paramagnéticas compuestas por un núcleo de Fe₃O₄ encapsulado en una matriz de poliestireno y su obtención por polimerización en miniemulsión (ver páginas 232 y 233 de D2) y su utilidad para inmovilizar enzimas, liberación de fármacos, purificación de proteínas...

El documento D3 divulga una nanopartícula superparamagnética compuesta por un núcleo de partículas magnéticas (óxidos de Fe, ferritas...) en un recubrimiento de un metal noble así como un método para su preparación (ver página 1 de D3). Esta partícula puede unirse a materiales biológicos, tales como ácidos nucleicos, proteínas...

En el estado de la técnica no se ha encontrado divulgado el compuesto de fórmula (I) de la reivindicación 1 de la solicitud por lo que se considera nuevo y, por tanto, el procedimiento para su obtención. Por otra parte, se considera que la invención tiene actividad inventiva pues los polímeros de la solicitud presentan características específicas no evidentes para un técnico en la materia a partir del estado de la técnica reflejado en D1, D2 y D3, por ejemplo los monómeros precursores de los compuestos de fórmula (I) presentan grupos funcionales que facilitan la inmovilización covalente de biomoléculas en su superficie.

En conclusión, se considera que las reivindicaciones 1-26 de la solicitud cumplen los requerimientos de novedad y actividad inventiva previstos en los Art. 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.