

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 856 225**

21 Número de solicitud: 202030249

51 Int. Cl.:

**A61K 9/51** (2006.01)

**A61K 47/00** (2006.01)

**B82Y 5/00** (2011.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**26.03.2020**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**27.09.2021**

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (75.0%)  
C/ Serrano,117  
28006 Madrid (Madrid) ES y  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
(25.0%)**

72 Inventor/es:

**TAMAYO HERNANDO, Aitana;  
RUBIO ALONSO, Juan;  
RUBIO ALONSO, Fausto y  
VEIGA OCHOA, Maria Dolores**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **Partículas híbridas con superficie funcional térmica para la liberación sostenida de moléculas**

57 Resumen:

Partículas híbridas con superficie funcional térmica para la liberación sostenida de moléculas.

La invención se refiere a nanopartículas híbridas orgánico-inorgánicas porosas que se han sintetizado y posteriormente funcionalizado con un agente de acoplamiento de silano seguido de carga con una molécula de interés. Se ha identificado la disposición de la molécula de silano en la superficie de las partículas para discernir el mecanismo de interacción con la molécula de fármaco cargada.

ES 2 856 225 A1

## DESCRIPCIÓN

### **Partículas híbridas con superficie funcional térmica para la liberación sostenida de moléculas**

5 La invención describe nanopartículas híbridas orgánica-inorgánico que han sido sintetizadas y posteriormente funcionalizadas con un agente de acoplamiento de tipo silano seguido por la carga con la molécula de interés. Se ha identificado la disposición de las moléculas de silano en la superficie de las partículas para discernir el mecanismo de interacción con la molécula de fármaco cargada.

### **ESTADO DE LA TÉCNICA**

10 En los últimos años se han desarrollado varios materiales con potenciales aplicaciones en la liberación controlada de. Los materiales propuestos consisten en carbono o materiales de base sílice, cerámicas vidrios, polímeros orgánicos sintéticos, polímeros orgánicos naturales, ya sean porosos con porosidad aleatoria, gradiente, jerarquizada, mesoporosos, o materiales densos, cuyos tamaños pueden  
15 variar desde nanómetros a micrómetros. Algunas de estas soluciones son para uso tópico externo (cremas, geles) mientras que otros pueden ser introducidos en el cuerpo humano o animal, bien por vía intravenosa o como pastillas o líquidos por toma oral. En todos los casos la propiedad fundamental del material es que sea biocompatible y no muestre rechazo por el sistema inmune; además debe poseer  
20 buena resistencia mecánica, ser idealmente confortable para el paciente, capaz de ser almacenado durante bastante tiempo, capaz de almacenar gran cantidad de medicamento en el mínimo volumen, debe ser seguro en caso de pérdida accidental, de sencilla administración y eliminación, así como de fácil fabricación y/o esterilización.

25 Entre las diferentes estrategias desarrolladas para la liberación sostenida de fármacos, destacan los sistemas basados en materiales inertes y altamente porosos para alojar la máxima cantidad de fármaco. Estos sistemas están formados por un material de soporte orgánico, inorgánico o híbrido, donde las moléculas del fármaco son alojadas. De entre las múltiples posibilidades de los materiales  
30 orgánicos porosos, destacan los sistemas basados en polipropileno, poliestireno,

ácido poli(( $\alpha,\beta$ -L)málico, polietilenglicol, poli( $\epsilon$ - caprolactone), etilcelulosa, entre otros. Estos polímeros son biodegradables, biocompatibles y de fácil procesado, además la velocidad de liberación del fármaco se puede controlar modulando la degradabilidad del polímero. Esta velocidad se modula cambiando el peso molecular del polímero, a la vez que el tamaño de las partículas del polímero se puede ajustar cambiando la composición química o bien el método de fabricación. Las moléculas del polímero son de tipo orgánico es decir C-C pero se requiere también de la presencia de enlaces C=C, C-N, C-H y C-O. Una característica común de estos materiales es que al ser calentados en atmósfera de oxígeno o aire se degradan y terminan quemándose sin apenas dejar residuos.

Dentro de los polímeros sintéticos están también los dendrímeros y las macromoléculas ramificadas con forma cuasi esférica. Las moléculas del fármaco pueden quedar atrapadas físicamente dentro del propio dendrímero o bien químicamente adheridas a su superficie. Los enlaces químicos de las moléculas del dendrímero son similares a los sintéticos anteriores con la presencia de los heteroátomos anteriormente mencionados y también se queman al ser calentados en presencia de aire a temperaturas moderadas.

Dentro de los polímeros naturales, los polisacáridos o heparina, sulfato de condroitina y quitosano, gelatina, colágeno, alginato, albúmina, almidón, derivados de celulosa, etc., son los ejemplos más típicos. Estos polímeros pueden ser degradados por muchos tipos de microorganismos y enzimas. En estos materiales, los enlaces químicos son también similares a los de los polímeros sintéticos, con predominancia de enlaces C-C y C-H y con algunos enlaces C-H y C=O. De manera similar a los materiales sintéticos, los polímeros naturales pueden ser calentados en atmósfera de aire hasta su degradación y casi completa desaparición.

Dentro del grupo de los materiales inorgánicos, los mayores desarrollos han sido realizados en sílice mesoporosa, la cual puede exhibir diferentes tipos de interacciones con las moléculas orgánicas para el desarrollo de múltiples funciones biofarmacéuticas. Las sílices mesoporosas MCM- y SBA-15 son probablemente los materiales más estudiados como soportes de fármacos. Los materiales de sílice preparados por el proceso sol-gel, denominados como xerogeles o aerogeles, ya

sean con porosidad aleatoria o jerarquizada y con mesoporosidad ordenada. Así la patente EP0906243B1 propone un xerogel de sílice capaz de disolverse y en el cual se puede incorporar un agente activo biológico. Estos xerogeles de sílice no sólo son capaces de absorber-liberar fármacos sino también otros compuestos como aditivos de alimentación, conservantes, potenciadores de sabor, etc.

La patente US8252337B2 describe sílices mesoporosas para liberación de fármacos, en la que se propone una sílice mesoporosa con grupos Si-OH gracias a los cuales se aumenta el control de la liberación del fármaco. Asimismo, la solicitud US2011288234A1 se refiere al uso de nanopartículas de sílice para liberación de fármacos está la patente en la que dichas nanopartículas contienen moléculas fotosensibles gracias a las cuales se pueden hacer dirigir las propias partículas hacia el tumor y allí liberar el fármaco que contienen. Todos estos materiales de sílice tienen en común el estar formados por enlaces Si-O-Si, existiendo también Si-OH, siendo considerados como materiales de naturaleza inorgánica.

Se han explorado además diferentes soluciones de silicatos y carbonatos de calcio microporosos, aluminosilicatos de magnesio, vidrios y cerámicas bioactivas y de óxido de titanio. Estos materiales porosos se pueden sintetizar con una alta superficie específica, elevados volúmenes de poro, así como tamaño de poro seleccionado y jerarquizado o diferentes características hidrofóbico-hidrofílico (Ahuja, G. *et al. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2009**. 71(6), 599-607).

En la gran mayoría de estos sistemas, las moléculas del fármaco se encuentran atrapadas en los poros o, en ausencia de porosidad, se encuentran íntimamente mezcladas y distribuidas entre las partículas del material inerte. Así pues, varios factores van a afectar a los perfiles de liberación de las moléculas del fármaco, muchos de ellos relacionados con el mecanismo de adsorción del mismo. El tamaño del poro y su volumen van a determinar la penetración de las moléculas huésped en los canales de los poros y así con la superficie del soporte que está disponible para interactuar con dichas moléculas. Asimismo, las propiedades texturales en términos de tortuosidad de los canales y su permeabilidad serán los principales actores a la hora de discernir las capacidades de alojamiento y posterior liberación de las moléculas de fármaco (Doadrio, *et al., Curr Pharm Des*, **2015**. 21(42), 6213-6819).

Una de las estrategias más habituales para mejorar la adsorción y liberación de los materiales empleados como soportes de fármacos consiste en la funcionalización de su superficie, bien por métodos de injerto a través de agentes de acoplamiento o mediante la incorporación de diferentes funcionalidades para modular las propiedades hidrofílicas o hidrofóbicas de su superficie.

La presencia de interacciones débiles entre las matrices o soportes inorgánicos y las moléculas de fármaco (de carácter eminentemente orgánico) han atraído la atención al desarrollo de los materiales híbridos en los cuales, la combinación sinérgica entre los componentes orgánicos e inorgánicos propicia una solución adecuada para un amplio número de aplicaciones biomédicas y farmacéuticas. Gracias a la versatilidad del método sol-gel, se ofrece una ruta excepcional para la preparación de materiales híbridos orgánicos inorgánicos donde las soluciones homogéneas de precursores basados en polímeros de sílice van a dar lugar a geles con una porosidad seleccionada. La aplicación de los polímeros basados en sílice o siliconas para usos biomédicos o biofarmacéuticos está extendida gracias a su biocompatibilidad, pudiendo encontrar ejemplos de los mismos en catéteres, tubos y tuberías médicos o lentes de contacto. Mediante una modificación selectiva de sus propiedades superficiales se ha conseguido además proporcionar a estos materiales de interacciones dirigidas con tejidos biológicos aplicándose incluso en microreactores y microfluidos.

En los sistemas de liberación inteligente de fármacos, las moléculas del fármaco encapsulado en un sólido difunden a su través para interaccionar con los fluidos biológicos. Cuando el sistema se compone de partículas inorgánicas porosas embebidas dentro de una matriz insoluble, dicha difusión está fuertemente impedida y, por tanto, la liberación del fármaco puede ser regulada y sostenida por amplios periodos de tiempo.

## **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

La presente invención está dirigida al desarrollo de materiales altamente porosos que actúan como transportadores de fármacos a partir de la pirolisis parcial de precursores derivados de híbridos sol-gel. Materiales híbridos orgánico-inorgánico se han sometido a un tratamiento térmico a temperaturas inferiores a la reacción de

mineralización en la que (el componente orgánico del híbrido ha desaparecido casi en su totalidad). Tras la funcionalización con un agente de acoplamiento de tipo silano, el fármaco correspondiente ha sido cargado, siendo la cantidad de fármaco adsorbido en la superficie del material no directamente dependiente de la superficie específica sino de su energía superficial. Tras cargar la máxima cantidad de fármaco en cada uno de los materiales, se ha determinado la cantidad de fármaco liberado en fluido vaginal simulado.

En particular, la invención describe nanopartículas orgánicas-inorgánicas y su procedimiento de obtención, las cuales han sido testadas con éxito como huéspedes para la incorporación de moléculas tales como fármacos, pigmentos, etc., para su uso en medicina, cosmética, alimentación, etc. La cantidad de molécula cargada no depende del área superficial de la nanopartícula sino de la funcionalización de su superficie. A cierta temperatura de pirolisis (700 °C), se ha demostrado que la superficie de las partículas interacciona con un agente de acoplamiento de tipo silano formando una monocapa de grupos amino libres. Estos grupos amino libres permiten que se puede albergar una alta cantidad de moléculas dependiendo de su funcionalización. A mayor temperatura, la cantidad de moléculas cargadas es incluso mayor y, por ende, su capacidad de liberación, aunque ésta es independiente de la cantidad de la liberación. Este hecho se ha atribuido a la presencia de interacciones débiles (zwitterion) entre las funcionalidades de tipo amino.

Cuando la nanopartícula se carga con un fármaco antiviral, se observa que aparte de la relación directa de la funcionalización superficial con las capacidades de adsorción - liberación que se presentaba en la muestra pirolizada a 700 °C, no se ha encontrado ningún efecto citotóxico en ninguna de las líneas celulares ensayadas, indicando que este material podría ser el candidato perfecto para la realización de otros ensayos in-vitro e in-silico con el objeto de desarrollar formulaciones farmacéuticas listas para su uso.

En la actual invención, las nanopartículas híbridas orgánico-inorgánico de la invención se obtienen a partir de un polímero de base silicio con o sin la presencia de un alcóxido metálico que se ha tratado previamente a temperaturas de tratamiento por debajo de su temperatura de mineralización. Pueden coexistir

enlaces de tipo Si-C, Si-N, o Si-N-C en los materiales en diferentes proporciones y su método de obtención pudiera llevarse a cabo por varios procedimientos sin que uno excluya a los otros.

5 En particular, en la presente invención se emplea un antiviral, concretamente el antiviral Tenofovir donde la cantidad de fármaco adsorbido está directamente relacionada con la energía superficial del material poroso y es independiente de su superficie específica. Tras alcanzar la máxima carga admitida, el fármaco es liberado a un fluido vaginal simulado.

10 En este sentido, la capacidad de carga y liberación del Tenofovir no depende estrictamente del área específica superficial sino de la funcionalización de la superficie. Es necesario dotar de grupos amino funcionales para conseguir un material con respuesta inteligente al pH, una condición que solo es adquirida en presencia de una monocapa de silano. Las interacciones de tipo zwitterion entre los grupos amino y los grupos silanol inducen una interacción débil con la molécula y por tanto más susceptible a una liberación no dirigida. Solo los materiales que  
15 contienen tanto los grupos amino libres y los grupos de tipo zwitterion muestran una respuesta lineal entre la funcionalización y las capacidades de carga y liberación.

Por otro lado, se ha observado que las muestras pirolizadas a temperaturas inferiores a 700 °C son biocompatibles con las células MT-2, HEC-1A y THP1,  
20 mostrando valores  $CC_{50}$  por encima de 1000  $\mu\text{g/ml}$ , la máxima concentración ensayada. Únicamente la muestra pirolizada a 800 °C mostró toxicidad celular en los tres tipos de células, con una toxicidad ligeramente superior en las células MT-2, la línea celular de linfocitos, con un valor  $CC_{50}$  de 447,5  $\mu\text{g/ml}$ . Sin embargo, solo aparecieron efectos tóxicos en las células mononucleares THP-1 y células  
25 epiteliales HEC-1A a concentraciones.

Por tanto, el primer aspecto de la presente invención se refiere a una partícula orgánica-inorgánica porosa con una funcionalización térmicamente activada para la liberación sostenida de moléculas y caracterizada por que la nanopartícula comprende una monocapa de silano que contiene enlaces químicos seleccionados  
30 entre Si-N, Si-O y Si-M donde M es un elemento seleccionado de entre Si, Zr, Ti, Al y B y donde la monocapa se encuentra adherida por quimisorción con un agente de

acoplamiento de tipo silano, que permite una interacción débil con la molécula que va a ser liberada en un porcentaje con respecto a la monocapa de silano que está comprendido entre 0,1 y 3 % en peso total.

5 En una realización preferida, el agente de acoplamiento se selecciona de entre un aminosilano, epoxisilano, mercapto silano, fenil silano, isocianato silano, metacril silano y vinil silano; preferiblemente, el agente de acoplamiento es  $\gamma$ -aminopropil trimetoxi silano ( $\gamma$ -APS).

En otra realización preferida, el porcentaje de agente de acoplamiento está comprendido entre 0,1 y 1 % en peso.

10 En otra realización preferida, la nanopartícula contiene además la molécula que va a ser liberada, que se selecciona de entre fármacos, pigmentos, cosméticos, sabores, olores o nutrientes. En una realización preferida la molécula es un fármaco, preferentemente es un fármaco antiviral y más concretamente la molécula denominada Tenofovir.

15 En otra realización preferida, la monocapa de silano se modifica mediante métodos químicos, físicos o mecánicos.

20 En otra realización preferida, la porosidad de la nanopartícula de invención es aleatoria, ordenada o jerarquizada; y esta porosidad se consigue en el mismo proceso de obtención del material o por modificaciones adicionales, como la adición de un elemento formador de porosidad.

Un segundo aspecto de la presente invención está relacionado con una composición que comprende la nanopartícula de la invención y una molécula seleccionada de entre fármacos, pigmentos cosméticos sabores, olores o nutrientes.

25 En una realización preferida la composición es una formulación farmacéutica que comprende fármacos, preferiblemente un fármaco antiviral; y más preferiblemente Tenofovir.

Un tercer aspecto de la presente invención está relacionado con el proceso de obtención de las nanopartículas híbridas orgánicas-inorgánicas de la invención, donde el proceso comprende al menos los siguientes pasos:

- 5 a) Síntesis de un material híbrido orgánico-inorgánico basado en silicio, y que contiene elementos seccionados de entre Si, Zr, Ti, Al o B mediante un proceso seleccionado de entre el método sol-gel (y sus derivados como los procesos Stober o Pechini), polimerización y sonicación;
- b) Pirólisis del material obtenido en el paso a) a una temperatura comprendida entre 500 y 800 °C en atmósfera controlada;
- 10 c) Opcionalmente, la modificación superficial del material obtenido en el paso b) mediante métodos físicos o químicos;
- d) Funcionalización de la superficie del material obtenido en el paso b) o c) mediante quimisorción por un agente de acoplamiento de tipo silano.

15 Donde la formación de la porosidad mediante la molienda del material tiene lugar antes, durante o después del proceso de pirólisis del paso b) para ajustar el tamaño de la partícula que está comprendido entre 0,1 y 100 micras.

En una realización preferida del proceso de preparación del material híbrido del paso a) es el método sol-gel en el cual alcóxidos de silicio son seleccionados de entre tipo tetraetil ortosilicato (TEOS), y tipo metil trietoxisilano (MTES) o silanos seleccionados de entre trietoxisilano (TREOS), polidimetil siloxano (PDMS) y poli metil fenil siloxano (PMPS) entre otros; o alcóxidos de otros elementos diferentes del Si, tal como B, Al, Ti, Zr, etc. En el proceso sol-gel estas moléculas se mezclan en presencia de un disolvente, preferentemente un alcohol, e hidrolizadas con agua a diferentes valores de pH, y opcionalmente añadiendo otras moléculas reguladoras de la reacción como ácido acético o acetil-acetona, entre otras. El resultado es un gel que se seca y piroliza a temperaturas comprendidas entre 500 y 800 °C en una atmósfera inerte (N<sub>2</sub>, Ar, etc.), reductora (CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>, etc.) o reactiva (NH<sub>3</sub>), en uno o varios pasos. La concentración de estas moléculas en el material final está entre 0 y 10% en peso.

30 En una realización preferida, el material híbrido se prepara por el método sol-gel empleando trietoxisilano como materia prima.

En otra realización preferida el proceso para la preparación del material híbrido es un proceso de polimerización empleando por ejemplo polímeros de polisiloxano.

En otra realización preferida el proceso de pirolisis del paso b) tiene lugar a temperaturas comprendidas entre 700 y 800 °C e incluso más preferiblemente la temperatura de pirolisis del paso c) es 700 °C.

En otra realización preferida la atmosfera controlada del paso b) consiste en una atmosfera inerte seleccionada de entre N<sub>2</sub>, Ar, He y sus combinaciones.

En otra realización preferida la atmosfera controlada del paso b) consiste en una atmosfera reactiva seleccionada de entre NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y sus combinaciones.

10 En otra realización preferida la atmosfera controlada del paso b) consiste en una atmosfera reactiva seleccionada de entre NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y sus combinaciones con una atmósfera inerte.

En otra realización preferida la superficie del material obtenido en el paso b) es modificado en el paso c) mediante métodos químicos seleccionados de entre oxidación, oxidación-reducción por H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>MnO<sub>4</sub> en un método acuoso o con otros oxidantes como peróxidos de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), etc.; la reducción puede ser llevada a cabo mediante agentes reductores como NaBH<sub>4</sub>, hidrazina o hidrogeno gas.

En otra realización preferida la superficie del material obtenido en el paso b) es modificado en el paso c) por métodos químicos usando procesos de disolución química como empleando bases del tipo NaOH, KOH, NH<sub>4</sub>OH, entre otros; o ácidos como HF, HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, entre otros.

En otra realización preferida la superficie del material obtenido en el paso b) se modifica en el paso c) por métodos físicos incluyendo, entre otros, deposición física en fase vapor (PVD), tratamiento láser, pulverización o tratamientos térmicos en atmósfera oxidante. En particular, en la modificación superficial mediante un tratamiento térmico en atmósfera oxidante, la concentración de oxígeno está comprendida entre 0,1 y 100 %, o puede tener lugar a concentraciones parciales de oxígeno comprendidas entre 0,01 y 1. Estos tratamientos térmicos se llevan a cabo

en hornos de gas, eléctricos, solares, etc., tanto abiertos como cerrados, durante periodos que están comprendidos entre 1 minuto y 24 horas dependiendo del grado de modificación (oxidación) requerido y a temperaturas comprendidas entre 100 y 1000 °C dependiendo del grado de modificación (oxidación) requerido.

- 5 En otra realización preferida la funcionalización de la superficie en el paso d) tiene lugar con un agente de acoplamiento de tipo silano seleccionado de entre un amino silano, epoxi silano, mercapto silano, fenil silano, isocianato silano, metracril silano y vinil silano; preferiblemente el agente de acoplamiento es  $\gamma$ -aminopropil trimetoxi silano ( $\gamma$ -APS).
- 10 Este agente de acoplamiento permite interacciones de la molécula de interés con la superficie de las nanopartículas híbridas orgánico-inorgánico de la invención mediante interacciones débiles, interacciones de puente de hidrógeno, permitiendo la absorción y posterior liberación de una manera controlada.

- En otra realización preferida, el proceso comprende además un paso g) que
- 15 consiste en la interacción de la nanopartícula del paso f) con la molécula de interés, que se selecciona de entre fármacos, pigmentos, cosméticos, sabores, olores o nutrientes; preferiblemente la molécula es un fármaco, preferiblemente un fármaco antiviral y más preferiblemente, Tenofovir.

- Una tercera realización de la presente invención proporciona un uso de las
- 20 nanopartículas de invención para la liberación sostenida, en particular para la liberación sostenidas de fármacos.

Un aspecto más de la invención se refiere al uso de las nanopartículas híbridas orgánicas-inorgánicas de la invención en medicina y/o cosmética.

- Un aspecto más de la invención se refiere al uso de la composición que comprende
- 25 la nanopartícula de la invención y un fármaco, como medicamento.

Un aspecto más de la invención se refiere al método de liberación sostenida de la molécula que comprende i) la preparación del material híbrido orgánico-inorgánico como se describe más arriba ii) la carga de la molécula y iii) la liberación controlada.

En una realización referida la molécula de interés (fármacos u otros tipos de moléculas como pigmentos, cosméticos, sabores, olores, nutrientes, etc.), es sólida, líquida o gaseosa y las nanopartículas orgánicas-inorgánicas de la invención están siempre en estado sólido. La concentración de estas moléculas en la nanopartícula híbrida orgánico-inorgánico dependerá del tiempo de interacción entre la molécula y la superficie de la nanopartícula, así como del grado de modificación adquirido en los pasos anteriormente descritos.

Por último, la liberación de las moléculas de interés por las nanopartículas híbridas orgánico-inorgánico puede ser realizado en cualquier tipo de medio. Preferiblemente, el medio es seleccionado de entre fluido gastrointestinal fluido ocular, fluido nasal, fluido vaginal y fluido seminal, siendo capaz de ser aplicadas directamente o formando parte de otras composiciones como cremas, espráis, líquidos, pastillas o tabletas.

El término “interacción débil” tal y como se emplea aquí se refiere a fuerzas intra o intermoleculares más débiles que un enlace covalente simple o una interacción electrostática entre iones de signo opuesto y en contacto directo. El término comprende las interacciones de van der Waals (incluyendo las fuerzas de Keesom, Debye y London), enlaces de hidrógeno, fuerzas de ion-dipolo y fuerzas de dipolo-dipolo inducido.

El término “agente de acoplamiento de tipo silano” en la presente invención se refiere a moléculas que contienen un átomo de silicio con dos o tres grupos hidrolizables y uno o dos grupos no hidrolizables (preferiblemente alquilos) en los cuales hay uno o más grupos funcionales como amino ( $\text{NH}_2$ ), imida (NH), vinilo ( $\text{CH}=\text{CH}_2$ ), carboxilo ( $\text{C}=\text{OOH}$ ), cetona ( $\text{C}=\text{O}$ ), epóxido (COC), etc. El material poroso es introducido en una solución acuosa de silano cuya concentración determina la energía superficial del material. Tras la reacción, el material es secado a 50 y 120 °C para fijar el injerto.

A menos que sea definido de otra manera, todos los términos técnicos y científicos empleados aquí poseen el mismo significado que el habitualmente empleado por cualquier entendido en la materia a la cual esta invención pertenece. Los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos aquí pueden ser empleados en la

práctica de la presente invención. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variaciones no implican la exclusión de otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Objetos adicionales, ventajas y características de la invención resultaran obvios para un entendido en la materia tras el examen de la descripción o podría aprender mediante la puesta en práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan como ilustración y no son limitantes de la invención.

### BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

**FIG. 1.** a) Espectro FTIR de los materiales pirolizados a diferentes temperaturas y b) detalle del espectro FTIR-ATR de los materiales pirolizados a diferentes temperaturas y funcionalizados con 1% de silano en solución.

**FIG. 2.** Curvas a) Termogravimétricas y b) Calorimetría diferencial de barrido de los materiales pirolizados a diferentes temperaturas y que contienen 1% de silano en solución (la contribución del substrato no funcionalizado ha sido sustraído de los termogramas).

**FIG. 3.** Imágenes de microscopia electrónica de barrido de las partículas pirolizadas a 700 °C y funcionalizadas con el agente de acoplamiento  $\gamma$ -APS en soluciones conteniendo a) y d) 0%  $\gamma$ -APS, b) y e) 0,3%  $\gamma$ -APS y c) y f) 0,5%  $\gamma$ -APS. Magnificación 40k para las imágenes a-c y 70k para las imágenes d-f.

**FIG. 4.** Representación grafica de la evaluación citotóxica de las partículas pirolizadas a 500, 600, 700 y 800 °C en líneas celulares MT-2, THP-1 y HEC-1<sup>a</sup>. La viabilidad celular es expresada como porcentaje de células vivas (%URLs) comparado con un control no tratado (100%). URLs: Unidades relativas de luminiscencia.

**FIG. 5.** Espectro FTIR-ATR de las partículas cargadas con Tenofovir a) conteniendo 1% de silano en disolución y pirolizadas a diferentes temperaturas y b) funcionalizadas con diferentes cantidades de  $\gamma$ -APS y pirolizadas a 700 °C.

**FIG. 6.** Distribución del tamaño de poro de las partículas cargadas con TFV a) conteniendo 1% de silano en disolución y pirolizadas a diferentes temperaturas y b) funcionalizadas con diferentes cantidades de  $\gamma$ -APS y pirolizadas a 800 °C.

**FIG. 7.** A) mg de TFV adsorbido por 100 mg de partículas b) porcentaje de TFV liberado tras 180 minutos en fluido vaginal simulado

**FIG. 8.** Intensidad relativa de las bandas IR tras deconvolucion espectral. Se muestra la intensidad relativa de las bandas correspondientes a) grupos amino libres y b) grupos amino interaccionando (interacciones débiles) con grupos silanol

## EJEMPLOS

### 10 Materiales y Métodos

#### Síntesis y funcionalización de las partículas híbridas. Métodos de caracterización

Trietoxisilano (TrEOS, ABCR, Alemania) se mezcló con polidimetilsiloxano (PDMS, ABCR, Alemania) en una relación en peso de 70:30 y se agitó en isopropanol (iPrOH, Sigma Aldrich, 98%) en un recipiente a temperatura ambiente. La solución se puso en un reactor termostatzado a 70 °C y bajo reflujo y posteriormente, se incorporó una solución que contenía iPrOH, H<sub>2</sub>O y ácido clorhídrico (HCl, Fluka, 32%). La relación molar de los diferentes componentes fue de 4.5: 3: 0.05: 1 (iPrOH: H<sub>2</sub>O: HCl: Trietoxisilano). La solución se dejó reaccionar durante 1 hora a 70 °C con agitación constante. El sol obtenido se vertió en un recipiente de plástico y después de 30 minutos, se añadió lentamente una solución de NH<sub>4</sub>OH 1 M (precaución por emanación de gases). Los recipientes se mantuvieron cerrados durante 1 semana. Periódicamente, los gases se liberaron para evitar la sobrepresión. Los geles se secaron primero a 50 °C y 120 °C hasta peso constante y se pirolizaron bajo un flujo constante de N<sub>2</sub> de 180 ml / min a temperaturas que oscilaban entre 500 y 800 °C. La velocidad de calentamiento y enfriamiento se fijaron a 8 °C / min y los materiales se mantuvieron a la temperatura máxima durante 2 horas.

La superficie de los materiales híbridos obtenidos se modificó mediante el injerto de moléculas del agente de acoplamiento  $\gamma$ -aminopropil trimetoxisilano ( $\gamma$ -APS, Sigma

Aldrich, 99%) en medio acuoso. El  $\gamma$ -APS se hidrolizó durante 1 h en H<sub>2</sub>O a 25 °C y luego se añadió 1 g de las partículas híbridas. El acoplamiento de las moléculas de silano se realiza durante 30 minutos bajo agitación vigorosa y, a continuación, las partículas modificadas superficialmente se filtraron y se secaron a 50 y 120 °C. En este ejemplo se emplean relaciones en peso  $\gamma$ -APS / H<sub>2</sub>O de 0,3, 0,5, 1, 2 y 3%.

Se obtuvieron espectros FTIR-ATR mediante un espectrofotómetro Perkin-Elmer equipado con un accesorio MIRacle™ diseñado para mediciones ATR (Perkin-Elmer, EE. UU.). Para el análisis térmico, se empleó una termobalanza TA Q600 alimentada con un flujo de aire constante de 100 ml / min y crisoles de platino. Se procedió al registro en continuo del cambio de masa y flujo calorífico durante el calentamiento de los materiales a 10 °C / min. Las áreas de superficie específica (SSA) se calcularon mediante la ecuación BET (S. Brunauer, PH Emmett y E. Teller, J. Am. Chem. Soc., 1938, 60, 309-319). Asimismo, las distribuciones de tamaño de poro (PSD), con los cálculos correspondientes de las áreas de superficie de mesoporos (MSA) y los volúmenes de mesoporos (MPV) se obtuvieron mediante el procedimiento BJH (EP Barrett, LG Joyner y PP Halenda, J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 373-380) a partir de las isotermas de adsorción de nitrógeno a 77 K (Tristar 3000, Micromeritics, EE. UU.). Las imágenes de microscopia electrónica de barrido se recogieron en un microscopio FE-SEM HITACHI S-4700. Previamente a la toma de imágenes, las partículas se recubrieron superficialmente con una capa delgada de oro para proporcionar conductividad electrónica adecuada para su observación.

#### Evaluación citotóxica

Se emplearon tres líneas celulares humanas: una línea celular linfoblástica, MT-2 (Harada S, Koyanagi Y, Yamamoto N. Science 229: 563-566, 1985), una línea celular derivada de monocitos y macrófagos, THP-1 (ATCC® TIB-202) y una línea celular epitelial de útero / endometrio, HEC-1-A (ATCC® HTB-112™, amablemente proporcionado por Maria Angeles Muñoz). Todas las líneas celulares se cultivaron en medio de cultivo celular RPMI 1640 humidificado con atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C y suplementado con suero bovino fetal al 10% (v/v), L-glutamina 2 mM y estreptomicina 50 mg/ml (todos los productos biológicos Whittaker MA, Walkerville, MD). Para separar las células HEC-1-A, se retiró el medio y se enjuagó el matraz

durante 10 minutos con 1 a 2 ml de solución de tripsina al 0,25% - EDTA al 0,03%. El medio se reemplazó cada tres días después de la centrifugación celular a 1500 rpm durante 5 minutos.

La toxicidad celular se determinó a través de un ensayo de viabilidad celular a través de la técnica de luminiscencia (CellTiter Glo, Promega, Madison, EE. UU.). Las células se incubaron en placas de 96 pocillos a una densidad de  $10 \times 10^5$  células por pocillo (MT-2 y THP-1) y  $2 \times 10^4$  (HEC-1A) en medio completo. Para evaluar el efecto citotóxico, las células se expusieron a medio fresco que contenía diferentes concentraciones de suspensiones de partículas 5J, 6J, 7J u 8J o la misma concentración de PBS 1x como control. Los experimentos se realizaron por triplicado y el cultivo se mantuvo a 37°C y atmósfera humidificada con CO<sub>2</sub> al 5% durante 48 horas. Se siguió un método estándar para suspender los materiales en PBS 1x (Harald F. Krug, EMPA, S. Manual de calidad: Procedimientos estándar para pruebas de nanopartículas. Nanommune (2011). Después de la incubación de 48 horas, se retiraron los medios de los cultivos celulares y se agregaron 50 µl de reactivo CellTiter Glo a cada pocillo de la placa. Las unidades de luminiscencia relativa (URL) se midieron en un luminómetro (Sirius, Berthold Detection Systems). Las concentraciones citotóxicas 50 (CC50) se calcularon utilizando el software GraphPad Prism (regresión no lineal, inhibidor logarítmico versus respuesta). Los resultados del ensayo citotóxico se muestran como el promedio de al menos tres experimentos individuales.

#### Ensayos de carga y liberación de fármacos

Las partículas se sumergieron en una solución acuosa de Tenofovir (TFV, Carbosynth Limited, Reino Unido) de una concentración conocida. Se mantuvieron en un baño termostático a 37 °C bajo agitación vigorosa durante 180 minutos o hasta que se alcanzó la capacidad de carga máxima del material. La cantidad de TFV cargada se determinó mediante espectroscopia UV-vis (Perkin Elmer, Lambda 25). Después de seleccionar el tiempo óptimo para alcanzar la carga máxima, las partículas se sumergieron en fluido vaginal simulado (SVF23) termostático a 37 °C bajo agitación continua. Durante la carga, la velocidad de agitación se fijó en 45 opm mientras que los experimentos de liberación se realizaron en condiciones

estables a 15 opm. La cantidad de TFV liberado al SVF se determinó por espectroscopia UV-vis.

### **Ejemplo 1. Caracterización de las partículas híbridas funcionalizadas**

La caracterización estructural de las partículas híbridas se realizó mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier, así como para la determinación de la interacción entre el agente de acoplamiento de silano y la superficie de la partícula. Los espectros de FTIR (modo de transmisión) de los materiales pirolizados a diferentes temperaturas se muestran en la figura 1a. La banda característica de la deformación simétrica de los grupos CH<sub>3</sub> en el PDMS y que aparece típicamente a 1264 cm<sup>-1</sup> disminuye su intensidad relativa a medida que aumenta la temperatura de pirolisis, asimismo experimenta un ligero desplazamiento hacia mayores longitudes de onda debido a su descomposición en unidades terminales =CH<sub>2</sub> a medida que progresa la transformación inorgánica. La banda más intensa de los espectros es atribuida a la contribución de los modos de vibración óptica longitudinal y transversal de los enlaces de siloxano ( $\nu$  (Si-O-Si)) en la red híbrida. El centro de la banda, que aparece a 1080 cm<sup>-1</sup>, corresponde a la vibración de la red más similar a la sílice pura, mientras que el modo LO de la red híbrida se desplaza ligeramente a frecuencias más altas cuando aumenta el carácter orgánico. El desplazamiento hacia el rojo debido a la conversión inorgánica del material tiene lugar simultáneamente con el ensanchamiento de las bandas de vibración, una amplitud que es más evidente en la banda atribuida a la tensión simétrica de los enlaces Si-O (banda centrada en 800 cm<sup>-1</sup>).

Babboneau y col. (F. Babonneau, K. Thorne y JD Mackenzie, Chem Mater, 1989, 1, 554-558) describieron la transformación de una débil banda correspondiente a las unidades D en los polímeros PDMS a una banda más intensa y desplazada a 850 cm<sup>-1</sup> cuando D y las unidades Q se encuentran presentes en el copolímero. Al igual que la banda centrada en 1264 cm<sup>-1</sup>, el aumento de la temperatura de pirólisis induce la desaparición progresiva de esta banda relacionada con el PDMS.

Debido a la adsorción de H<sub>2</sub>O inherente a la preparación de las muestras mediante la técnica de KBr, se llevó a cabo la caracterización mediante espectroscopía FTIR-ATR que no precisa de dilución para identificar las diferentes interacciones entre las

moléculas de  $\gamma$ -APS injertadas y la superficie de los materiales híbridos. Son posibles las interacciones debidas a presencia en cada molécula de silano de los tres grupos hidroxilo (Si-OH) y las de la cadena orgánica terminada en grupos  $\text{NH}_2$  ( $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ ). La Figura 1b muestra los espectros infrarrojos el rango 5  
espectral  $1400\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$  de las diferentes partículas que contienen 1% de  $\gamma$ -APS y en donde se observa claramente que, dependiendo de la temperatura de pirólisis, la interacción del agente de acoplamiento con la superficie de las partículas híbridas ocurre de manera similar. Esta interacción no depende exclusivamente de la temperatura de pirólisis (es decir, el contenido de la fase orgánica) sino también de 10  
la cantidad de  $\gamma$ -APS.

Los grupos amino libres aparecen reflejados en el espectro a aproximadamente  $1520\text{ cm}^{-1}$ , mientras que la banda ubicada a una longitud de onda de  $1590\text{ cm}^{-1}$  es debida a las interacciones de hidrógeno (zwitteriones) con la superficie de la partícula. Las interacciones débiles con otros grupos amino o silanol de las 15  
moléculas adyacentes  $\gamma$ -APS desplazan la banda de zwitterion a una longitud de onda más alta. Aquí, observamos que, para la misma concentración de agente de acoplamiento de silano, a  $500\text{ }^\circ\text{C}$  las interacciones preferidas son  $-\text{SiOH}-\text{H}_2\text{N}-$  sin interacciones entre los grupos amino de las moléculas de silano, mientras que, al aumentar la temperatura, la interacción  $\text{NH}_2-\text{H}_2\text{N}$  adquiere más relevancia.

20 La intensidad relativa de estos espectros no puede tomarse como una cuantificación de las moléculas de  $\gamma$ -APS adsorbidos en la superficie de los materiales debido a las características inherentes de las mediciones de ATR (diferente ángulo de incidencia en partículas y porosidad). Para tal fin, se ha empleado análisis termogravimétrico (Figura 2a) que permite el cálculo de la 25  
cantidad de  $\gamma$ -APS adsorbido en la superficie del material a través de su pérdida en peso. Como se observa en la Figura 2a, el material que incorpora la cantidad máxima del agente de acoplamiento de silano es el que se pirolizó a  $800\text{ }^\circ\text{C}$  ya que muestra la mayor pérdida de peso con el aumento de la temperatura. En esta muestra, se observa una primera disminución de peso que no correspondería a la 30  
desorción de la molécula de silano sino al  $\text{H}_2\text{O}$  adsorbido en la superficie. Las curvas de calorimetría diferencial de barrido (Figura 2b) sugieren que el mecanismo de adsorción en la superficie del material es diferente dependiendo de la

temperatura de pirólisis. A temperaturas de pirolisis de 500 - 600 °C, el mecanismo de adsorción preferencial es la fisisorción de las moléculas, mientras que en las muestras pirolizadas a 700 y 800 °C los agentes de acoplamiento están quimisorbidos. La formación de una monocapa de silano funcional en la superficie de los materiales es uno de los factores críticos para la adhesión. Esto minimiza la formación de silanos fisisorbidos, es decir, un revestimiento multicapa débilmente unido que afecta la funcionalidad del material en un entorno agresivo.

El análisis de las curvas DSC de los diferentes materiales muestra que la dependencia del mecanismo de adsorción no es exclusiva de la temperatura de pirólisis, sino también de la cantidad de silano en solución. En las muestras pirolizadas a baja temperatura (500 y 600 °C), el agente de acoplamiento se fisisorbe primero y, al aumentar la cantidad de silano en solución, se adsorbe químicamente. En los materiales pirolizados a las temperaturas más altas el comportamiento es el opuesto. El silano se adsorbe químicamente en la superficie del material hasta la formación de la monocapa y luego, los mecanismos de fisisorción dominan la funcionalización.

La disminución del área específica superficial (SSA) es otra evidencia de la eficiencia de la funcionalización. Excepto en las muestras pirolizadas a 500 y 600 °C, hay una marcada disminución del SSA con la cantidad de silano en disolución (Tabla 1). Las isotermas son de tipo IV, de acuerdo con la clasificación IUPAC, y son características de materiales micro-mesoporosos. Las ramas de desorción forman dos tipos de bucles de histéresis, siendo el observado en el rango de presión parcial alta (mesoporos más grandes) de un tipo H3, lo que indica poros en forma de grietas y, a presión parcial más baja (poros más pequeños), los poros serían de tipo cilíndrico, como se deduce a partir de la forma del ciclo de histéresis de tipo H2.

Tabla 1. Área específica superficial (determinada por el método BET), volumen de microporos (determinado por el método t-plot) y volumen de mesoporos (determinado por el método BJH) de los materiales preparados

% APS $\gamma^-$	500			600			700			800		
	BET (m <sup>2</sup> /g)	V <sub>micro</sub> cm <sup>3</sup> /g	V <sub>meso</sub>	BET (m <sup>2</sup> /g)	V <sub>micro</sub> cm <sup>3</sup> /g	V <sub>meso</sub>	BET (m <sup>2</sup> /g)	V <sub>micro</sub> cm <sup>3</sup> /g	V <sub>meso</sub>	BET (m <sup>2</sup> /g)	V <sub>micro</sub> cm <sup>3</sup> /g	V <sub>meso</sub>
0	553	0,178	0,908	710	0,260	1,176	611	0,208	1,063	658	0,180	1,242

0,3	500	0,146	0,910	704	0,252	1,253	571	0,164	1,000	530	0,250	0,851
0,5	484	0,164	0,872	702	0,202	1,220	570	0,189	0,992	518	0,195	0,853
1	480	0,131	0,861	697	0,263	1,259	531	0,199	0,969	490	0,237	0,813
2	465	0,145	0,794	701	0,206	1,211	526	0,183	0,912	405	0,171	0,621
3	504	0,210	0,882	643	0,199	1,169	514	0,199	0,900	395	0,162	0,623

En las imágenes de SEM se muestra el carácter poroso de las partículas (figura 3), Cuando el material híbrido se sumerge en las soluciones que contienen el agente de acoplamiento de silano, se observa una ligera agregación de las partículas, pero en ningún caso, se pierde su carácter de material nanoestructurado, En las imágenes de alto aumento se aprecia que la superficie de las partículas está completamente cubierta por nanoagregados, a cuya presencia se le atribuye la aparición de microporosidad,

A medida que las múltiples capas de  $\gamma$ -APS se van agregando en la superficie de las partículas, el área superficial también disminuye, El agente de acoplamiento  $\gamma$ -APS se dispone preferiblemente en la superficie de los poros más grandes, tal y como se deduce de la disminución del volumen de mesoporos mostrado en la Tabla 1, En ningún caso, los microporos son accesibles para el agente de acoplamiento, La muestra que, tras la pirolisis, que poseía el mayor valor de área superficial (SSA), fue la tratada 600 °C; no obstante, debido a la formación de los agregados en la superficie, no se aprecia una variación significativa en el volumen del mesoporo tras su funcionalización, Después de cargar las moléculas del fármaco TFV, el SSA experimenta una segunda disminución debido al llenado de los poros pequeños por las moléculas del fármaco, A partir de los datos recogidos en la Tabla 1 y la Tabla 3 se puede apreciar una disminución de la SSA en todos los materiales cargados con TFV excepto en las muestras pirolizadas a 500 °C, Esta disminución es mayor a medida que aumenta la temperatura de pirólisis y, nuevamente, es más pronunciada en la muestra pirolizada a 800 °C y aumenta con la funcionalización, De la Figura 7, se esperaría una disminución del SSA correlacionada con la cantidad de silano, Sin embargo, la muestra pirolizada a 700 °C es la única muestra donde observamos una relación entre la funcionalización de la superficie y la capacidad de carga del fármaco,

**Ejemplo 2, Evaluación de la citotoxicidad**

Para estudiar la toxicidad celular, las partículas sintetizadas se incubaron y suspendieron en los medios de dilución a temperatura ambiente durante las 48 horas previas al ensayo con el objeto de asegurar que cualquier componente tóxico potencial estará presente en los cultivos a analizar, A continuación, el cultivo celular se trató con una suspensión de diluciones en serie de base 5 de la suspensión más concentrada (1000 µg/ml), Los experimentos se realizaron en líneas celulares derivadas de monocitos macrófagos y linfoblásticos (MT-2) para evaluar la toxicidad en las células inmunes presentes en las mucosas vaginales o uterinas, y en una línea celular epitelial del útero (HEC-1A) para evaluar el daño potencial en la integridad de las mucosas,

Tabla 2. Resultados del análisis de citotoxicidad de los materiales analizados en células MT-2, THP-1 y HEC-1A, Las concentraciones citotóxicas 50 (CC50) se calcularon utilizando el software GraphPad Prism

Temperatura pirólisis (°C)	CC <sub>50</sub> µg/mL (CI95%; R2)		
	de HEC-1A	THP1	MT-2
500	>1000	>1000	>1000
600	>1000	>1000	>1000
700	>1000	>1000	>1000
800	≈1000	≈1000	447,5 (269,0-765,0; 0,9012)

15

Tal y como se muestra en la Figura 4 y la Tabla 2, las muestras pirolizadas a 700 °C o menos son todas biocompatibles en los tres tipos de células, mostrando valores de CC50 superiores a 1000 µg / ml, la concentración máxima probada, Solo la muestra pirolizada a 800 °C mostró toxicidad celular en los tres tipos de células, mostrando una toxicidad ligeramente mayor en las células MT-2, la línea celular linfoblastoidea, con un valor CC50 de 447,5 µg / ml, Sin embargo, los efectos tóxicos sobre las células monocíticas THP-1 y las células epiteliales HEC-1A solo aparecieron a concentraciones de alrededor de 1000 µg / ml, mostrando un efecto tóxico solo a altas concentraciones,

25

### Ejemplo 3, Capacidad de carga y liberación de fármacos

De manera similar a como se realizó en la sección anterior, se determinaron las interacciones que ocurren entre la superficie de las partículas híbridas funcionalizadas y los grupos funcionales de la molécula del fármaco, El fármaco tenofovir posee un espectro FTIR complejo donde coexisten varias bandas de vibración de los enlaces N – H y deformaciones fuera de plano de los enlaces C – H en el rango de frecuencias comprendido entre 900–600  $\text{cm}^{-1}$ , El modo de vibración *stretching* de los enlaces C-N y C = N aparecen en el espectro alrededor de 1250  $\text{cm}^{-1}$  para el enlace simple, mientras que los enlaces de tipo aromáticos aparecen entre 1410 y 1450  $\text{cm}^{-1}$ , A 1695  $\text{cm}^{-1}$  se puede encontrar la banda correspondiente al modo de *stretching* del grupo fosfato, así como la vibración de tipo tijera de los enlaces del grupo  $\text{NH}_2$  a 1550 y 1570  $\text{cm}^{-1}$ , En presencia de agua, las vibraciones tipo *stretching* de los enlaces N-H suelen verse desplazadas hacia el rojo aproximadamente unos 10  $\text{cm}^{-1}$ , mientras que el modo de vibración de tipo tijera de  $\text{NH}_2$  no se ve afectado, En los espectros de la Figura 5, se observa que las bandas correspondientes a la funcionalización con  $\gamma$ -APS se superponen parcialmente a las bandas correspondientes al TFV cargado en las partículas, No podemos distinguir la contribución efectiva ni del silano ni del tenofovir, pero, en general, a medida que aumenta la temperatura de pirólisis, y para la misma cantidad de silano (Figura 5 a), se observa un aumento en la intensidad y amplitud de la banda, lo que indicaría que ambos componentes están adheridos a la superficie, Centrando nuestra atención en una sola temperatura de pirólisis (Figura 5b), la tendencia general es un aumento de la intensidad con la concentración de  $\gamma$ -APS, Sin embargo, se ha de precisar que, este aumento podría atribuirse a la contribución de las bandas  $\gamma$ -APS a los espectros,

Las moléculas de TFV cargadas sobre las partículas inducen una reducción de su SSA, especialmente en aquellas muestras pirolizadas a 700 y 800 °C, La Tabla 3 recoge el SSA las muestras cargadas determinado por BET, así como el volumen de micro y mesoporos, calculados a través de la aplicación del método t-plot y los métodos BJH, respectivamente, En las muestras tratadas térmicamente a 500 y 600 °C solo encontramos ligeras variaciones en el volumen de mesoporos, mientras que el volumen de microporos permanece casi inalterado, Al aumentar la temperatura,

el tamaño medio de poro, calculado a partir de las distribuciones de tamaño de poro, disminuye progresivamente (Figura 6a), siendo esta disminución más pronunciada cuando aumenta la cantidad de  $\gamma$ -APS (Figura 6b),

Esta disminución de SSA es más pronunciada en las muestras pirolizadas a 700 y 800 °C y de alguna manera está relacionada con el contenido de  $\gamma$ -APS en solución, En las distribuciones de tamaño de poro de las partículas funcionalizadas (no mostradas aquí) observamos una disminución del volumen de poro, pero no en el tamaño de poro medio, mientras que en las muestras cargadas con TFV, el volumen de micro y mesoporos se acompaña de una reducción en el diámetro de poro medio, Este hecho sugiere que las moléculas de  $\gamma$ -APS llenan la superficie de los poros independientemente de su diámetro, lo que lleva a una disminución en el volumen de poros pero no en el tamaño medio de poros (calculado a partir de la PSD), El comportamiento del TFV es completamente diferente ya que las moléculas ocupan preferiblemente la superficie de los poros de aproximadamente 8-9 nm mientras que el fármaco no alcanza los poros pequeños, de 3-4 nm,

Tabla 3. Área específica superficial (determinada por BET), volumen de microporos (determinado por el método t-plot) y volumen de mesoporos (determinado por el método BJH) de los materiales preparados y cargados con la cantidad máxima de TFV

% APS	500			600			700			800		
	BET	V <sub>micro</sub>	V <sub>meso</sub>									
	(m <sup>2</sup> /g)	cm <sup>3</sup> /g		(m <sup>2</sup> /g)	cm <sup>3</sup> /g		(m <sup>2</sup> /g)	cm <sup>3</sup> /g		(m <sup>2</sup> /g)	cm <sup>3</sup> /g	
0	534	0,119	1,456	679	0,158	1,348	562	0,270	1,133	427	0,139	0,600
0,3	554	0,003	1,131	687	0,235	1,402	551	0,129	1,126	316	0,131	0,607
0,5	594	0,028	1,233	669	0,173	1,407	459	0,082	0,985	281	0,109	0,615
1	546	0,056	1,147	665	0,226	1,376	398	0,071	0,844	243	0,094	0,614
2	517	0,255	1,059	653	0,189	1,354	325	0,047	0,707	230	0,083	0,521
3	537	0,186	1,100	626	0,178	1,365	323	0,082	0,751	202	0,015	0,499

20

Como se mencionó anteriormente, la muestra pirolizada a la temperatura más baja experimentó un aumento en el SSA después de los experimentos de carga, Este aumento de SSA podría atribuirse a la creación de nuevos microporos (ver Tabla 3) debido al estrés creado en la estructura híbrida cuando las partículas se sumergieron en el medio de carga, Cuando la temperatura de pirólisis aumenta, la

25

estructura híbrida posee una consistencia mayor (se vuelve más inorgánica) dando como resultado una disminución general del volumen de microporos debido a la incorporación del fármaco, Solo en la muestra pirolizada a 700 °C, donde se encuentra una relación directa entre la funcionalización y la cantidad de fármaco cargado, tanto el volumen micro como el mesoporo disminuyen progresivamente con la funcionalización, La presencia de microporos o porosidad intra-pared ejerce un obstáculo en la difusión de las moléculas del fármaco a lo largo del material, El obstáculo de difusión se aplica tanto a las capacidades de carga como de liberación, como ya se describió en materiales micro-mesoporosos cargados con ampicilina y dasatinib, En estos materiales, el mecanismo de adsorción de TFV de la superficie de las partículas se describió siguiendo el modelo de Langmuir, que supone la formación de una monocapa completa de la molécula del fármaco en la superficie de las partículas porosas, Se ha predicho que la energía de la superficie sería homogénea de tal manera que todos los sitios de la superficie presenten la misma energía para la adsorción, No solo la presencia de micro y mesoporos, sino también la funcionalización amino del  $\gamma$ -APS influye en la adsorción de TFV a medida que se modifica la energía de la superficie, lo que permite una interacción química entre las moléculas de TFV y las superficies de los materiales, Se ha descrito un comportamiento similar en la carga de diferentes moléculas de fármacos como la molsidomina, el azul de metileno o el ibuprofeno en diferentes sílices mesoporosas con diferente cristalinidad, morfología y áreas de superficie, La funcionalización de la amina superficial resulta ser un factor determinante en la velocidad de adsorción, Además, la incorporación de moléculas lipídicas cuya función es actuar como portador del fármaco en huéspedes orgánicos o híbridos puede evitar la formación de fuertes enlaces covalentes entre los grupos funcionales de la matriz y el fármaco creando interacciones de hidrógeno con la participación de los grupos amino del lípido,

Con objeto de examinar la capacidad de carga del fármaco, se empleó la técnica de espectroscopía UV-Vis (espectros no mostrados aquí) para determinar así la concentración en solución del fármaco TFV después de cargarse en las partículas, El tiempo en que se alcanza la capacidad de carga máxima se determinó mediante la toma de una alícuota del licor de carga y midiendo la cantidad de TFV en solución en el momento específico, Como se muestra en la Figura 7a, la muestra

que presenta la capacidad de carga máxima es la que se pirolizó a 800 °C y la cantidad de grupos funcionales de superficie no influye en su capacidad de carga, Por el contrario, la muestra pirolizada a 700 °C presenta una clara dependencia de la funcionalización con la cantidad cargada de TFV (a tener en cuenta que estos  
5 gráficos no están normalizados a la SSA),

Estas dos muestras también presentan una excelente capacidad de liberación, con porcentajes de liberación cercanos al 90% del TFV adsorbido (Figura 7b), Por otro lado, ni la muestra pirolizada a 500 ni la tratada térmicamente a 600 °C exhibe un comportamiento aceptable para este fármaco ya que, aparte de la escasa  
10 capacidad de adsorción, solo se liberó el 5% del TFV adsorbido,

En conclusión, los materiales híbridos preparados han demostrado que la estructura porosa y las características de la superficie también determinarán su comportamiento como portadores de fármacos,

La disposición de las moléculas  $\gamma$ -APS en la superficie de los materiales híbridos  
15 juega un papel determinante en el tipo de interacciones con la molécula del fármaco, Por lo tanto, se ha realizado el análisis por desconvolución de los espectros de FTIR en la región donde aparecen las bandas principales del agente de acoplamiento de silano, y así determinar la disponibilidad de los grupos funcionales propensos a interactuar con el TFV, Como se muestra en la Figura 8, la  
20 intensidad relativa de la banda correspondiente a los grupos amino libres aumenta con la cantidad de  $\gamma$ -APS en solución solo en la muestra pirolizada a 800 °C, A temperatura más baja, hay un máximo en las concentraciones 0,5, 1 y 0,25%  $\gamma$ -APS para las muestras pirolizadas a 500, 600 y 700 °C, respectivamente, Estas diferencias se deben a las diferentes características superficiales de los materiales  
25 pirolizados a diferentes temperaturas, En el caso de los materiales pirolizados a bajas temperaturas, la presencia de residuos orgánicos provenientes del PDMS minimizó la adsorción del agente de acoplamiento de tipo silano,

El silano injertado forma interacciones débiles cerca de los grupos de silanol, ya sea provenientes de las funcionalidades de silanol de la superficie o con otros grupos  
30 Si-OH hidrolizados del propio silano, Este es el caso de las muestras pirolizadas a 500 y 600 °C, que forman agregados  $\gamma$ -APS no unidos a la superficie del material

híbrido, En las muestras pirolizadas a 700 °C, después de la formación de la monocapa a la concentración mínima de  $\gamma$ -APS, las moléculas del agente de acoplamiento comienzan a interactuar entre sí, Únicamente en el caso de la muestra pirolizada a 800 °C, podemos encontrar la misma proporción de grupos amino libres y formas zwitteriónicas,

Por otro lado, se ha observado que en las muestras pirolizadas a la temperatura más baja, los agregados de  $\gamma$ -APS se descomponen a temperaturas alrededor de 250 °C, Al aumentar la temperatura de pirólisis a 600 °C, la interacción con la superficie es ligeramente mayor y la eliminación del silano adsorbido ocurre exotérmicamente a aproximadamente 270 °C, En la muestra pirolizada a 700 °C, la monocapa de  $\gamma$ -APS se elimina mediante una reacción endotérmica, mientras que las capas subsiguientes de  $\gamma$ -APS que se forman sobre ella se eliminan a temperaturas cercanas a 320 °C, De manera similar a lo que sucede en la muestra tratada térmicamente a 800 °C, la temperatura de descomposición del  $\gamma$ -APS disminuye con el aumento de la cantidad de  $\gamma$ -APS,

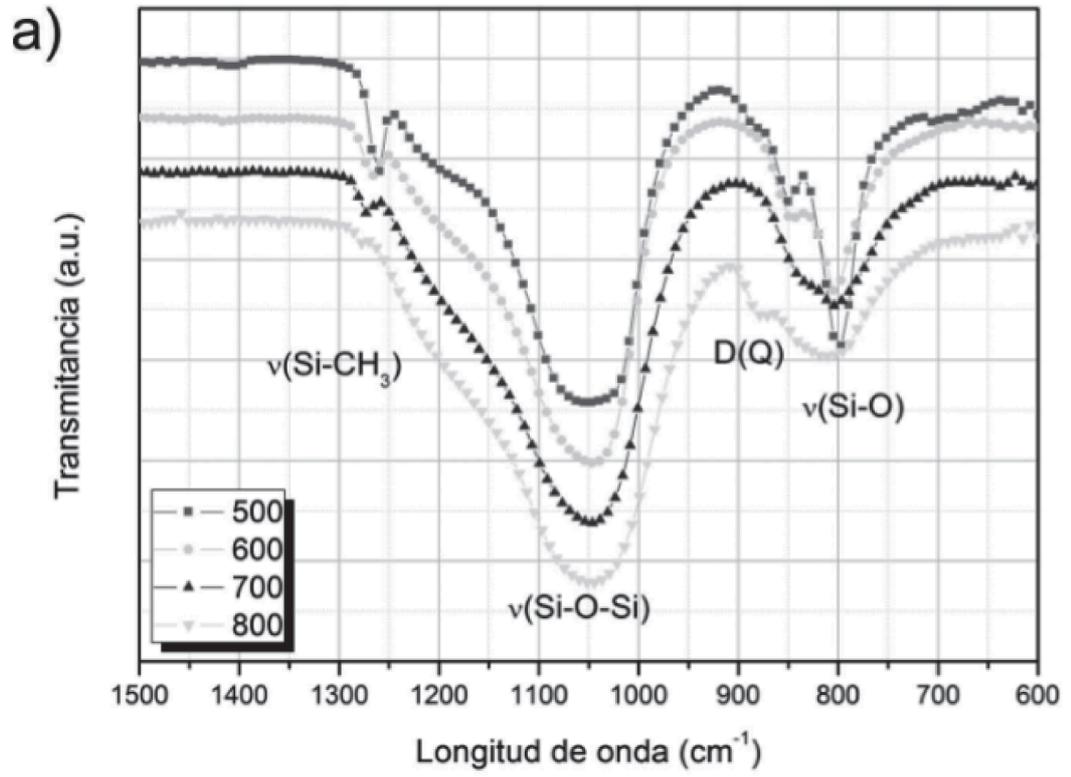
En conclusión, a las temperaturas de pirólisis más bajas, la capacidad de absorción del fármaco es la más baja (a pesar de la elevada área superficial encontrada en la muestra pirolizada a 600 °C) ya que casi no hay grupos libres  $\text{-NH}_2$  disponibles para interactuar con la molécula del fármaco, La capacidad de liberación también es la más baja, lo que indica que la interacción con la molécula del fármaco está en forma de un enlace químico, A 700 °C se observa una fuerte correlación entre la cantidad de  $\gamma$ -APS adsorbido en la superficie y la capacidad de adsorber al TFV, Mientras que en el caso de la muestra no funcionalizada, la capacidad de liberación es bastante baja, la incorporación del  $\gamma$ -APS aumenta sustancialmente la cantidad de TFV en los medios de liberación, Se observa que, cuando los grupos libres  $\text{-NH}_2$  están presentes, la capacidad de liberación es la más baja, un hecho que se atribuye nuevamente a la formación de los enlaces químicos, En el caso de la muestra pirolizada a 800 °C se alcanzan capacidades de liberación de aproximadamente el 95%, En esta muestra hay la misma cantidad de formas libres de amino y zwitteriónico, por lo que la interacción de la molécula del fármaco con la superficie de las partículas híbridas debe ser débil,

## REIVINDICACIONES

1. Nanopartícula híbrida y porosa orgánica-inorgánica con una superficie funcionalizada térmicamente para la liberación sostenida de moléculas, caracterizada por que la nanopartícula comprende una monocapa de silano que comprende enlaces químicos seleccionados de entre Si-N, Si-O y Si-M en donde M es un elemento seleccionado de Si, Zr, Ti, Al y B; y en el que esa monocapa se funcionaliza por quimisorción con un agente de acoplamiento de silano, que permite una interacción débil con la molécula a liberar, en un porcentaje con respecto a la monocapa de silano que oscila entre el 0,1 y el 3% en peso total.
2. Nanopartícula según la reivindicación 1, donde el agente de acoplamiento de silano se selecciona de entre un amino silano, epoxi silano, mercapto silano, fenil silano, isocianato silano, metacrilato silano y vinil silano.
3. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde el agente de acoplamiento de silano es  $\gamma$ -aminopropil trimetoxisilano.
4. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el porcentaje del agente de acoplamiento de silano varía entre 0,1 y 1% en peso.
5. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la nanopartícula comprende además la molécula a liberar, que se selecciona de entre fármacos, pigmentos, cosméticos, sabores, olores o nutrientes.
6. Nanopartícula según la reivindicación 5, donde la molécula es un fármaco.
7. Nanopartícula según la reivindicación 6, donde la molécula es un fármaco antiviral.
8. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 6 y 7, en donde la molécula es Tenofovir.

9. Composición que comprende la nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8.
- 5 10. Composición según la reivindicación 9, donde la composición es una composición farmacéutica o cosmética.
11. Un proceso de obtención de la nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende al menos los siguientes pasos:
- 10 a) Síntesis de material híbrido orgánico-inorgánico basado en silicio, que comprende elementos seleccionados de entre Si, Zr, Ti, Al o B, mediante un proceso seleccionado de sol-gel, polimerización y sonicación;
- (b) Pirólisis del material obtenido de la etapa (a) a una temperatura que oscila entre 500 y 800 °C en una atmósfera controlada;
- 15 (c) Opcionalmente, modificación de la superficie del material obtenido de la etapa (b) por métodos químicos, físicos o mecánicos;
- (d) Funcionalización de la superficie del material obtenido de la etapa (b) o (c) por quimisorción con un agente de acoplamiento de silano;
- 20 en donde la formación de la porosidad por molienda del material tiene lugar antes, durante o después de la pirólisis de la etapa (b) para ajustar el tamaño de partícula a un tamaño que oscila entre 0,1 y 100 micras.
12. Proceso según la reivindicación 11, donde la etapa (a) es un proceso sol-gel, donde el material de partida de silicio se selecciona de entre TEOS, MTEOS, TREOS, PDMS y PMPS.
- 25 13. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, donde el material híbrido en la etapa (a) se prepara mediante un proceso sol-gel usando trietoxisilano como material de partida.
- 30 14. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, donde la pirólisis en la etapa (b) tiene lugar a una temperatura que oscila entre 700 y 800°C.

15. Proceso según la reivindicación 14, donde la temperatura de pirólisis en la etapa (c) es 700°C.
- 5 16. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, donde la superficie del material obtenido de la etapa (b) se modifica en la etapa (c).
- 10 17. Proceso según las reivindicaciones 11 a 16, donde la funcionalización de la superficie en la etapa (d) tiene lugar con un agente de acoplamiento de tipo silano seleccionado de entre un amino silano, epoxi silano, mercapto silano, fenil silano, isocianato silano, metacrilato silano, y vinil silano.
- 15 18. Proceso según la reivindicación 17, donde el agente de acoplamiento de silano es  $\gamma$ -aminopropil trimetoxisilano.
- 20 19. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 18, que además comprende una etapa (g) que consiste en la interacción entre la nanopartícula de la etapa (f) con una molécula de interés seleccionada de entre fármacos, pigmentos, cosméticos, sabores, olores o nutrientes.
- 25 20. Proceso según la reivindicación 19, donde la molécula es Tenofovir.
21. Uso de la nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la liberación sostenida de moléculas.
22. Uso según la reivindicación 21, donde la molécula es un fármaco.
23. Composición según la reivindicación 10 para uso como medicamento.



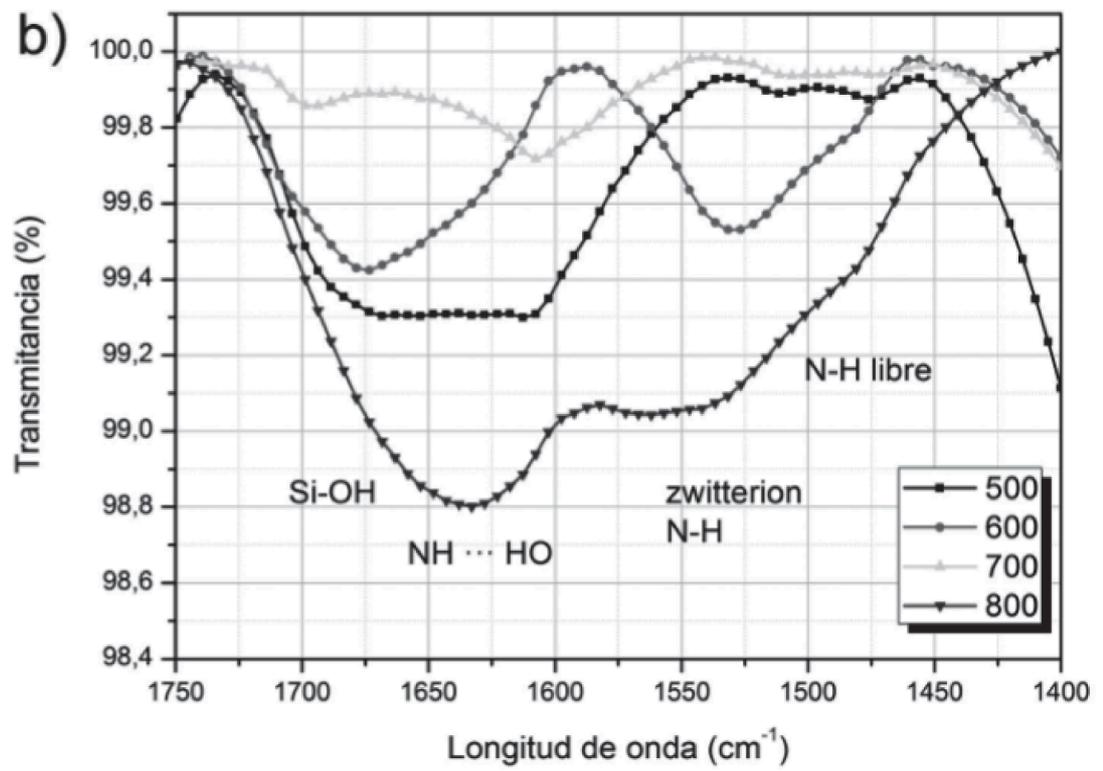


FIG. 1

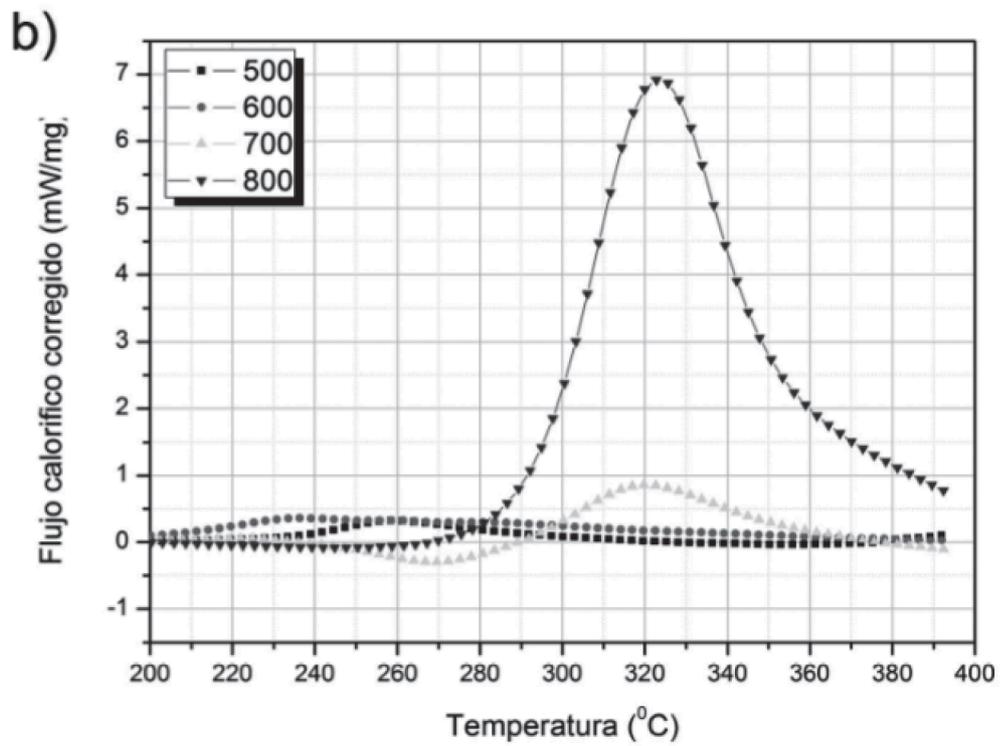
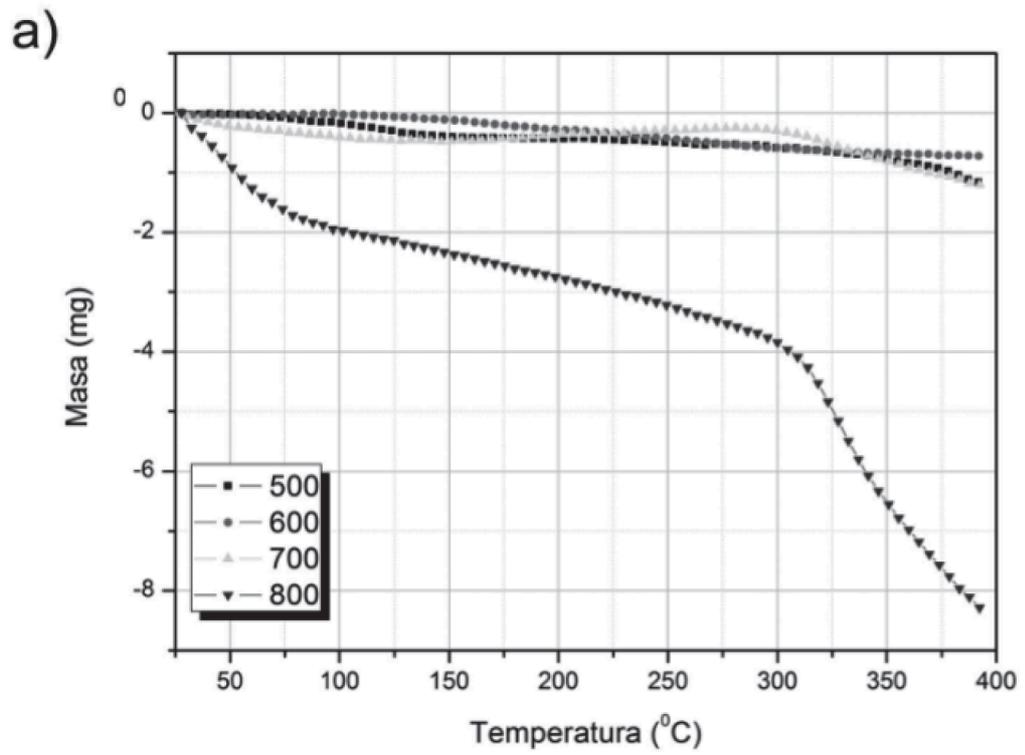
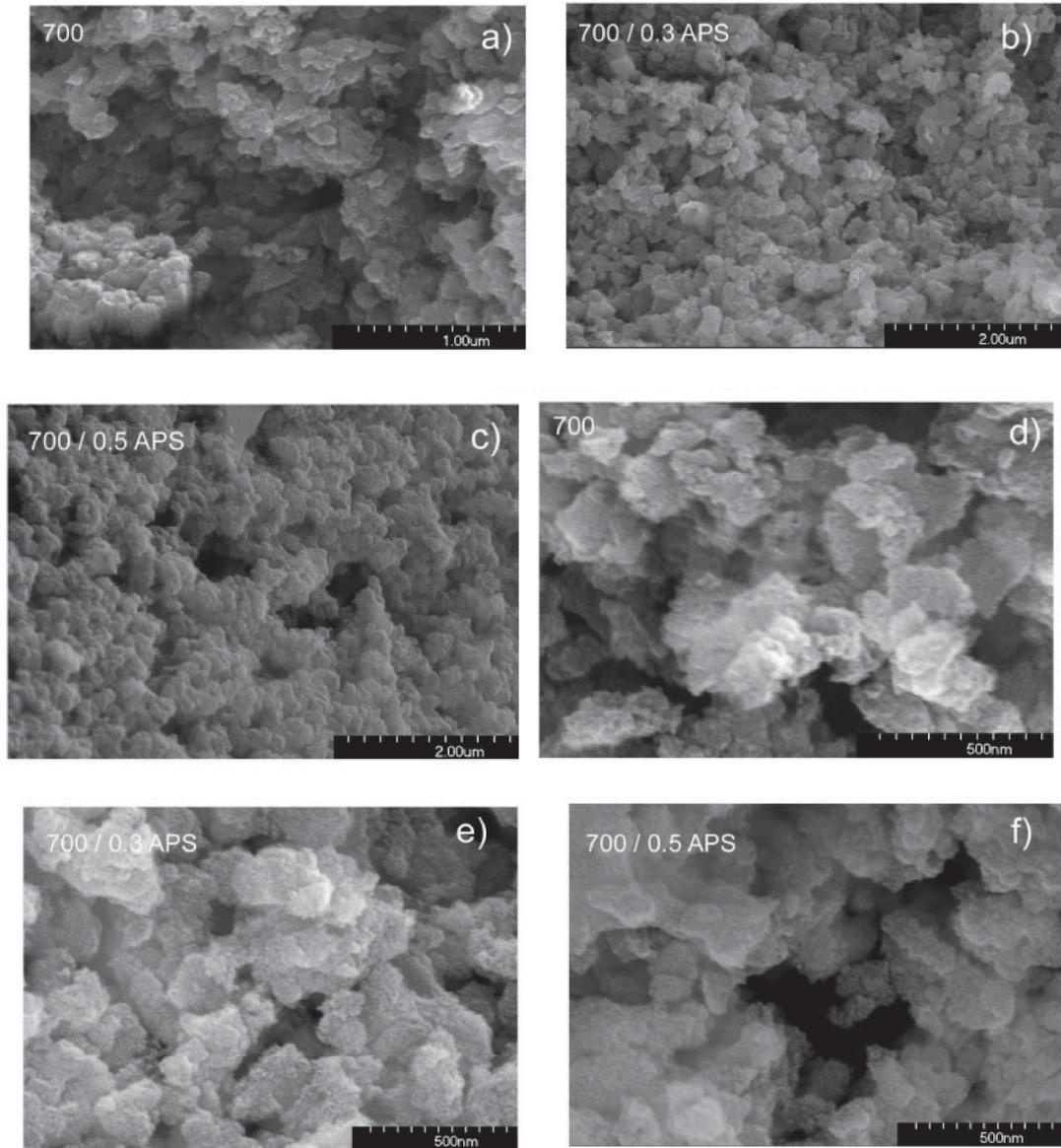


FIG. 2



**FIG. 3**

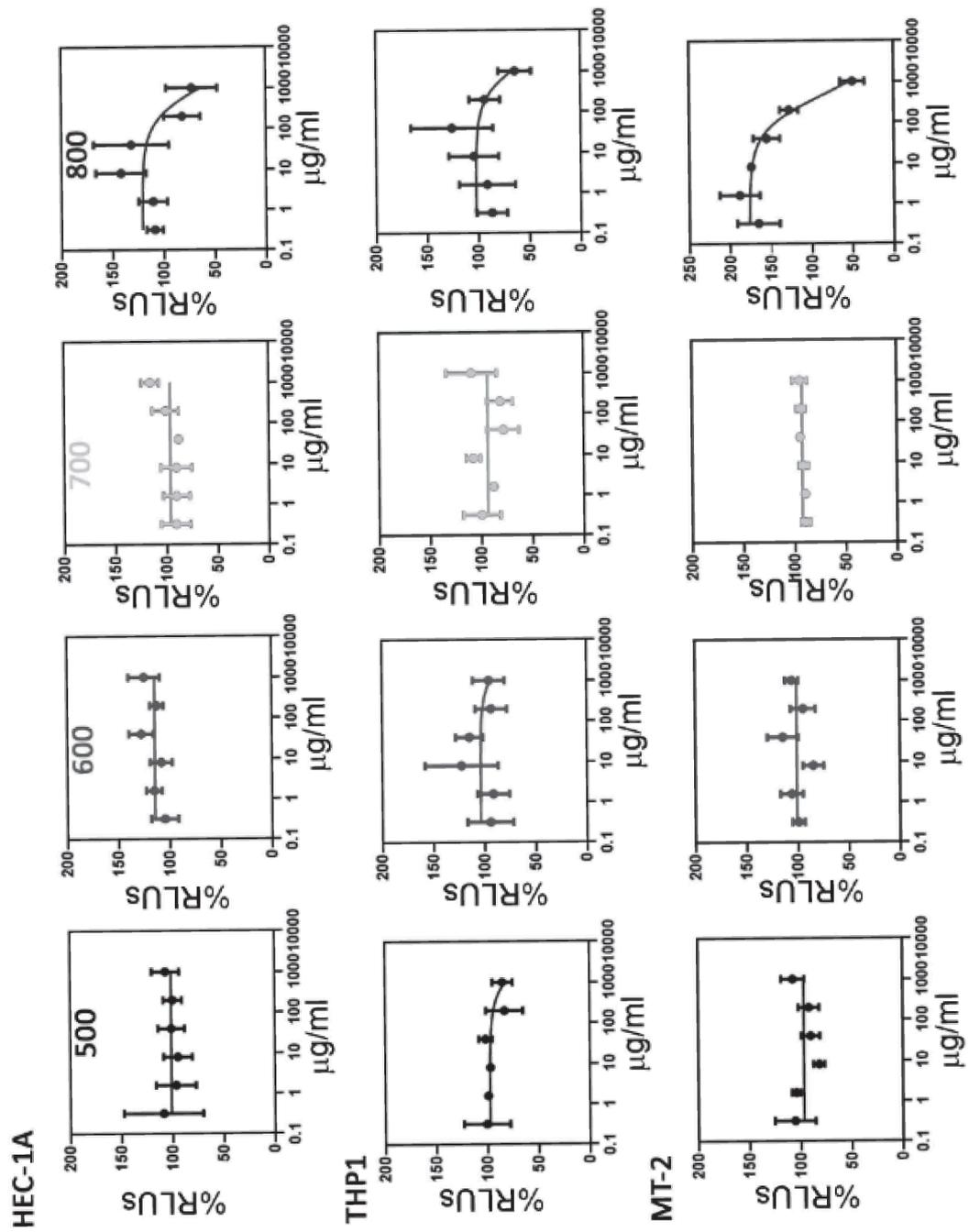


FIG. 4

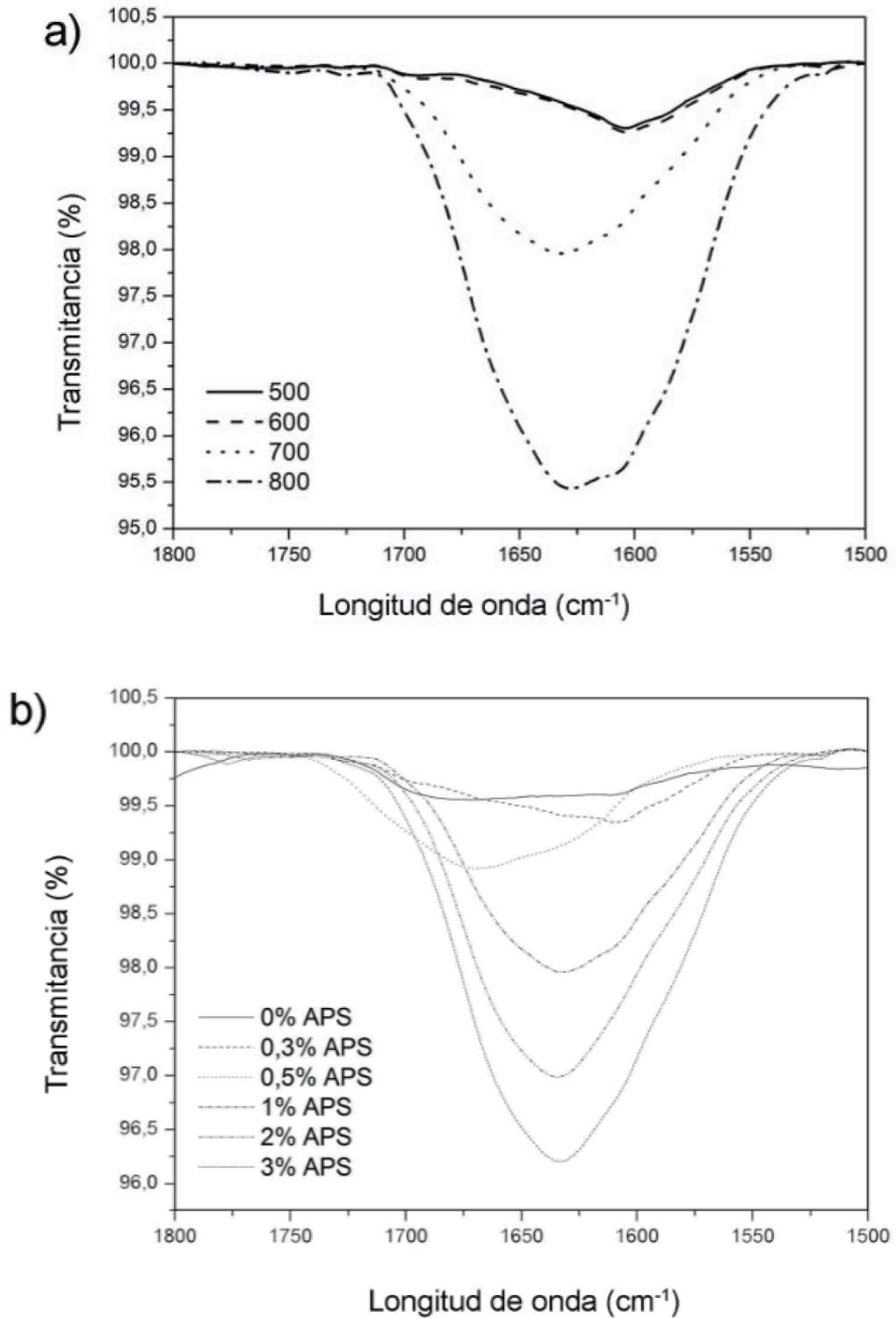


FIG. 5

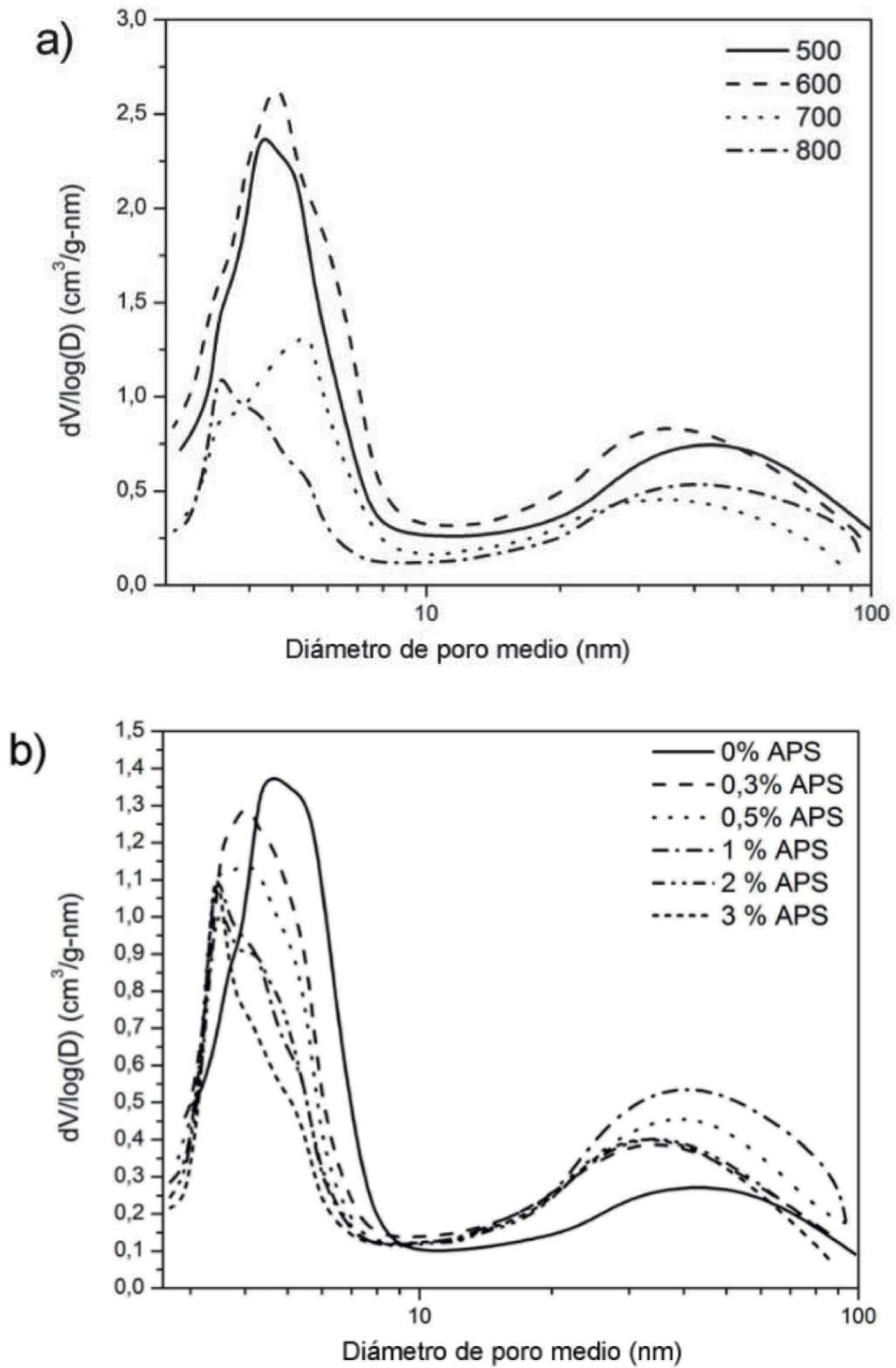


FIG. 6

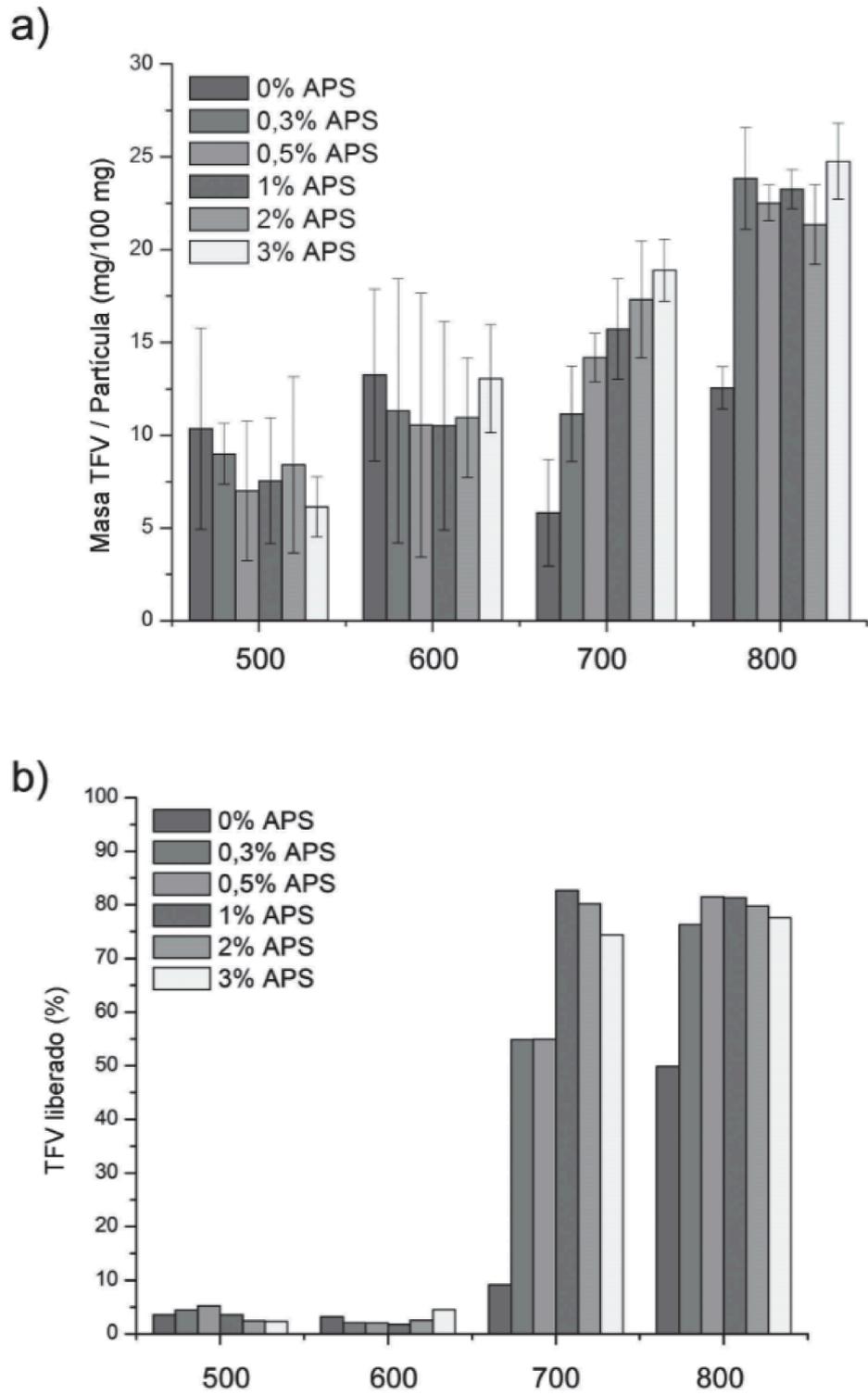


FIG. 7

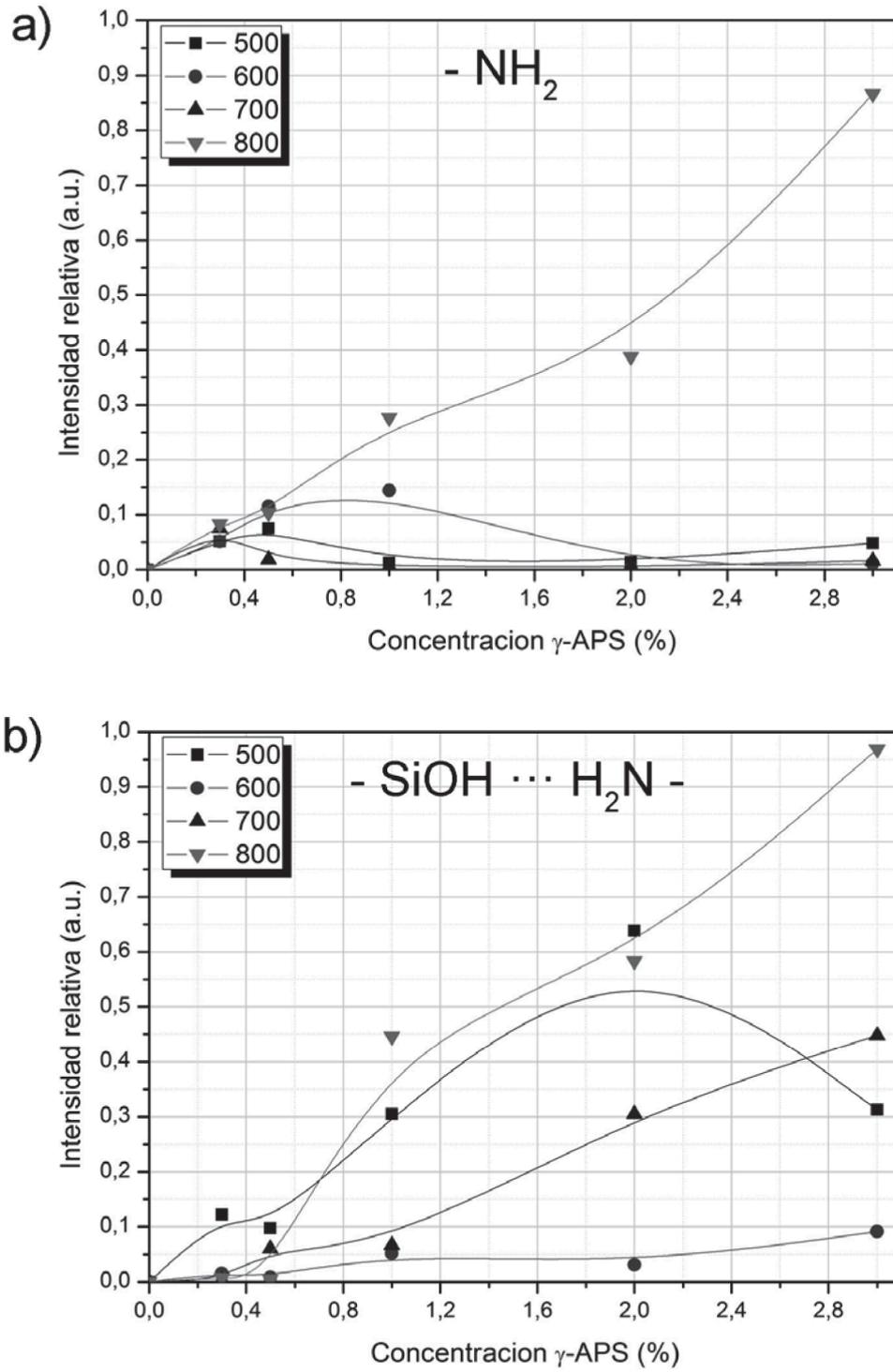


FIG. 8



- ②1 N.º solicitud: 202030249  
②2 Fecha de presentación de la solicitud: 26.03.2020  
③2 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤1 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤6 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	TAMAYO A <i>et al.</i> Mesoporous silicon oxycarbide materials for controlled drug delivery systems. Chemical Engineering Journal 20151105 Elsevier nld. 05/11/2015, Vol. 280, Páginas 165 - 174, ISSN 1385-8947 (print), <DOI: doi:10.1016/j.cej.2015.05.111>. página 166, columna derecha, segundo, tercer, cuarto y quinto párrafos; página 167, columna izquierda, cuarto párrafo- página 167, columna derecha, tercer párrafo; página 169, columna derecha, primer párrafo; Tabla 1; Tabla 3.	1-23
A	YASIR MEHMOOD <i>et al</i> Amino-decorated mesoporous silica nanoparticles for controlled sofosbuvir delivery. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 14/12/2019, Vol. 143, páginas 2-10, ISSN 0928-0987, <DOI: doi.org/10.1016/j.ejps.2019.105184>, página 2, columna izquierda, párrafo cuarto; página 2, columna derecha, tercer y cuarto párrafos; página 3, columna izquierda, tercer párrafo; página 9, columna derecha, segundo párrafo; resumen.	1-23
A	TAMAYO A. <i>et al.</i> Surface and Structural Modification of Nanostructured Mesoporous Silicon Oxycarbide Glasses Obtained from Pre-ceramic Hybrids Aged in NH <sub>4</sub> OH. J. Am. Ceram. Soc, 2013, Vol. 96, Nº 1, Páginas 323-330, página 324, columna izquierda, segundo párrafo; página 324, columna derecha, segundo párrafo.	1-23
A	M. ALEJANDRA MAZO <i>et al.</i> Highly micro- and mesoporous oxycarbide derived materials from HF etching of silicon oxycarbide materials. Microporous and Mesoporous Materials, 20/07/2019, Vol. 298, Páginas 2-15, ISSN 1387-1811, <DOI: doi:10.1016/j.micromeso.2019.109614>. Páginas 2-15. Página 2, columna derecha, cuarto párrafo; resumen.	1-23
A	MCCONVILLE CHRISTOPHER <i>et al.</i> Efficacy of Tenofovir 1% Vaginal Gel in Reducing the Risk of HIV-1 and HSV-2 Infection. Clinical medicine insights. Women&apos;s health United States 2014, 30/11/2013, Vol. 7, Páginas 1 - 8, ISSN 1179-562X (Print), <DOI: doi:10.4137/CMWH.S10353 pubmed:24741339>. &#160; Página 4, columna izquierda, primer párrafo; resumen.	1-23

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  
21.01.2021

Examinador  
S. González Peñalba

Página  
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K9/51** (2006.01)

**A61K47/00** (2006.01)

**B82Y5/00** (2011.01)

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

A61K, B82Y

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

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