

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 915 503**

21 Número de solicitud: 202031282

51 Int. Cl.:

A01N 63/50	(2010.01)
A01N 59/20	(2006.01)
A01N 55/02	(2006.01)
A41D 31/30	(2009.01)
A41D 13/11	(2006.01)
A61L 2/16	(2006.01)
D06M 11/83	(2006.01)
B82Y 30/00	(2011.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

22.12.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

22.06.2022

71 Solicitantes:

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) (70.0%)
C/ Serrano, nº 117
28006 Madrid (Madrid) ES;
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA (8.4%);
FUNDACIÓN AGENCIA ARAGONESA PARA LA INVESTIGACIÓN Y EL DESARROLLO (ARAIID) (8.4%);
FUNDACIÓN INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA ARAGÓN (IIS ARAGÓN) (8.3%) y
INSTITUTO ARAGONÉS DE CIENCIAS DE LA SALUD (IACS) (5.0%)

72 Inventor/es:

PALOMO CARMONA, Jose Miguel;
LOSADA GARCÍA, Noelia;
ABIAN FRANCO, Olga;
VELÁZQUEZ CAMPOY, Adrián;
ORTEGA ALARCÓN, David;
JIMÉNEZ ALESANCO, Ana y
CEBALLOS LAITA, Laura

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **AGENTE DE RECUBRIMIENTO BASADO EN UN BIOHÍBRIDO DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE Y SU USO COMO AGENTE BIOCIDA**

57 Resumen:

Agente de recubrimiento basado en un biohíbrido de nanopartículas de cobre y su uso como agente biocida.

La presente invención se refiere a un material híbrido que comprende una matriz proteica y nanopartículas (NPs) de una especie de Cu, su proceso para su preparación, así como sus usos. El material de la invención presenta una actividad de inhibición de proteínas de SARS-CoV-2, lo que le confiere capacidad para su uso como agente biocida, así como agente de recubrimiento y desinfectante de materiales seleccionados entre metales, papel, textil y mascarillas quirúrgicas homologadas.

ES 2 915 503 A1

DESCRIPCIÓN**AGENTE DE RECUBRIMIENTO BASADO EN UN BIOHÍBRIDO DE
NANOPARTÍCULAS DE COBRE Y SU USO COMO AGENTE BIOCIDA**

5

La presente invención se refiere a un material híbrido que comprende una matriz proteica y nanopartículas (NPs) de una especie de Cu, su proceso para su preparación, así como sus usos. El material de la invención presenta una actividad de inhibición de proteínas de SARS-CoV-2, lo que le confiere capacidad para su uso como agente biocida, así como agente de recubrimiento y desinfectante de materiales seleccionados entre metales, papel, textil y mascarillas quirúrgicas homologadas.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

El COVID-19 ha puesto en peligro a más de 210 países y territorios causando morbilidad y mortalidad humanas generalizadas, más de 25 millones de infecciones confirmadas y trastornos en nuestra economía, así como importantes trastornos en la vida diaria en todo el mundo. La enfermedad se transmite a través del virus, SARS-CoV-2 (síndrome respiratorio agudo severo), que se sabe que permanece viable en algunos sólidos durante períodos de hasta 1 semana.

20

El virus parece ser muy infeccioso y se cree que un modo importante de transmisión se transmite a partir de una persona infectada que libera gotitas de líquido llenas de virus que pueden encogerse debido a la evaporación y formar así un aerosol. Otro ocurre cuando una persona entra en contacto con un sólido que está contaminado con el virus (un fómite). Las mascarillas quirúrgicas desechables pueden evitar que las gotitas respiratorias entren en los pulmones. Sin embargo, existen algunas limitaciones de las máscaras existentes (Addi, R. A., Benksim, A., Cherkaoui, M. Easybreath Decathlon Mask: An Efficient Personal Protective Equipment (PPE) against COVID-19 in Africa. *J.Clin. Exp. Inv.* **2020**, 11). Por lo que un material anti-COVID-19 sería muy interesante.

30

A nivel mundial, el uso de nanomateriales en el campo biomédico ha atraído un creciente interés de los investigadores debido a su propiedad única al interactuar con células y tejidos a nivel molecular, con un alto grado de especificidad y eficacia mejorada para

35

combatir enfermedades infecciosas (Dahoumane, S. A., Jeffryes, C., Mechouet, M., Agathos, S.N. Biosynthesis of inorganic nanoparticles: a fresh look at the control of shape, size and composition. *Bioengineering* **2017**, 4, 1–16). Su pequeño tamaño, flexibilidad de diseño y gran relación superficie-volumen hacen que estos materiales sean de uso extendido.

El cobre y sus compuestos se han utilizado como agentes desinfectantes durante muchos siglos. Desde el siglo XIX, el descubrimiento de un vínculo causal entre enfermedades y patógenos ha revolucionado la medicina moderna. La investigación se centró en el desarrollo de agentes antimicrobianos, especialmente antibacterianos, y se han realizado muchos estudios sobre los efectos antibacterianos de metales como el cobre.

En 2008, la EPA reconoció oficialmente al cobre y sus aleaciones como el primer agente antimicrobiano metálico eficaz (<http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/copper-alloyproducts.htm>). Reconocieron su capacidad para matar el 99,9% de las bacterias patógenas en 2 h. Desde entonces, se ha avanzado rápidamente en las propiedades bactericidas de la superficie del cobre, conocidas como "muerte por contacto", lo que permite eliminar rápidamente las bacterias patógenas.

Sin embargo, hasta el momento, no se ha demostrado que éste tenga capacidad biocida como aditivo en agentes de recubrimiento aplicados en disolución.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En la presente invención se han desarrollado nanomateriales de nanopartículas de cobre altamente estables con capacidad de inhibición del virus SARS-CoV-2 (material anticovid). Se ha demostrado que estos nanomateriales con actividad biocida pueden ser empleados como aditivos de recubrimiento en superficies de distinta naturaleza, presentando una alta versatilidad.

Entre las diferentes aplicaciones derivadas de esta capacidad del material híbrido de la invención, se encuentra su uso sobre materiales de equipamiento de protección

individual (EPIs). En este caso se ha aplicado sobre mascarillas quirúrgicas homologadas de polipropileno y sobre tela de algodón 100% (procedente de bata de laboratorio). En adhesión del recubrimiento ha resultado altamente eficiente y estable a través de ciclos de lavados de los mismos y expuesto a altas temperaturas, lo cual
5 permitiría su uso de forma segura y su reutilización al menos 4 veces. Estas mascarillas presentarían una cantidad de cobre de aproximadamente 1g/ mascarilla, esto es 5500 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (>10 la cantidad recomendada para eliminar el virus SARS-CoV-2).

Esto da lugar a un aumento considerable en la protección individual frente al virus,
10 aumentando la eficiencia, por ejemplo, de las mascarillas quirúrgicas o las que se comercializan de tela, inactivando el virus de forma directa.

Por otro lado, el material híbrido de la invención también se ha aplicado en materiales metálicos, como acero u hierro, de forma que puede ser empleado tanto como material
15 para recubrimiento como aditivo de desinfección directa de superficies de contacto, tanto barandillas o pomos, para su uso por ejemplo en el sector del transporte público. La cantidad de agente de recubrimiento en la solución desinfectante sería, en esta ocasión de 800-10000 ppm del nanohíbrido por litro de agua o solución acuosa desinfectante.

Igualmente, el agente de recubrimiento de la invención se puede aplicar disuelto en una
20 solución hidroalcohólica, en cuyo caso, la cantidad de nanohíbrido estaría comprendida entre los 50 y 100 ppm en solución al 50% de etanol.

Por último, también se ha demostrado su capacidad de adherencia y estabilidad en
25 papel, lo cual podría ser de interés para su uso como material anticovid desechable.

En un primer aspecto, la invención se refiere al uso no terapéutico de un material híbrido que comprende:

- una matriz proteica compuesta por una enzima o proteína, y
- 30 - nanopartículas esféricas de especies de cobre seleccionadas independientemente de entre $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$, Cu_2O y Cu (0), donde dichas nanopartículas están distribuidas de forma monodispersa dentro de la matriz, como agente biocida.

En una realización preferida, la matriz proteica se selecciona de entre lipasa B de
35 *Cándida antártica*, lipasa de *Thermomyces lanuginosus*, lipasa de *Bacillus*

thermocatenulatus, proteína albumina humana y catalasa.

En otra realización preferida, las nanopartículas son de $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$, con una distribución de tamaño de diámetro único de entre $3\pm 0,5$ nm y $15\pm 0,5$ nm, más preferiblemente de entre $3\pm 0,5$ nm y $11\pm 0,5$ nm, más preferiblemente de entre $3\pm 0,5$ nm y $10\pm 0,5$ nm; y aún más preferiblemente de entre $3\pm 0,5$ nm y $5\pm 0,5$ nm.

En otra realización preferida, el agente biocida se emplea frente a un virus que se selecciona de entre el virus de la hepatitis C, SARS-CoV, MERS-CoV, y SARS-CoV-2 causante de la Covid-19.

En otra realización preferida, el material híbrido actúa como agente de recubrimiento, preferiblemente sobre superficies seleccionadas de entre materiales cerámicos, materiales poliméricos, metales, papel, textil y mascarillas.

En una realización preferida, el metal es hierro o acero.

En otra realización preferida, el material textil es algodón, más preferiblemente algodón 100%.

En otra realización preferida, el agente de recubrimiento se emplea como aditivo para desinfección directa (desinfectante), y más preferiblemente el agente se añade a una solución seleccionada de entre hipoclorito sódico, peróxido de hidrógeno, isopropanol, etanol, cloruro de didecildimetilamonio, y bromuro de hexadeciltrimetilamonio; y más preferiblemente se añade a una solución seleccionada de entre hipoclorito sódico al 0,1%, peróxido de hidrógeno al 3%, isopropanol 70%, etanol al 50%, 70% y 96%, cloruro de didecildimetilamonio, y bromuro de hexadeciltrimetilamonio al 1,75%.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un material compuesto que comprende:

- un producto compuesto por un material seleccionado de entre material cerámico, material polimérico, metal, papel, textil o una mascarilla; y
- un recubrimiento que comprende el material híbrido según se ha descrito anteriormente.

En una realización preferida, el metal es hierro o acero.

En otra realización preferida, el material textil es algodón, más preferiblemente algodón 100%.

5 Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención del material compuesto según se ha descrito anteriormente, que comprende aplicar el recubrimiento de la invención disuelto en una solución hidroalcohólica sobre la superficie total o parcial de un producto compuesto por material cerámico, material polimérico, metal, papel, textil o una mascarilla.

10 En una realización preferida, el recubrimiento se aplica disuelto en una solución hidroalcohólica con una concentración comprendida entre el 50:50 y 20:80 (agua:alcohol). En una realización más preferida la concentración es 50:50 agua:alcohol.

15 En otra realización preferida, el alcohol se selecciona de entre etanol, propanol, isopropanol, metanol, entre otros. En una realización aún más preferida el alcohol es etanol.

20 En otra realización preferida el recubrimiento se aplica a una temperatura de entre 20 y 25 °C sobre la superficie total o parcial de la superficie del producto (a).

25 En otra realización preferida, el método de recubrimiento incluye, sin limitarse a, inmersión en líquido o gel, pulverización o recubrimiento mediante spray, deposición en vacío, premoldeado o casting y extrusión.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del agente de recubrimiento tal y como se ha definido anteriormente como aditivo para desinfección directa.

30 En una realización más preferida, el agente de recubrimiento se emplea en combinación con otros agentes desinfectantes seleccionados de entre hipoclorito sódico, peróxido de hidrógeno, isopropanol, etanol, cloruro de didecildimetilamonio, y bromuro de hexadeciltrimetilamonio.

35 En una realización aún más preferida el agente de recubrimiento se añade a una solución seleccionada de entre hipoclorito sódico al 0,1%, peróxido de hidrógeno al 3%,

isopropanol 70%, etanol al 50%, 70% y 96%, cloruro de didecildimetilamonio, y bromuro de hexadeciltrimetilamonio al 1,75%.

5 En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a un material híbrido que comprende:

- una matriz proteica compuesta por una enzima o proteína seleccionada de entre lipasa de *Thermomyces lanuginosus*, lipasa de *Bacillus thermocatenulatus*, proteína albumina humana y catalasa, y
- 10 - nanopartículas esféricas de especies de cobre seleccionadas independientemente de entre $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$, Cu_2O y Cu (0), donde dichas nanopartículas están distribuidas de forma monodispersa dentro de la matriz.

15 En una realización preferida, las nanopartículas son de $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$, con una distribución de tamaño de diámetro único de entre $3\pm 0,5$ nm y $15\pm 0,5$ nm, más preferiblemente de entre $3\pm 0,5$ nm y $11\pm 0,5$ nm, y más preferiblemente de entre $3\pm 0,5$ nm y $10\pm 0,5$ nm.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención del material híbrido anteriormente descrito, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

- 20 a) adición en agitación de la enzima o proteína que se selecciona de entre lipasa de *Thermomyces lanuginosus*, lipasa de *Bacillus thermocatenulatus*, proteína albumina humana y catalasa a una solución tampón de pH entre 7 y 10;
- b) adición de una sal de cobre a la solución obtenida en la etapa a) a temperatura ambiente de ente 20 y 25°C;
- 25 c) incubación de la solución obtenida en la etapa b) durante un tiempo comprendido entre 14-20h; y
- d) recoger, y opcionalmente reducir el material híbrido obtenido en la etapa anterior,
- e) lavar, y opcionalmente, secar el producto obtenido de la etapa (d).

30 En una realización preferida, el tampón en la etapa a) es una solución tampón fosfato a un pH de entre 6,5 y 7,5, más preferiblemente a pH 7.

En otra realización preferida, el material híbrido recogido (que se ha formado como un sólido en la solución) se seca por liofilización en la etapa e).

35

Preferiblemente, la sal de cobre es Cu_2SO_4 ; y aún más preferiblemente es $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

5 En una realización preferida, se añaden 10 mg de sal de cobre en la etapa b) por mL de solución tampón.

En una realización preferida, el tiempo de incubación en la etapa c) es de 16 h. La incubación significa que la mezcla se deja bajo agitación durante el tiempo especificado.

10 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una solución desinfectante que comprende el material híbrido tal y como se ha descrito anteriormente disuelto en un medio seleccionado de entre hipoclorito sódico, peróxido de hidrógeno, isopropanol, etanol, cloruro de didecildimetilamonio, y bromuro de hexadeciltrimetilamonio.

15 En una realización preferida la solución se selecciona de ente hipoclorito sódico al 0,1%, peróxido de hidrógeno al 3%, isopropanol 70%, etanol al 50%, 70% y 96%, cloruro de didecildimetilamonio, y bromuro de hexadeciltrimetilamonio al 1,75%.

20 En la presente invención, los términos "material híbrido", "material biohíbrido", "material bionanohíbrido" o simplemente "biohíbrido" o "bionanohíbrido" o "material híbrido que comprende una matriz proteica y nanopartículas de cobre" se utilizan como sinónimos y se refieren a un material que comprende una matriz proteica que se selecciona de lipasa B de la *Cándida antártica*, lipasa de *Thermomyces lanuginosus*, lipasa de *Bacillus thermocatenuatus*, proteína albumina humana y catalasa (compuesto orgánico) y
25 especies de Cu (compuesto inorgánico) seleccionadas de entre: Cu (0), Cu_2O , $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$, , en forma de nanopartículas esféricas donde: cuando la especie de cobre es $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ la distribución de tamaño de diámetro único es de entre 3 ± 0.5 nm y 11 ± 0.5 nm; cuando la especie de cobre es Cu_2O la distribución de tamaño de diámetro único de entre 10 y 20 ± 0.5 nm; y cuando la especie de cobre es Cu (0) la distribución de
30 tamaño de diámetro único es de entre 6 y 10 ± 0.5 nm; donde dichas nanopartículas están distribuidas de forma monodispersa dentro de la matriz evitando agregación.

En la presente invención, el término "distribución de tamaño de diámetro único" se refiere al número de tamaño de nanopartículas obtenidos en cada síntesis, y que en
35 cualquier caso no supera la variación de $\pm 0,5$ nm. Las nanopartículas de la presente

invención son esféricas o sustancialmente esféricas.

En la presente invención, se entiende como "distribuido de forma monodispersa" una distribución de las nanopartículas sobre la matriz proteica de forma que se evita la
5 agregación de las mismas.

En la presente invención, la lipasa B de la *Cándida antártica* (CALB) (número de referencia GenBank: CAA83122.1) es una lipasa no específica de la *Cándida antártica* con un peso molecular en torno a 34 kDa y un punto isoeléctrico de 6. La lipasa B de la
10 *Cándida antártica* está disponible en el mercado, por ejemplo, a través de Novozymes bajo el nombre de Lipozyme® CALB.

En la presente invención, la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) (número de referencia GenBank: AF054513) es una lipasa basofílica notablemente termoestable
15 accesible comercialmente como Lipozyme® TL 100 L de la empresa Novozymes, con un peso molecular de 32 KDa y un punto isoeléctrico de 4,4.

En la presente invención, la lipasa 2 de *Bacillus thermocatenulatus* (BTL) (número de referencia GenBank: AST00902.1) es una lipasa termoalcalofílica notablemente
20 termoestable no específica de *Bacillus thermocatenulatus* expresada en *E. coli*, con un peso molecular de 43 KDa y un punto isoeléctrico de 7,2.

En la presente invención, la proteína albumina humana (HSA) (número de referencia GenBank AAX63425) es una proteína que se encuentra en gran proporción en los
25 linfocitos, siendo la principal proteína de la sangre, y una de las más abundantes en el ser humano. Tiene un peso molecular de 67 kDa y un punto isoeléctrico de 4,6.

En la presente invención, la catalasa (CAT) (número de referencia GenBank CAK40252.1) es una enzima multimérica expresada en *Aspergillus niger* y
30 comercialmente accesible por la empresa Novozymes bajo el nombre de Catazyme® 25 L. Tiene un peso molecular aproximado de 400 kDa y un punto isoeléctrico de 6,8.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente se entiende por
35 uno de los expertos ordinarios en la materia a la que pertenece esta invención. Métodos

y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos aquí pueden ser utilizados en la práctica de la presente invención.

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 figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

10

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Caracterización de NanoCu. A) Espectro de difracción de rayos X (DRX); B) Imágenes de microscopía TEM y HRTEM; C) Distribución de tamaño de partículas.

15 **FIG.2.** Caracterización espectroscópica de NanoCu. A) Espectro de dicroísmo circular lejano. B) Espectro de dicroísmo circular cercano. C) Espectro de fluorescencia. La medida de fluorescencia fue realizada usando una longitud de excitación de 280 nm, con bandas de excitación y emisión de 5 nm. NanoCu (discontinua), proteína libre (continua).

20 **FIG. 3.** Caracterización del biohíbrido NanoCu-2 preparado en el ejemplo 1 de la presente invención. A) Espectro XRD, B) Imágenes TEM.

FIG. 4. Caracterización del biohíbrido NanoCu-3 preparado en el ejemplo 1 de la presente invención. A) Espectro XRD, B) Imágenes TEM.

25 **FIG. 5.** Caracterización de diferentes biohíbridos de Cu-enzima preparados en el ejemplo 1 de la presente invención. (A) NanoCu-TLL. (B) NanoCu-BTL. (C) NanoCu-CAT. (D) NanoCu-HSA. I) Imágenes de microscopía TEM; II) Imágenes de microscopía de alta resolución (HR)-TEM; III) Distribución del tamaño de nanopartículas.

30 **FIG. 6.** Caracterización funcional de NanoCu mediante un ensayo de actividad de la proteína 3CLpro de SARS-CoV-2 en presencia de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (A)* y de concentraciones crecientes de NanoCu (B y C)**. Los datos se presentan en función de concentración de NanoCu en $\mu\text{g}/\text{mL}$ (B) y de Cu contenido en el NanoCu en μM (C). Ensayo de escisión de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) con 20 μM sustrato peptídico (Dabcyl)-KTSAVLQSGFRKME-(Edans)-NH₂ (Biosynton GmbH) en 100 μL . 0.2 μM de 3CLpro en fosfato de sodio 50 mM, NaCl 150 mM, a pH 7. Lector FluoDia T70
35 ($\lambda_{\text{excitación}} = 380 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emisión}} = 500 \text{ nm}$). * Ensayo a tiempo final: tiempo 0 (1) y a tiempo

final 20 min (2).** Ensayo continuo.

FIG. 7. Caracterización funcional de NanoCu mediante un ensayo de unión RayBio® COVID-19 Spike-ACE2 (A)* en presencia de concentraciones crecientes de NanoCu en $\mu\text{g/mL}$ (B). (A)* *Elisa test: Recubrimiento de superficie (ACE2); Preincubación 45 min 4 °C (Spike (1X) + Compuestos-Cu (30 $\mu\text{g/mL}$)); Incubación 2,5 h temperatura ambiente / overnight 4 °C (Spike + Compuestos + ACE2); Anticuerpo 1 h temperatura ambiente (HRP anticuerpo conjugado); Sustrato 15 min temperatura ambiente (TMB); STOP (HCL 0,2M). Medida en espectrofotómetro a $\lambda= 450\text{nm}$.*

FIG. 8. Caracterización funcional de otros materiales NanoCu mediante un ensayo de actividad de la proteína 3CLpro de SARS-CoV-2 en presencia de 30 $\mu\text{g/mL}$ (A)* y de concentraciones crecientes de NanoCu (B y C)**. Los datos se presentan en función de concentración de NanoCu en $\mu\text{g/mL}$ para NanoCu-2 (NanoCu-2) (B) y NanoCu-3 (NanoCu-3) (C). Ensayo de escisión de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) con 20 μM sustrato peptídico (Dabcyl)-KTS AVLQSGFRKME-(Edans)-NH₂ (Biosyntan GmbH) en 100 μL . 0,2 μM de 3CLpro en fosfato de sodio 50 mM, NaCl 150 mM, a pH 7. Lector FluoDia T70 ($\lambda_{\text{excitación}}= 380 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emisión}}= 500 \text{ nm}$). Ensayo a tiempo final: tiempo 0 (1) y a tiempo final 20 min (2).** Ensayo continuo Ensayo a tiempo final. ** Ensayo continuo.

FIG. 9. Caracterización funcional de NanoCu-2 y NanoCu-3 mediante un ensayo de unión RayBio® COVID-19 Spike-ACE2* en presencia de concentraciones crecientes de material en $\mu\text{g/mL}$. NanoCu-2 (cuadrados), NanoCu-3 (triángulos).

* *Elisa test: Recubrimiento de superficie (ACE2); Preincubación 45 min 4 °C (Spike (1X) + Compuestos-Cu (30 $\mu\text{g/mL}$)); Incubación 2,5 h temperatura ambiente / overnight 4 °C (Spike + Compuestos + ACE2); Anticuerpo 1 h temperatura ambiente (HRP anticuerpo conjugado); Sustrato 15 min temperatura ambiente (TMB); STOP (HCL 0,2M). Medida en espectrofotómetro a $\lambda= 450\text{nm}$.*

FIG. 10. Caracterización funcional de nuevos nanohíbridos con otras proteínas mediante un ensayo de actividad de la proteína 3CLpro de SARS-CoV-2 en presencia de concentraciones crecientes de nanobiohíbrido en ensayo continuo. A) NanoCu-TLL, B) NanoCu-BTL, C) NanoCu-HSA, D) NanoCu-CAT. Ensayo de escisión de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) con 20 μM sustrato peptídico (Dabcyl)-KTS AVLQSGFRKME-(Edans)-NH₂ (Biosyntan GmbH) en 100 μL . 0,2 μM de 3CLpro en fosfato de sodio 50 mM, NaCl 150 mM, a pH 7. Lector FluoDia T70 ($\lambda_{\text{excitación}}= 380 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emisión}}= 500 \text{ nm}$).

FIG. 11. 1) Imágenes de microscopía SEM de la estructura de la mascarilla. 2) Imagen de la mascarilla real. A) Mascarilla quirúrgica sin tratar; B) Mascarilla con NanoCu Etanol:agua 50:50; C) Mascarilla con NanoCu Etanol:agua 70:30; D) Mascarilla con NanoCu Etanol:agua 80:20.

5 **FIG. 12.** 1) Imágenes de microscopía de SEM de la estructura de la mascarilla con el recubrimiento con NanoCu en etanol:agua 50:50; 2) Imagen de la mascarilla real. A) 1g; B) 0,75g; C) 0,5g; D) 0,25g; E) 0,12 g. Todas las muestras se han realizado en 45cm².

FIG. 13. Recubrimiento de superficies con NanoCu. A) Tela de algodón 100% (10,5 cm²); B) Barra de acero (6,9 cm²); C) Llave de hierro (9 cm²); D) Papel (10,5 cm²). I) Imágenes SEM del material de partida; II) Imágenes SEM del material con NanoCu; III) Muestra física del material con NanoCu y dimensiones (0,25 g de sólido para todas las muestras).

FIG. 14. Estabilidad de NanoCu frente al contacto con desinfectantes. A) Muestras en placas Petri con los diferentes desinfectantes. B) Espectros de difracción de rayos X (DRX) de los sólidos después de la aplicación del desinfectante comparados con el sólido sin tratar. I) Desinfectante multiusos (0,6 % de cloruro de didecildimetilamonio); II) H₂O₂ al 3%; III) Lejía al 0,1%; IV) Etanol al 70%; V) Etanol al 96%, VI) Isopropanol 70%, VII) CTAB 1,75%.

FIG. 15. Eficiencia catalítica de NanoCu. A) Muestras tratadas con los diferentes desinfectantes comparada con el material fresco y el material secado en las mismas condiciones. B) NanoCu mezclado directamente con 0,1% de lejía durante 7 días. C) NanoCu mezclado directamente con 70% de isopropanol durante 7 días. D) NanoCu mezclado directamente con CTAB (1,75%) durante 7 días. La eficiencia catalítica se determinó utilizando el ensayo de oxidación de p-aminofenol. (C₂₂H₄₈N₂ formula empírica del cloruro de didecildimetilamonio).

FIG. 16. Imágenes de microscopía SEM de la estructura de la mascarilla con el recubrimiento de NanoCu después del lavado con agua del grifo (0,5 g de híbrido en 10,5 cm²). A) Temperatura ambiente, B) 50°C; 1) Primer lavado, 2) Segundo lavado, 3) Tercer lavado.

30 **FIG. 17.** Imágenes de microscopía SEM de la estructura de la mascarilla con el recubrimiento de NanoCu después del lavado con etanol:agua 50:50 (0,5 g de híbrido en 10,5 cm²). A) Temperatura ambiente, B) 50°C; 1) Primer lavado, 2) Segundo lavado, 3) Tercer lavado.

FIG. 18. Imágenes de microscopía SEM de la estructura de la mascarilla con el recubrimiento de NanoCu después del lavado con Etanol:agua 70:30 (0,5 g de híbrido

en 10,5 cm²). A) Temperatura ambiente, B) 50°C; 1) Primer lavado, 2) Segundo lavado, 3) Tercer lavado.

FIG. 19. Imágenes de microscopía SEM de la estructura de la mascarilla con el recubrimiento de NanoCu después del lavado con Etanol:agua 80:20 (0,5 g de híbrido en 10,5 cm²). A) Temperatura ambiente, B) 50°C; 1) Primer lavado, 2) Segundo lavado, 3) Tercer lavado.

FIG. 20. Imágenes de microscopía SEM de la mascarilla recubierta con NanoCu frente a lavados (0,12 g de híbrido en 10,5 cm²). A) Muestra sin tratar; B) Muestras a 40°C; C) Muestras a 60°C. I) 30 min; II) 60 min; III) 120 min.

FIG. 21. Imágenes de microscopía SEM de la tela de algodón 100% recubierta con NanoCu frente a lavados (0,12 g de híbrido en 10,5 cm²). A) Muestra sin tratar; B) Muestras a 40°C; C) Muestras a 60°C. I) 30 min; II) 60 min; III) 120 min.

EJEMPLOS

15

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

Materiales y Métodos

20

La espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) se realizó en un instrumento OPTIMA 2100 DV (PerkinElmer, Waltham, MA, EE. UU.). Los espectros de difracción de rayos X (XRD) se obtuvieron utilizando un Difractómetro de Análisis de Textura D8 Advance (Bruker, Billerica, MA, EE. UU.) Con radiación Cu K α . Se realizaron imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) en un microscopio

25 TM-1000 (Hitachi, Tokio, Japón). Para recuperar los biohíbridos se utilizó una centrifuga refrigerada Biocen 22 R (Orto-Alresa, Ajalvir, España).

Medidas de dicroísmo circular y espectroscopia de fluorescencia

30

Los espectros de dicroísmo circular (CD) de la proteína y el híbrido se registraron en un espectropolarímetro Chirascan (Applied Photophysics) a 25 (\pm 1) °C. Los espectros de UV lejano se registraron a longitudes de onda entre 190 y 260 nm en una cubeta de 0,1 cm de longitud de trayectoria. Los espectros de UV cercano se registraron a longitudes de onda entre 250 y 310 nm en una cubeta de 1 cm de longitud de trayectoria. Las concentraciones de proteína fueron 20 y 10 μ M respectivamente en solución salina

tamponada con fosfato, pH 7,2 (PBS; bioMerieux). En cuanto a las mediciones de fluorescencia se realizaron en un espectrofotómetro de fluorescencia Varian Cary Eclipse (Agilent Technologies) monitoreando la fluorescencia intrínseca de triptófano en 2 μM de la solución híbrida, utilizando una longitud de onda de excitación de 280 nm, con anchos de banda de excitación y emisión de 5 nm, y registrando espectros de emisión de fluorescencia entre 300 y 400 nm con paso de 1 nm. Todas las mediciones espectroscópicas se realizaron en agua.

Detección de la inhibición de la proteína 3CLPro

La proteína 3CLpro del virus SARS-CoV-2 tiene actividad proteasa y su inhibición puede ser monitorizada mediante un sustrato en ensayos continuos o de punto final. Se han realizado las medidas de actividad con un péptido que es sustrato específico de la proteína y cuya hidrólisis puede ser detectada mediante fluorescencia FRET. Si la proteína 3CLpro se pone en contacto con los derivados en estudio objeto de esta patente, en caso de interacción entre ellos y posterior inhibición, observaríamos una disminución en la intensidad de fluorescencia detectada (ya que la hidrólisis del sustrato FRET no se produciría al inhibirse a la actividad proteasa).

Las medidas de actividad se han realizado de dos formas:

1. Protocolo de ensayo de medida de actividad continua:

La actividad catalítica in vitro de 3CLpro se determinó usando un ensayo continuo de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) con el sustrato peptídico (Dabcyl)-KTSAVLQSGFRKME-(Edans)-NH₂ (Biosyntan GmbH). La enzima se utilizó a una concentración final de 0,2 μM en fosfato de sodio 50 mM, NaCl 150 mM, a pH 7, y la reacción enzimática se inició añadiendo el sustrato a una concentración final de 20 μM , en un volumen final de 100 μL . La fluorescencia se midió continuamente en un lector de microplacas FluoDia T70 (Photon Technology International) durante 60 minutos (longitud de onda de excitación, 380 nm; longitud de onda de emisión, 500 nm). La actividad enzimática se cuantificó como la pendiente inicial de la curva de evolución temporal de la señal de fluorescencia. Para estudiar la inhibición de la proteasa mediante compuestos, se agregaron en concentraciones que variaban de 0 a 400 μg / mL, y el cociente entre la actividad enzimática en presencia y ausencia de un compuesto dado proporciona el porcentaje de inhibición en cada concentración.

2/ Un método de detección de fluorescencia a una concentración fija de derivado y a dos tiempos (0 y 20 min), eliminando el derivado por centrifugación y parando la reacción

por inactivación térmica de la proteasa. De esta manera, se comprueba que no han tenido lugar interferencias que puedan deberse a la presencia de los derivados en la medida de la fluorescencia de las muestras.

2. *Protocolo de ensayo de medida de actividad a punto final:*

5 La actividad enzimática se determinó usando el mismo sustrato de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), (Dabcyl)-KTSAVLQSGFRKME-(Edans)-NH₂ (Biosyntan, GmbH). Para evitar la posibilidad de dispersión o atenuación de la radiación por BIOG, se llevó a cabo un ensayo de punto final para separar las partículas antes de la medición de fluorescencia.

10 En resumen, se mezclaron 550 µL de 3CLpro (concentración final 0,2 µM) en tampón de ensayo, que contenía fosfato de sodio 50 mM pH 7, NaCl 150 mM, con 10,5 µL de compuestos (concentración final 30 µg / ml).

A continuación, se inició la reacción añadiendo el sustrato a una concentración final de 20 µM, en un volumen final de 700 µL. Se tomó una alícuota de partida para cada muestra, dejando el resto de la solución durante 20 minutos a temperatura ambiente. La reacción enzimática se detuvo en los dos puntos de tiempo diferentes (0 y 20 minutos) mediante tratamiento térmico a 90°C durante 5 minutos. Las partículas se eliminaron mediante centrifugación durante 3 minutos a 10000 rpm. La liberación de EDANS del sustrato se midió fluorimétricamente a partir del sobrenadante por triplicado en un lector de microplacas FluoDia T70 (Photon Technology International, longitud de onda de excitación, 380 nm; longitud de onda de emisión, 500 nm).

15 La inhibición enzimática se calculó estimando el porcentaje de actividad en comparación con dos controles: la proteína sin ningún compuesto se tomó como 100% de actividad, y el 0% se estimó a partir de la fluorescencia residual de una muestra que contenía solo tampón de ensayo y sustrato.

Para comprobar si los compuestos interfieren con la detección del producto de reacción, se llevó a cabo el mismo procedimiento en muestras donde el sustrato fue reemplazado por el fluoróforo libre del sustrato (EDANS) a la misma concentración.

30 *Detección de la inhibición de la interacción Spike-ACE2*

El kit de ensayo de unión RayBio® COVID-19 Spike-ACE2 es un método rápido, simple y sensible para caracterizar la afinidad de unión del complejo Spike-ACE2 y evaluar la actividad de potenciales inhibidores. Este inmunoensayo con detección enzimática *in vitro* puede medir numerosos reactivos y condiciones simultáneamente. Podemos determinar si los derivados en estudio pueden alterar la interacción de la proteína Spike

del virus SARS-CoV-2 e impedir su interacción con la proteína ACE2 humana que se encuentra inmovilizada en la superficie.

Si la señal del test tras el revelado disminuye tras el contacto de los derivados con la proteína Spike, nos indica que se ha bloqueado la interacción posterior de Spike con
5 ACE2.

Ejemplo 1. Síntesis de los biohíbridos (NanoCu, NanoCu-2, NanoCu-3, NanoCu-TLL, NanoCu-BTL, NanoCu-CAT, NanoCu-HSA)

10 NanoCu

Se añadieron 1,8 mL de solución comercial de lipasa de *Candida antarctica* (CALB) (18 mg de proteína) a 60 ml de tampón fosfato de sodio (0,1 M, pH 7) en una botella de vidrio de 250 mL que contiene un pequeño agitador de barra magnética (2,5 cm x 0,5 cm; 360rpm). Luego, se agregaron 600 mg de $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (10 mg/mL) a la solución
15 de proteína que estaba en agitación y la mezcla se mantuvo en agitación durante 16 h a temperatura ambiente. Tras los primeros 30 min de incubación, la solución se volvió turbia (turquesa) color que se conservó en todo momento. Después de 16 h, la mezcla se centrifugó a 8000 rpm durante 10 min, (6 tubos falcon, 10mL en cada uno). Una vez retirado el líquido en cada tubo falcón, se procedió al lavado de los sólidos obtenidos,
20 para eliminar posibles restos de sal de cobre o proteína, adicionando 10 mL de agua destilada en cada tubo y agitando la mezcla ligeramente con una espátula. Una vez mezclado, se centrifugaron en las mismas condiciones que anteriormente. El procedimiento se repitió dos veces más. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y como resultado tras juntar todos los sólidos obtenidos en los diferentes tubos de falcón, se
25 obtuvieron 3,5 g de solido mojado. Se comprobó que correspondían a 350 mg de sólido seco.

La caracterización de NanoCu se realizó mediante análisis XRD, ICP-OES, TEM, SEM, DC y fluorescencia.

30 NanoCu-2 y NanoCu-3

Se agregó 1,8 mL (18 mg de proteína) de solución comercial de lipasa de *Cándida antártica* (CALB) a un tampón de 60 mL 0,1M (fosfato de sodio pH 7 para NanoCu-2 o bicarbonato de sodio pH =10 para NanoCu-3) en una botella de vidrio de 250 mL que contenía un pequeño agitador magnético de barra. Después, se agregaron 600 mg de
35 $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (10 mg/mL) a la solución proteica y se mantuvo durante 16 horas.

Después de los primeros 30 minutos de incubación, la solución se volvió turbia (turquesa). Después de 16 h, se añadieron 6 mL de solución acuosa de NaBH₄ (300 mg) (1,2 M) a la solución turbia (en dos veces de 3 mL) obteniendo una concentración final de 0,12 M de borohidruro sódico en la mezcla. La solución se volvió rápidamente negra y la mezcla se redujo durante 30 minutos. Después de la incubación, en todos los casos, la mezcla fue centrifugada a 8000 rpm durante 5 min (10 mL por tubo tipo halcón). El pellet generado fue re-suspendido en 15 mL de agua. Se centrifugó de nuevo a 8000 r.p.m. durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. El proceso se repitió dos veces más. Finalmente, se retiró el sobrenadante y se volvió a suspender el precipitado de cada halcón en 2 mL de agua, se recogieron todas las soluciones en un matraz de fondo redondo, se congelaron con nitrógeno líquido y se liofilizaron durante 16 horas. Después se obtuvieron 150 mg de los llamados NanoCu-2 y NanoCu-3, respectivamente. La caracterización de los diferentes biohíbridos de Cu se realizó mediante análisis XRD, ICP-OES, TEM y SEM.

15

NanoCu-TLL, NanoCu-BTL, NanoCu-CAT, NanoCu-HSA

La síntesis de estos biohíbridos se ha realizado en medio acuoso añadiendo lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (TLL), lipasa de *Bacillus thermocatenuatus* (BTL), catalasa (CAT) o albumina humana (HSA) a 60 mL de una solución acuosa conteniendo tampón fosfato de sodio 100 mM (pH 7). En cada caso las cantidades de enzima añadida fueron: 0,75 mL de solución comercial TLL (24 mg/mL), 0,5 mL de CAT (32 mg/mL y 20 mg de HSA comercial, respectivamente.

En el caso de BTL, se añadieron 20 mL (0,4 mg/mL de solución que contenía 0,5% (p/v) de Tritón X-100 procedente de la etapa de purificación) correspondientes a una concentración de enzima de 0,13 mg/mL a 40 mL de buffer fosfato pH7.

Luego, en cada caso, se agregaron 600 mg de sulfato de cobre (II) pentahidratado [Cu₂SO₄ x 5H₂O] (10 mg/mL) a la solución de proteína que estaba en agitación y la mezcla se mantuvo en agitación durante 16 h a temperatura ambiente.

Después de la incubación, el sólido obtenido fue centrifugado, lavado con en el protocolo de NanoCu y liofilizado durante 16 h para obtener los biohíbridos heterogéneos NanoCu-TLL, NanoCu-BTL, NanoCu-CAT, y NanoCu-HSA, respectivamente. Dichos biohíbridos se caracterizaron por diferentes técnicas de análisis como XRD, ICP-OES, TEM y SEM.

35

Ejemplo 2. Caracterización de los biohíbridos (NanoCu, NanoCu-2 y NanoCu-3)NanoCu

NanoCu se caracterizó estructuralmente por diferentes técnicas como difracción de rayos X (DRX) (determinar su especie metálica), microscopía electrónica de transmisión (TEM) para determinar el tamaño de las nanopartículas de cobre que componen el material, así como ensayos de dicroísmo circular (DC) y fluorescencia (F) para confirmar la coordinación y presencia de especies de cobre en la matriz proteica. El análisis DRX demostró que la especie de cobre en NanoCu era $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ (Figura 1A). El análisis TEM mostró la formación de nanopartículas de aproximadamente 4,9 nm de tamaño (Figura 1B-C). El contenido en cobre del material fue determinado por masas, determinado en un 31%. En el análisis de DC, se observó una disminución en la señal espectroscópica tanto en el lejano como en el cercano comparado con la proteína en solución (Figura 2A-B), lo que significaba que la estructura terciaria se alteraba con la formación del derivado de enzima Cu. En la fluorescencia, la señal de fluorescencia de triptófano de la enzima soluble exhibió un pico a 320 nm (Figura 2C) mientras que en el híbrido se observa una señal clara a 385 nm, característica de la formación de un complejo de Cu^{2+} -enzima.

20 NanoCu-2 y NanoCu-3

El análisis DRX demostró que en el híbrido NanoCu-2 la especie de Cu era Cu(I), en forma de Cu_2O , exclusivamente (Figura 3). Este biohíbrido presentó 61% de Cu calculado por análisis de ICP. Los experimentos de TEM revelaron la formación de nanopartículas de 10 nm (Figura 3B),

25 En el caso del híbrido NanoCu-3, el DRX mostró que la principal especie era Cu(0) (80%), mientras el resto se debía a óxido cuproso (Figura 4). El análisis TEM mostró la formación de nanopartículas de alrededor de 9 nm de tamaño (Figura 4B). El ICP-OES mostró que el contenido de Cu en el biohíbrido NanoCu-3 era del 84% (Los porcentajes de Cu en el material híbrido que se indican en la presente invención se refieren a

30 porcentajes por peso).

NanoCu-TLL, NanoCu-BTL, NanoCu-CAT, NanoCu-HSA

Los nuevos nanohíbridos fueron caracterizados estructuralmente por diferentes técnicas como difracción de rayos X (DRX) (determinar su especie metálica) y microscopía electrónica de transmisión (TEM) para determinar el tamaño de las nanopartículas de

cobre. El análisis DRX demostró que la especie de cobre se convirtió en todos los casos, siendo $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$. El análisis TEM mostró la formación de nanopartículas de entre 5,9 y 11 nm de diámetro (Figura 5). El contenido en cobre del material fue determinado por masas (ICP-OES), siendo alrededor de 32% en todos los casos.

5

Ejemplo 3. Determinación de la capacidad antiviral de los biohíbridos frente a SARS-CoV-2

NanoCu

10 Para determinar la actividad antiviral de NanoCu frente al virus SARS-CoV-2, se estudió su acción frente a dos proteínas del virus que actúan en dos etapas del ciclo viral.

Una de las proteínas es la proteasa 3CLpro implicada en la replicación del virus dentro de la célula huésped humana. La inhibición de 3CLpro impide que el virus se multiplique dentro de la célula y bloquea de este modo su proceso de infección. 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de

15 NanoCu redujeron totalmente la actividad de 0,2 μM proteína al cabo de 20 min (Figura 6A). Las pruebas que se realizaron midiendo de forma continua la hidrólisis de sustrato FRET en presencia de concentraciones crecientes de NanoCu y se observó una inhibición completa de la actividad de 0,2 μM proteasa (Figura 6B). La determinación de la concentración inhibitoria, en la que se reduce la actividad proteasa al 50% (IC50),
20 corresponde con una concentración de 0,03 μM Cu mientras toda la actividad fue inhibida con una concentración de 0,1 μM Cu (Figura 6C).

Otra de las proteínas, Spike, se encuentra en corona del virus y su interacción con la proteína ACE2 de la superficie de las células humanas conduce a la entrada del virus en la célula. El bloqueo de la interacción Spike-ACE2 impide la entrada del virus y por
25 lo tanto la capacidad infectiva del virus. El test que se realizó se representa en la Figura 7A. Los resultados obtenidos muestran que cuando la proteína Spike interacciona con NanoCu su capacidad de interacción con ACE2 disminuyó al 60% con tan sólo 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NanoCu (Figura 7B).

30 NanoCu-2 y NanoCu-3

Los resultados de inhibición de la proteasa 3CLpro de SARS-CoV-2 con estos dos híbridos NanoCu-2 (especie es Cu_2O) y NanoCu-3 (especie es $\text{Cu}(0)$) demuestran que ambas especies tiene una capacidad inhibitoria similar a NanoCu (Figura 8).

También se evaluó el efecto de estos dos híbridos en el bloqueo de la interacción Spike-
35 ACE2. En la Figura 9 se puede observar que NanoCu-2 (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) fue ligeramente

menos efectivo que NanoCu, disminuyendo al 40% la capacidad de interacción entre proteína S del virus con la ACE2. Sin embargo, NanoCu-3 (Cu(0)) fue más eficiente en el bloqueo de la proteína S, disminuyendo casi un 90% con tan solo 400 µg/mL de material.

5 NanoCu-TLL, NanoCu-BTL, NanoCu-CAT, NanoCu-HSA

Los resultados de inhibición de la proteasa 3CLpro de SARS-CoV-2 con los biohíbridos preparados utilizando otras enzimas (TLL, BTL, HSA y CAT) dieron lugar a valores similares a los obtenidos utilizando CALB como enzima (Figura 10). Esto demuestra que esta estrategia también es extensible al uso de otras proteínas, con excelente capacidad
10 de inhibición de las proteasas debido a las nanopartículas de $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ entre 4-11 nm sintetizadas y estabilizadas por la matriz proteica.

Ejemplo 4. Recubrimiento de la superficie de la mascarilla con NanoCu

Para la aplicación directa de NanoCu en la mascarilla, se diluyó 1 g de NanoCu en 800µL
15 de agua pura y de diferentes concentraciones de etanol:agua (50:50, 70:30 y 80:20). Mediante el uso de un pincel se cubrió la superficie de un cuarto de mascarilla (45 cm²) de forma homogénea con posterior secado mediante calor directo durante 2 min.

En la Figura 11, la comparación con los diferentes disolventes se representa mediante imágenes SEM, en las que se puede observar cómo queda el material en superficie sin
20 diferencias apreciables. Además, se muestran las muestras de mascarillas reales con el recubrimiento en las cuales se puede apreciar el recubrimiento en superficie. En este caso, se escogió el método de etanol:agua 50:50 para realizar una optimización.

Para optimizar el método de recubrimiento 50:50 de etanol: agua, se realizó un estudio con diferentes concentraciones de NanoCu aplicándolo con el pincel y posterior secado.
25 A través de imágenes SEM, se puede observar directamente el cambio de concentración (Figura 12). En este estudio, se observa que hay un gran cambio de 0,75g a 0,5g y entre 0,5g y 0,25g. En todos los casos se utilizó un cuarto de mascarilla, es decir, 45cm² de superficie.

De esta manera se ha observado que con los materiales nanohíbridos preparados en la
30 presente invención se inactiva la proteasa del SARS-Cov-2 empleando cantidades sorprendentemente bajas.

Ejemplo 5. Recubrimiento de tela de algodón 100% con NanoCu

Para la aplicación directa de NanoCu en la tela, se diluyó 0,25 g de NanoCu en 800µL de etanol:agua 50:50. Mediante el uso de un pincel se cubrió de forma homogénea toda la superficie de 10,5 cm² de tela con posterior secado al aire.

- 5 En la Figura 13A, mediante imágenes SEM se puede observar cómo está la muestra de tela antes y después de la adhesión de NanoCu en superficie.

Ejemplo 6. Recubrimiento de la superficie de metales (hierro y acero) con NanoCu

10 Para la aplicación directa del NanoCu en los metales, se diluyó 0,25 g de sólido no liofilizado (o 25mg de híbrido liofilizado) en 800µL de etanol:agua 50:50. Mediante el uso de un pincel se cubrió la superficie de forma homogénea de 9 cm² (en el caso de la llave de hierro) y de 6,9 cm² (en el caso de la barra de acero). Posteriormente se dejó secar al aire. Posteriormente, se aplicó etanol al 70% para comprobar si el recubrimiento se desprendía de la superficie metálica.

- 15 En la Figura 13B y 13C se representa mediante una imagen real como está distribuido el recubrimiento en la superficie de la barra de acero y en la llave de hierro, respectivamente.

Ejemplo 7. Recubrimiento de la superficie de papel con NanoCu

20 Para la aplicación directa de NanoCu en el papel (papel de filtro), se diluyó 0,25 g de sólido no liofilizado (o 25 mg de híbrido liofilizado) en 800µL de etanol:agua 50:50. Mediante el uso de un pincel se cubrió la superficie 10,5 cm² de forma homogénea con posterior secado al aire.

- 25 En la Figura 13D mediante imágenes SEM se puede observar cómo está la muestra de tela antes y después de la adhesión de NanoCu en superficie.

Ejemplo 8. Estabilidad del biohíbrido NanoCu

Estabilidad frente al contacto con diferentes desinfectantes

30 Para evaluar el efecto del desinfectante sobre la estabilidad de NanoCu previamente adherido a una determinada superficie, se prepararon muestras de 0,25 g de sólido con 800 µL de etanol:agua 50:50 las cuales se adicionaron cada una en una placa Petri. Una vez secado al aire (1-3 h), se aplicaron 600 µL pulverizado de cada desinfectante (Figura 14). Los desinfectantes utilizados fueron 0,6% de cloruro de didecildimetilamonio (C₂₂H₄₈CIN) (producto comercial Multiusos Desinfectante bosque verde), peróxido de hidrógeno al 3% (obtenida al diluir solución de peróxido de hidrogeno al 33%), lejía al

35

0,1% (obtenida al diluir lejía comercial (40 g hipoclorito sodio/L) en agua), etanol al 70% y 96%, isopropanol 70% y bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) 1,75%. Después del secado al aire en placa Petri, se recuperó el sólido. Para comprobar que no existía ningún cambio en la especie química de la muestra, estas se analizaron por difracción de rayos X (DRX). En todos los casos, el análisis de rayos X de las muestras del material tratado demostraron que no existía ningún cambio en la especie química de la muestra en todos los casos.

Además, para evaluar el efecto del desinfectante en la desactivación de la actividad catalítica de las nanopartículas de Cu, las muestras sólidas se aplicaron en la reacción de desaminación de p-aminofenol (pAP). En ella se observó como la eficiencia catalítica de NanoCu resulto intacta después del tratamiento con los diferentes desinfectantes (Figure 15A).

15 Estabilidad frente a la incubación en presencia de aditivos descritos como desinfectantes

Para evaluar la estabilidad de NanoCu mezclado directamente con el desinfectante, 5 mg del material se incubaron en 7,5 mL de una solución (0,66 mg/mL) de lejía al 0,1%, isopropanol 70% o CTAB 1,75%, evaluándose su estabilidad después de 7 días de incubación. Después de ese tiempo de incubación los sólidos no sufrieron ningún tipo de cambio de coloración o morfología, conservándose perfectamente la especie de cobre (demostrado por rayos X) y la cantidad de cobre (análisis cuantitativo). Además, se confirmó que la eficiencia catalítica de las nanopartículas en NanoCu se conservó al 100% después del tiempo de incubación (Figure 15B). Esto demuestra que este material podría ser aplicado además como un nuevo aditivo para agente de desinfección directa.

Estabilidad frente a alta temperatura

Otra prueba realizada para evaluar la estabilidad de NanoCu fue a alta temperatura. En este caso se evaluó la estabilidad de la estructura química exponiendo el material durante 1 h a 100°C en agua y aire, y a 150°C en un baño de aceite. Los sólidos después del tratamiento fueron evaluados mediante difracción de rayos X. Esto certificó que no existieron cambios en la especie química de NanoCu con lo que se puede afirmar que el recubrimiento es estable a alta temperatura.

35

Estabilidad frente a lavados en recubrimientos de mascarillas

Una vez realizado el recubrimiento de la mascarilla con NanoCu, se realizaron dos experimentos de lavado, un lavado a 25°C y 50°C con agua del grifo (colocando la mascarilla directamente debajo del grifo) para comprobar que no se desprendía el recubrimiento de la superficie durante 3 ciclos, y un segundo experimento incubando la mascarilla en agua del grifo a 40°C y 60°C a lo largo de 2 horas para comprobar que su estabilidad estructural.

En el primer experimento se realizó una serie de tres lavados con agua corriente a temperatura ambiente (25°C) y con agua corriente caliente (50°C). Las muestras se prepararon con 0,5g de sólido en 800µL de etanol:agua 50:50 (10,5 cm²). Entre lavado y lavado, el trozo de la mascarilla se dejó secar durante la noche al aire.

Se puede apreciar el efecto sobre el recubrimiento con NanoCu con los lavados con diferentes disolventes (etanol:agua 50:50, 70:30, 80:20) (Figura 16-19). En cualquiera de los diferentes experimentos se puede observar que no hay cambios en los lavados. Sin embargo, si los comparamos con las imágenes SEM de las muestras iniciales (Figura 11), se aprecia un ligero cambio en la cantidad de NanoCu en superficie, especialmente con respecto a los elaborados con etanol:agua 70:30 y 80:20.

En el segundo experimento se realizó una serie de tres lavados (30 min, 1h y 2h) con agua corriente a 40°C y 60°C. Las muestras se prepararon con 0,12 g de sólido en 800µL de etanol:agua 50:50 (10,5 cm²). Una vez esto, el trozo de la mascarilla se dejó secar durante la noche al aire.

En cualquiera de los diferentes experimentos se puede observar que no hay cambios en los lavados respecto a la muestra inicial (Figura 20). Para comprobar este hecho se realizó análisis elemental de las muestras y se determinó que no hay diferencias entre ellas, con lo que se concluye que son estables frente a lavados.

Estabilidad frente a lavados en recubrimientos en tela de algodón 100%

En el caso de la tela, esta se incubó en agua del grifo a 40°C y 60°C, realizándose una serie de tres lavados (30 min, 1h y 2h). Una vez esto, el trozo de tela (conteniendo 0,12 g de híbrido en 10,5 cm²) se dejó secar durante la noche al aire. En cualquiera de los diferentes experimentos se puede observar que no hay cambios después de los lavados respecto a la muestra inicial (Figura 21). Para comprobar este hecho se analizaron las muestras en análisis químico y se determinó que no hay diferencias entre ellas, con lo

que se concluye que son estables frente a lavados.

Estabilidad frente a lavados en recubrimientos de metales (Acero y hierro)

5 En el caso de los metales, se realizó un lavado mediante la adición de etanol:agua 70:30 para comprobar que el recubrimiento no se desprendía de la superficie, dando como resultado la no desorción del recubrimiento.

Ejemplo 9. Eficiencia catalítica de biohíbrido NanoCu determinada mediante la reacción de de hidroxilación de p-aminofenol

10 La eficiencia catalítica de NanoCu fue determinada utilización la reacción de hidroxilacion de p-aminofenol como reacción modelo.

Se disolvió 1 mg de p-aminofenol en 10 mL de agua destilada y se añadieron 100 mM de peróxido de hidrógeno (1%, v/v). Para iniciar la reacción, se añadieron 3 mg de NanoCu (sin o con diferentes tratamientos) y se agitó suavemente a temperatura ambiente en un agitador orbital (320 rpm). La reacción fue seguida por determinación colorimétrica (aparición de color) mediante espectrometría de ultravioleta a una longitud de onda de 270 nm a un tiempo de 3 min de reacción.

20

REIVINDICACIONES

1. Uso no terapéutico de un material híbrido que comprende:
 - una matriz proteica compuesta por una enzima o proteína, y
 - nanopartículas esféricas de especies de cobre seleccionadas independientemente de entre $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$, Cu_2O y Cu (0), donde dichas nanopartículas están distribuidas de forma monodispersa dentro de la matriz, como agente biocida.
2. Uso según la reivindicación anterior donde la matriz proteica se selecciona de entre lipasa B de *Cándida antártica*, lipasa de *Thermomyces lanuginosus*, lipasa de *Bacillus thermocatenulatus*, proteína albumina humana y catalasa.
3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde las nanopartículas son de $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ y presentan una distribución de tamaño de diámetro único de entre $3\pm 0,5$ nm y $15\pm 0,5$ nm.
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la distribución de tamaño de diámetro único es de entre $3\pm 0,5$ nm y $5\pm 0,5$ nm.
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el agente biocida se emplea frente a un virus que se selecciona de entre el virus de la hepatitis C, SARS-CoV, MERS-CoV, y SARS-CoV-2 causante de la Covid-19.
6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el material híbrido actúa como agente de recubrimiento.
7. Uso según la reivindicación anterior, donde el recubrimiento se aplica en superficies de materiales seleccionados entre materiales cerámicos, materiales poliméricos, metales, papel, textil y mascarillas.
8. Uso según la reivindicación anterior donde el metal es hierro o acero.
9. Uso según la reivindicación 6 donde el material textil es algodón, preferiblemente algodón 100%.
10. Uso según cualquier de las reivindicaciones 6 a 9, donde el agente de recubrimiento

se emplea como aditivo para desinfección directa.

11. Uso según la reivindicación anterior donde el agente se añade a una solución seleccionada de entre hipoclorito sódico, peróxido de hidrógeno, isopropanol, etanol,
5 cloruro de didecildimetilamonio, y bromuro de hexadeciltrimetilamonio.
12. Material compuesto que comprende:
- a. un producto compuesto por un material seleccionado de entre material cerámico, material polimérico, metal, papel, textil o una mascarilla; y
 - 10 b. un recubrimiento que comprende el material híbrido según se describe en las reivindicaciones 1 a 4.
13. Material según la reivindicación anterior donde el metal es hierro o acero.
- 15 14. Material según la reivindicación 12, donde el material textil es algodón, preferiblemente algodón 100%.
15. Material según la reivindicación 12, donde el material es una mascarilla.
- 20 16. Procedimiento para la obtención del material compuesto según cualquier de las reivindicaciones 12 a 15, que comprende aplicar el recubrimiento disuelto en una solución hidroalcohólica sobre la superficie de un producto compuesto por material cerámico, material polimérico, metal, papel, textil o una mascarilla.
- 25 17. Procedimiento según la reivindicación anterior donde el recubrimiento se aplica disuelto en una solución hidroalcohólica con una concentración alcohol:agua comprendida entre el 50:50 y 80:20.
- 30 18. Procedimiento según la reivindicación anterior donde el alcohol se selecciona de entre etanol, propanol, isopropanol, y metanol.
19. Procedimiento según la reivindicación anterior, donde la concentración de la mezcla alcohol:agua es 50:50, y el alcohol es etanol.
- 35 20. Un material híbrido que comprende:
- una matriz proteica compuesta por una enzima o proteína seleccionada de entre lipasa de *Thermomyces lanuginosus*, lipasa de *Bacillus thermocatenuatus*, proteína albumina humana y catalasa, y

- nanopartículas esféricas de $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$, donde dichas nanopartículas están distribuidas de forma monodispersa dentro de la matriz y presentan una distribución de tamaño de diámetro único de entre $3\pm 0,5$ nm y $15\pm 0,5$ nm.

- 5 21. Un procedimiento de obtención del material híbrido descrito según la reivindicación
20 caracterizado por que comprende las siguientes etapas:
- a) adición en agitación de una enzima o proteína que se selecciona de entre lipasa
de *Thermomyces lanuginosus*, lipasa de *Bacillus thermocatenuatus*, proteína
albumina humana y catalasa, que forman la matriz proteica a una solución tampón
10 fosfato a un pH de 7;
- b) adición de una sal de cobre a la solución obtenida en la etapa a) a temperatura
ambiente de ente 20 y 25°C;
- c) incubación de la solución obtenida en la etapa b) durante un tiempo comprendido
entre 14-20h; y
- 15 d) recoger y lavar el material híbrido obtenido en la etapa anterior,
e) opcionalmente secar el producto obtenido de la etapa (d).
22. El procedimiento según la reivindicación anterior, en el que el material híbrido
recolectado en la etapa (d) se seca por liofilización en la etapa e).
- 20 23. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 22, donde la sal de
cobre en la etapa (b) es $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.
24. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, en el que se
25 añaden 10 mg de sal de cobre en la etapa b) por ml de solución tampón.
25. Solución desinfectante que comprende el material híbrido según la reivindicación
20 disuelto en un medio seleccionado de entre hipoclorito sódico, peróxido de
hidrógeno, isopropanol, etanol, cloruro de didecildimetilamonio, y bromuro de
30 hexadeciltrimetilamonio.

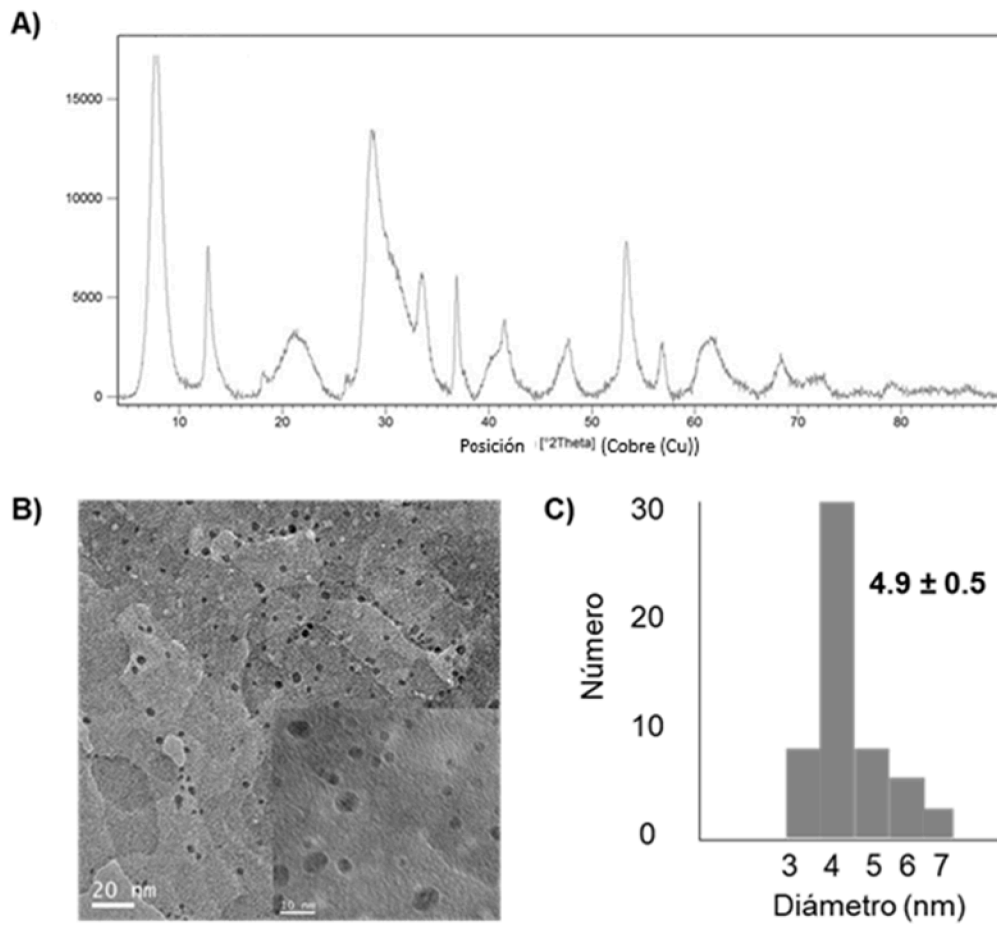


FIG. 1

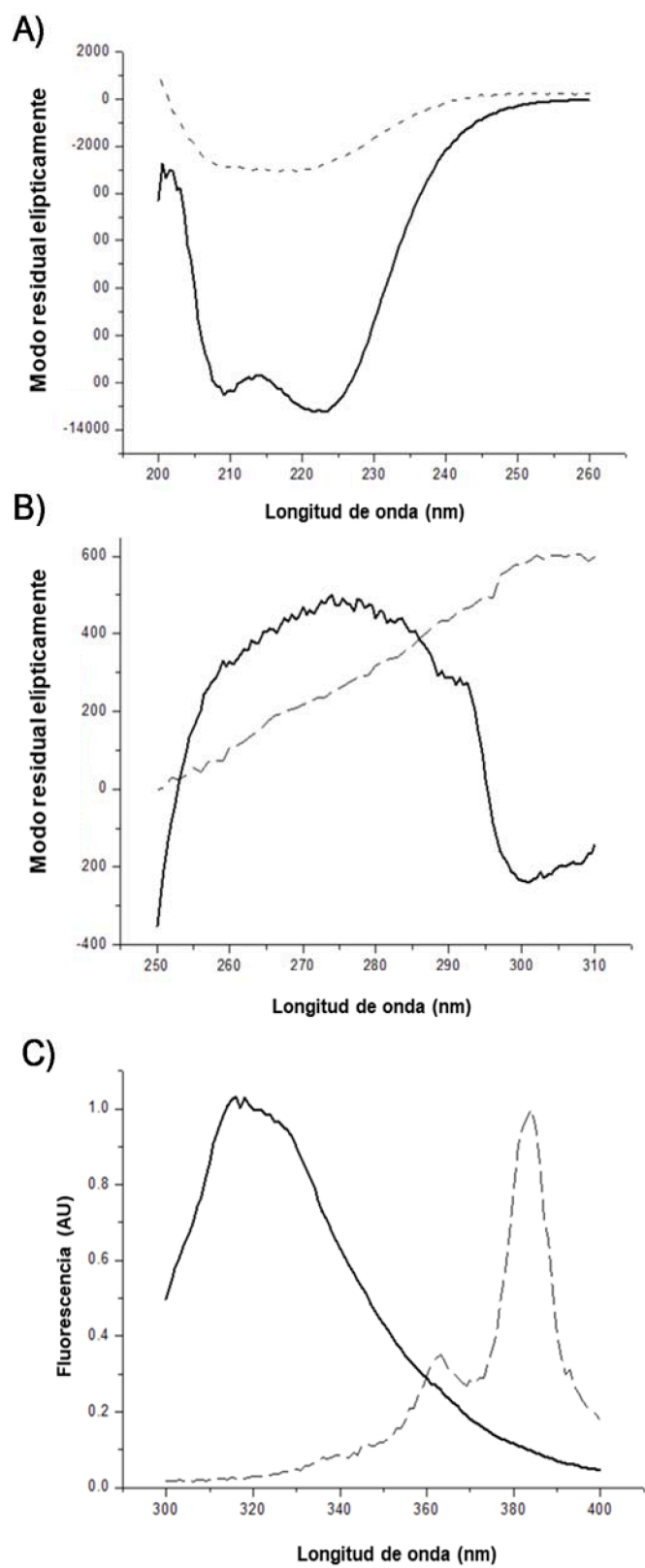


FIG. 2

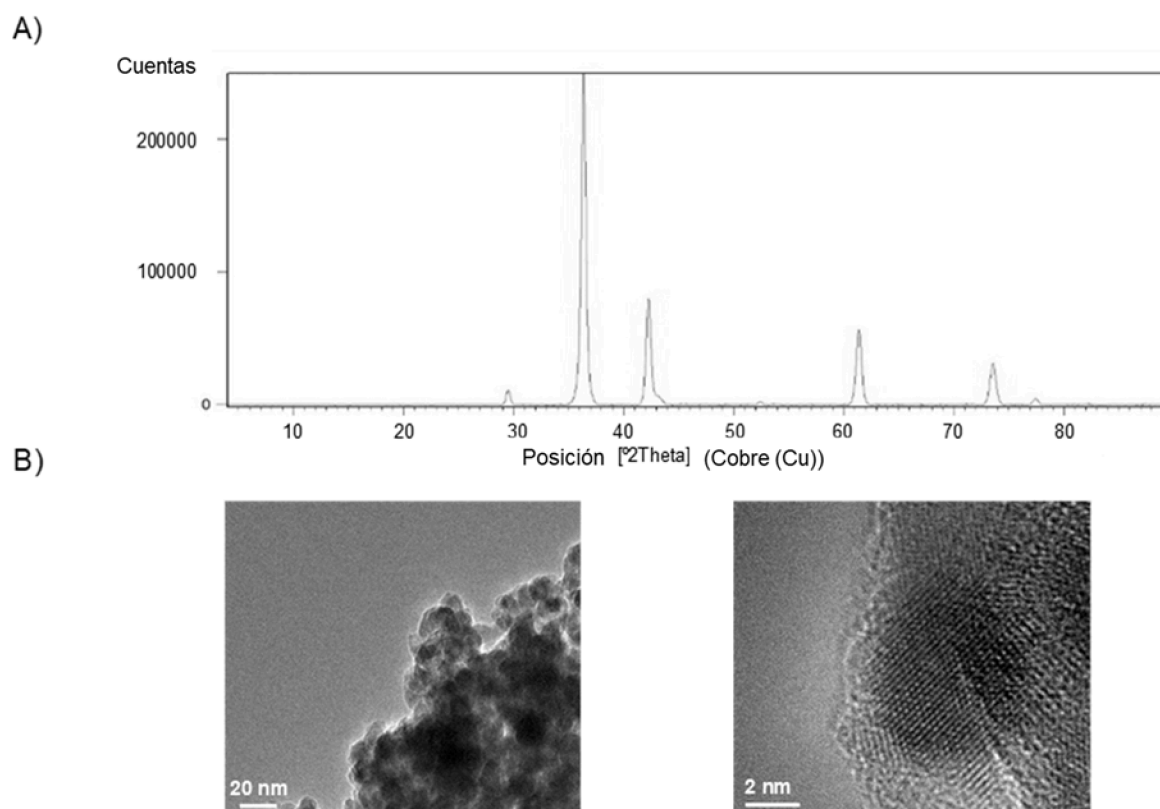


FIG. 3

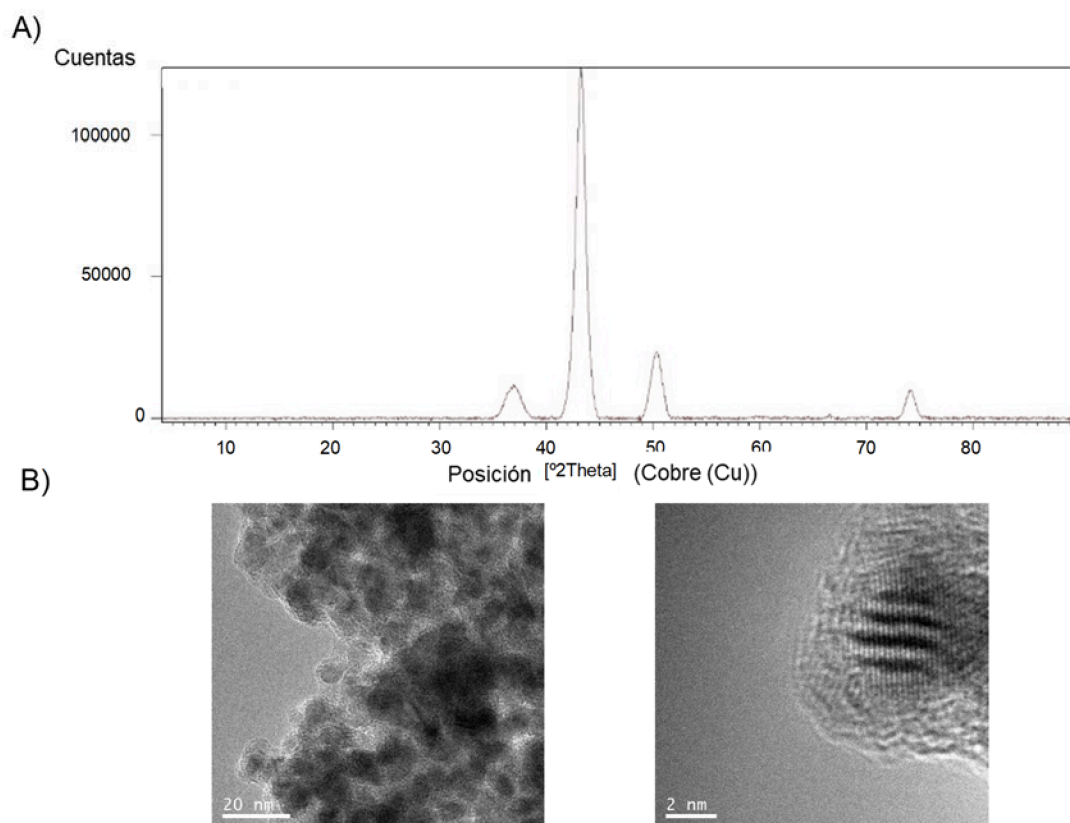


FIG. 4

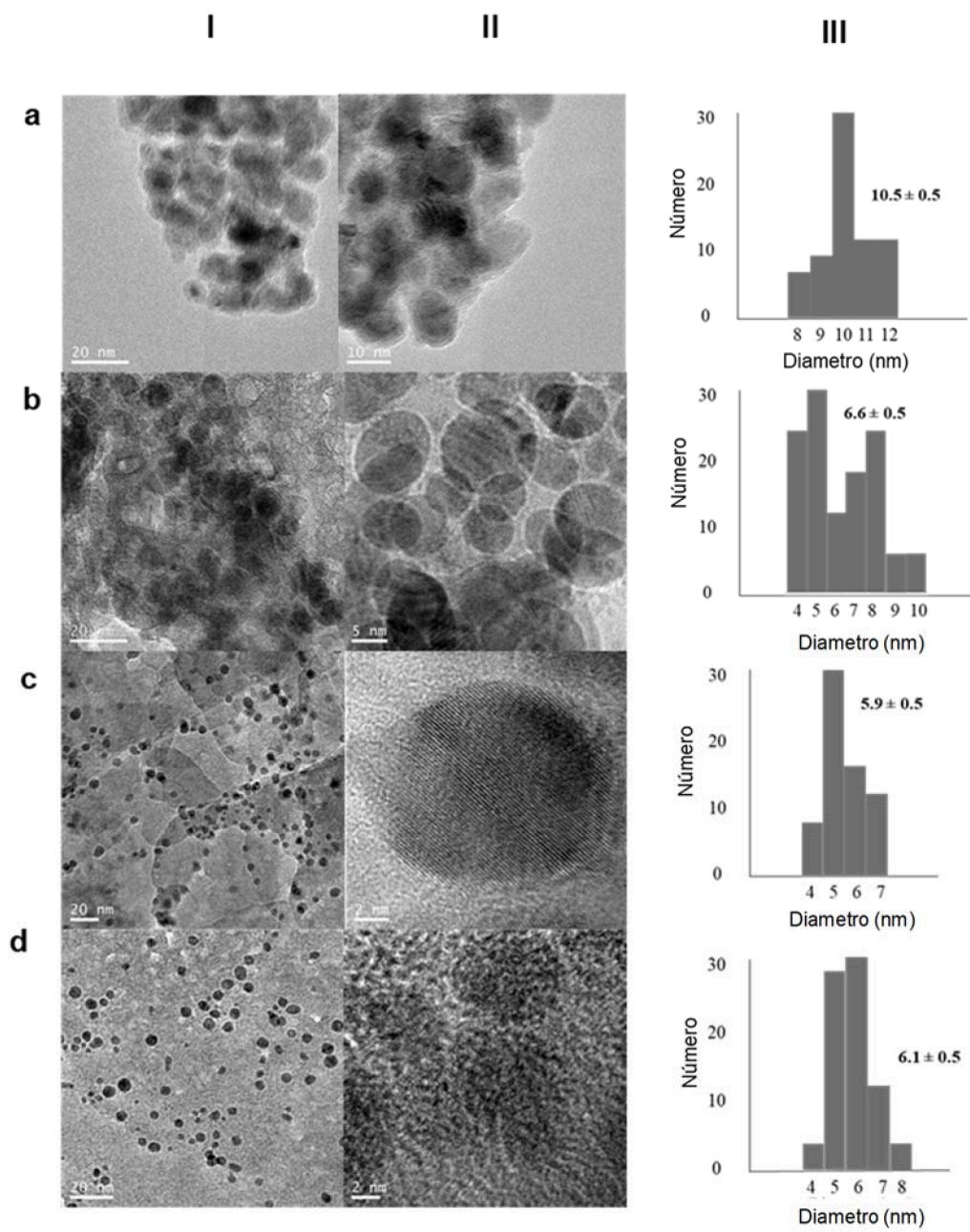


FIG. 5

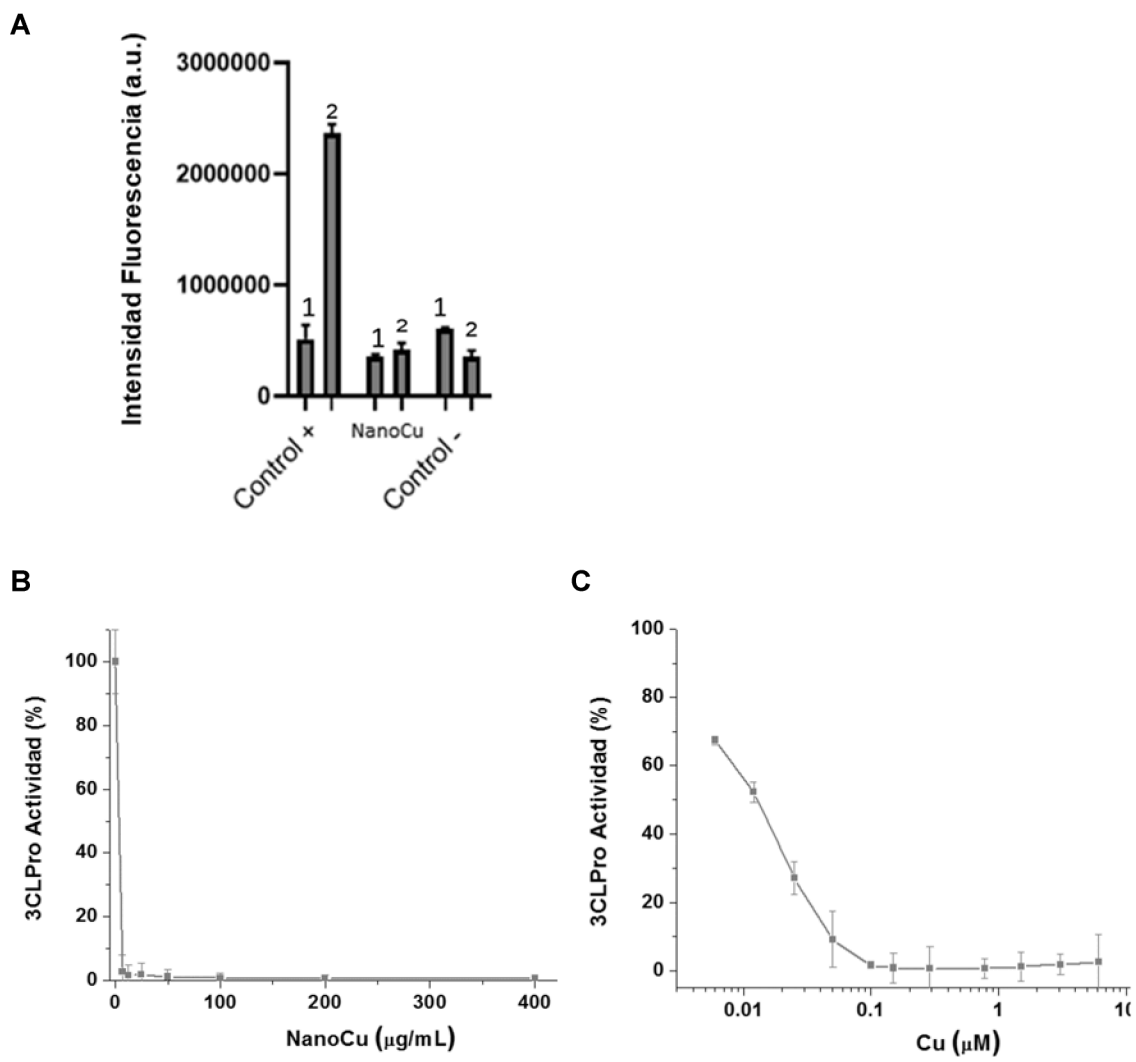
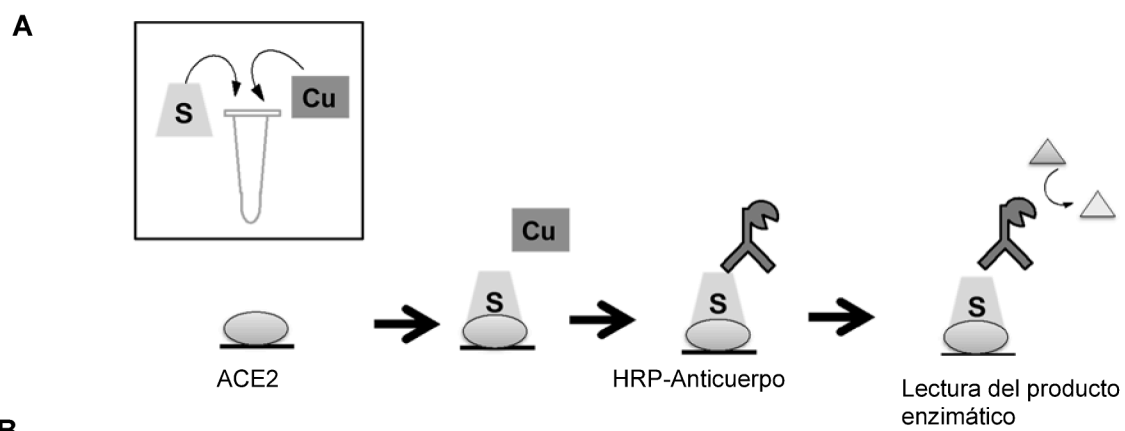


FIG. 6



B

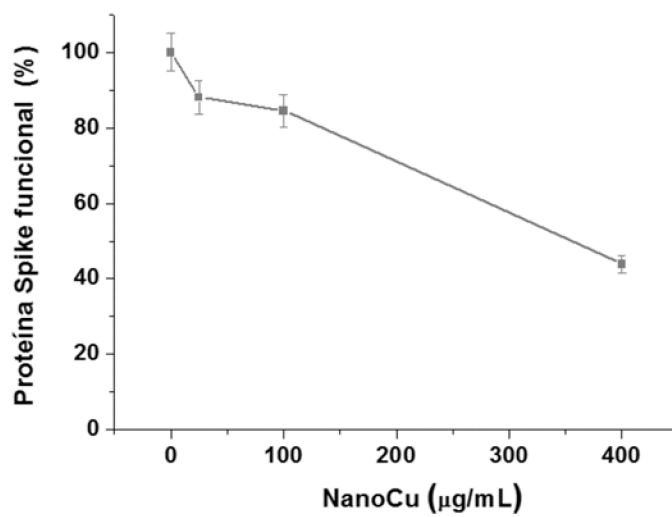


FIG. 7

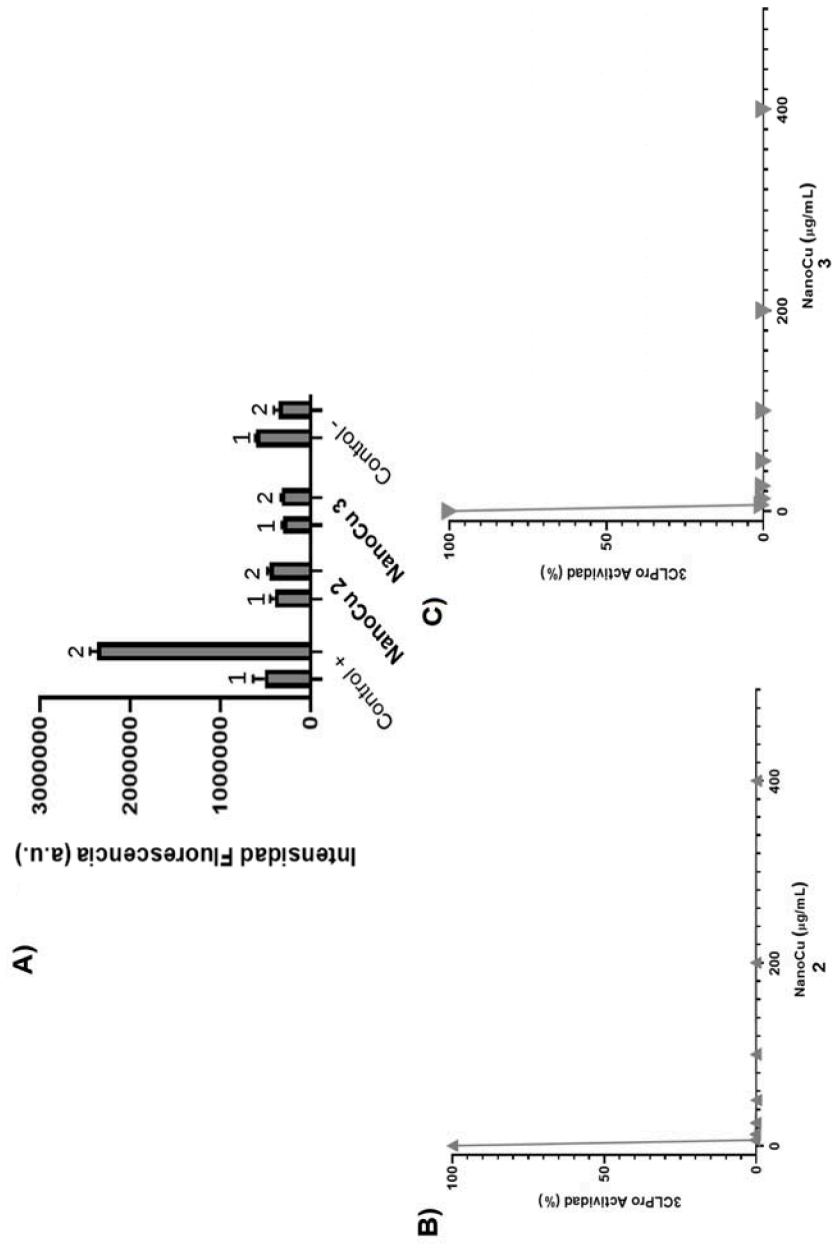


FIG. 8

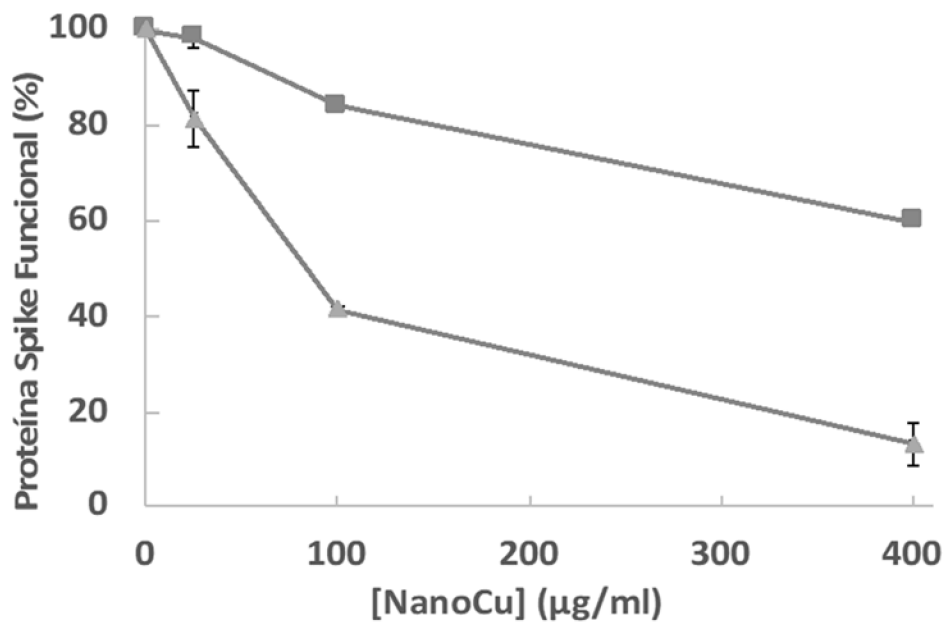


FIG. 9

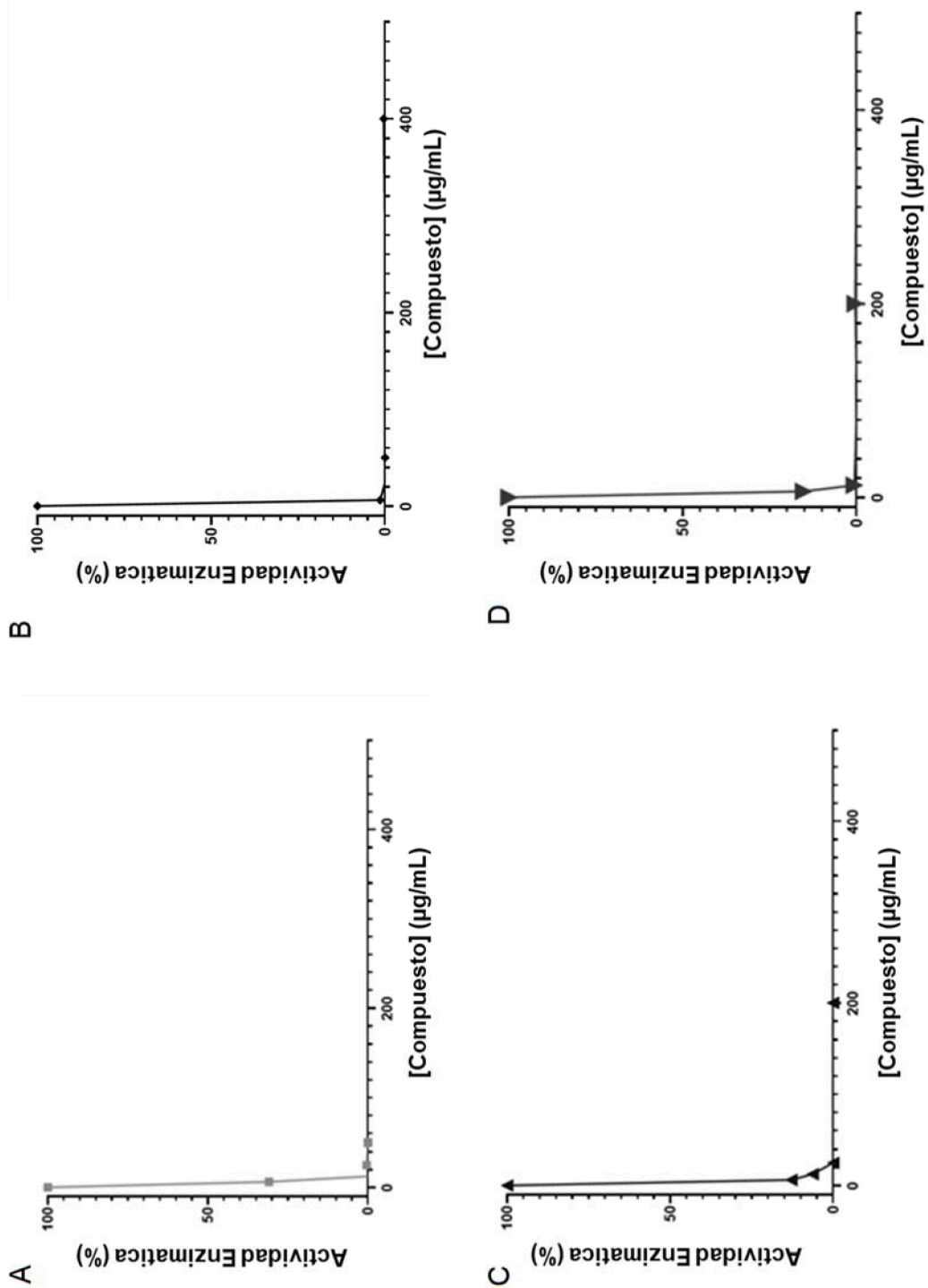


FIG. 10

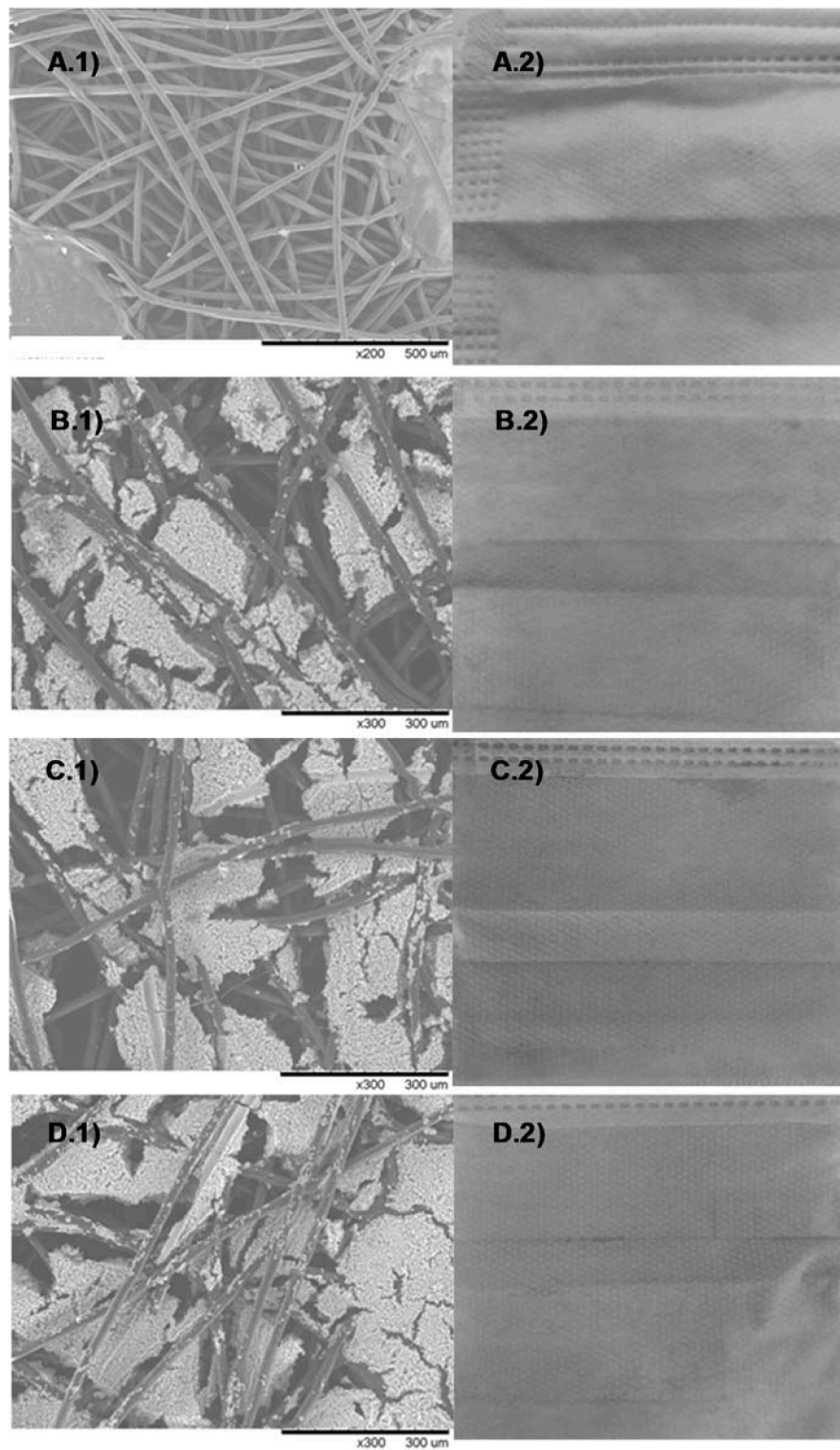


FIG. 11

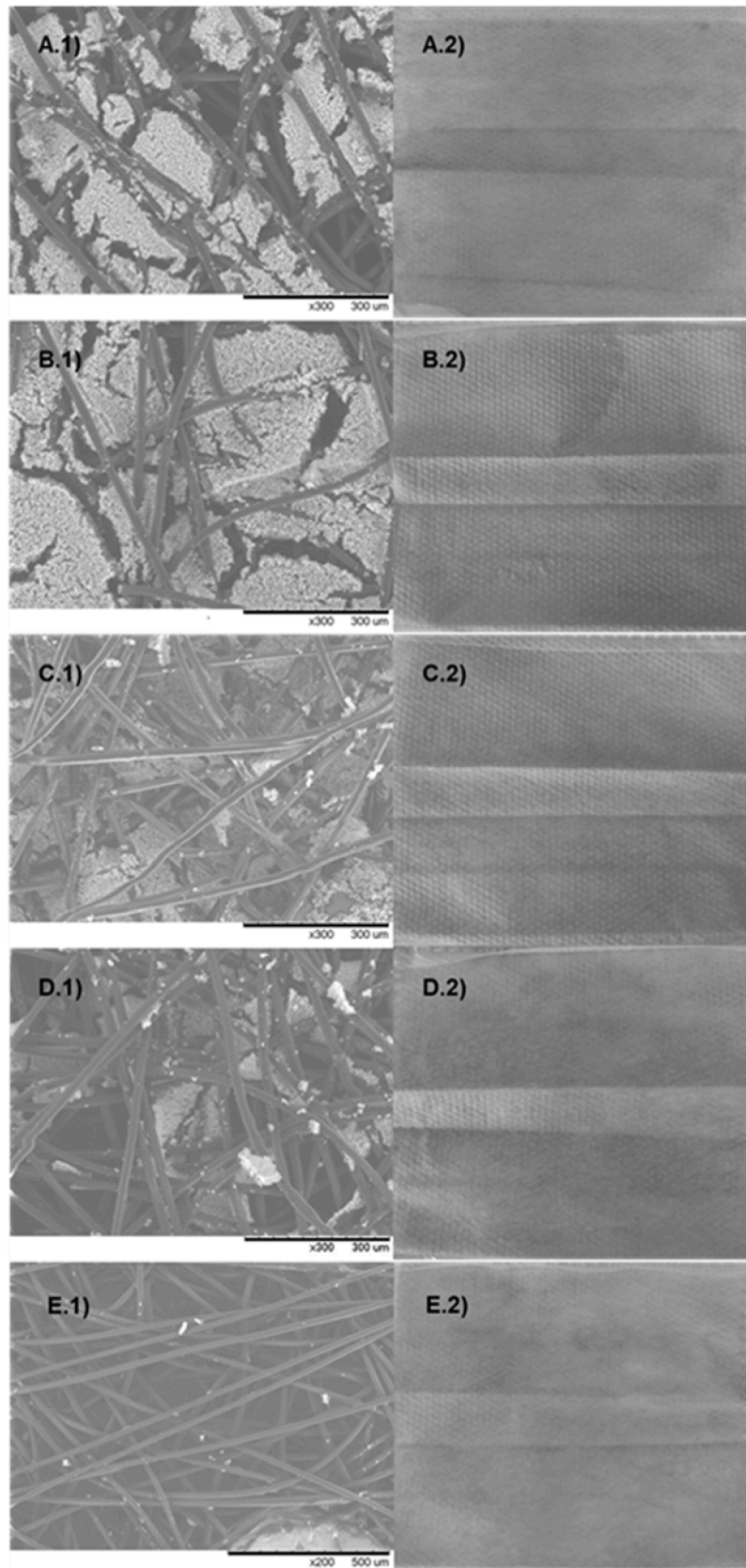


FIG. 12

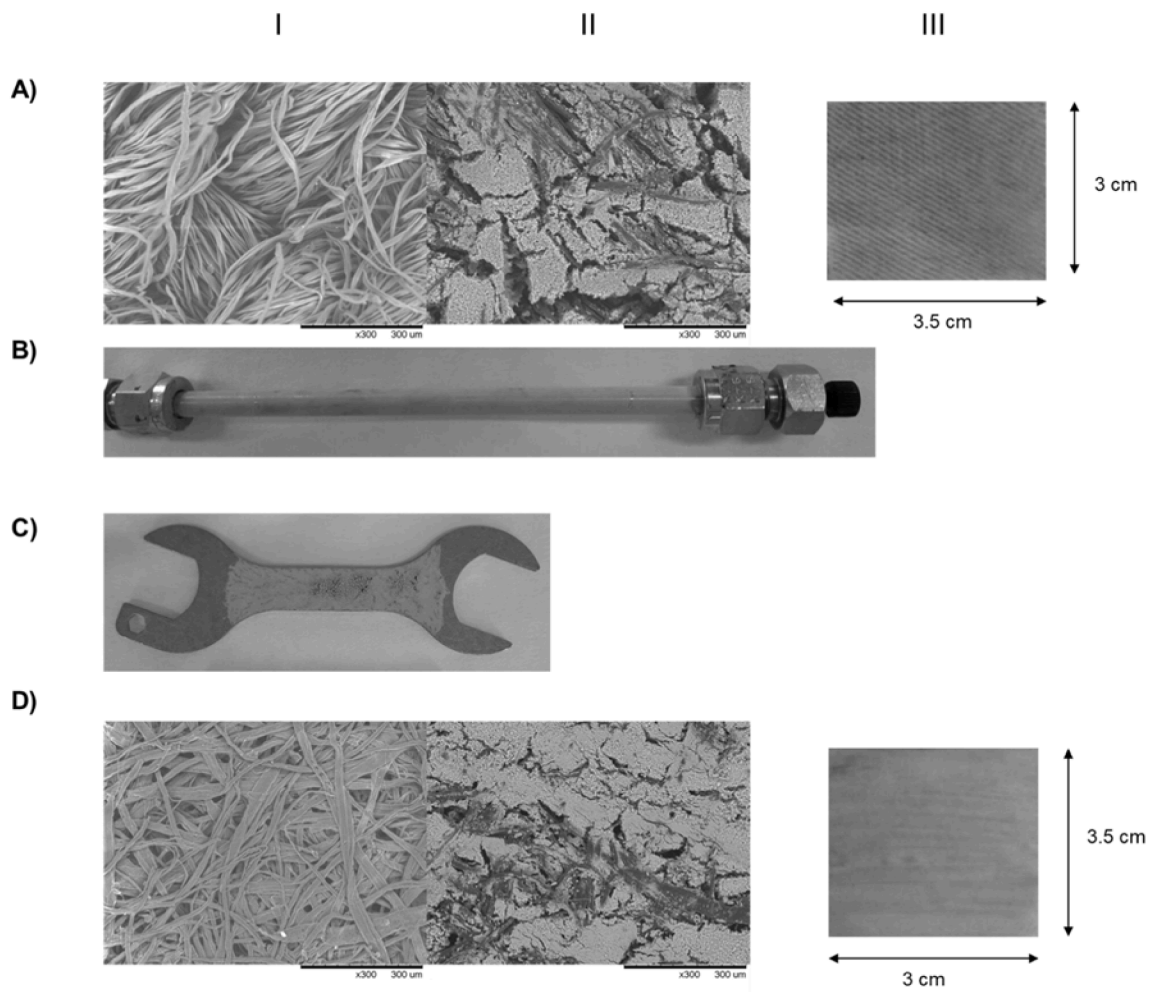


FIG. 13

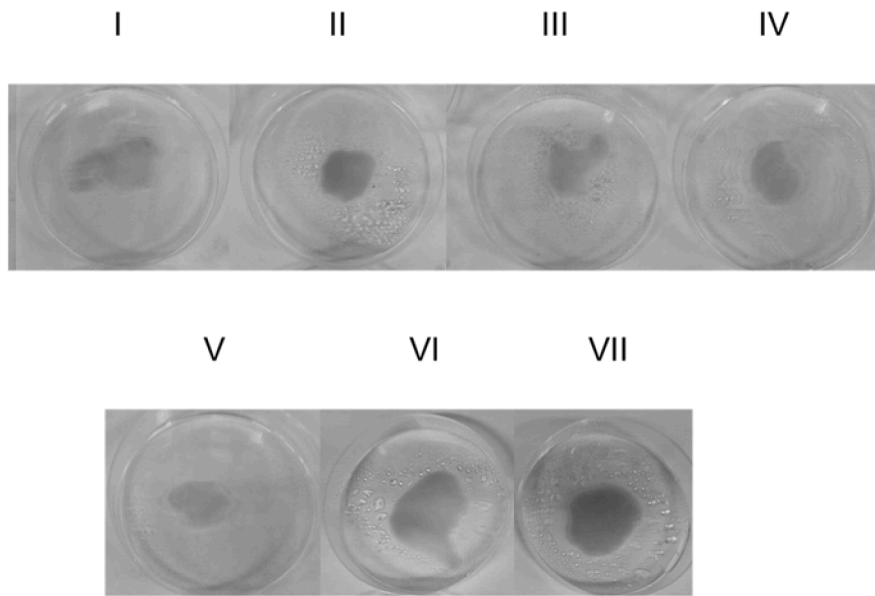


FIG. 14

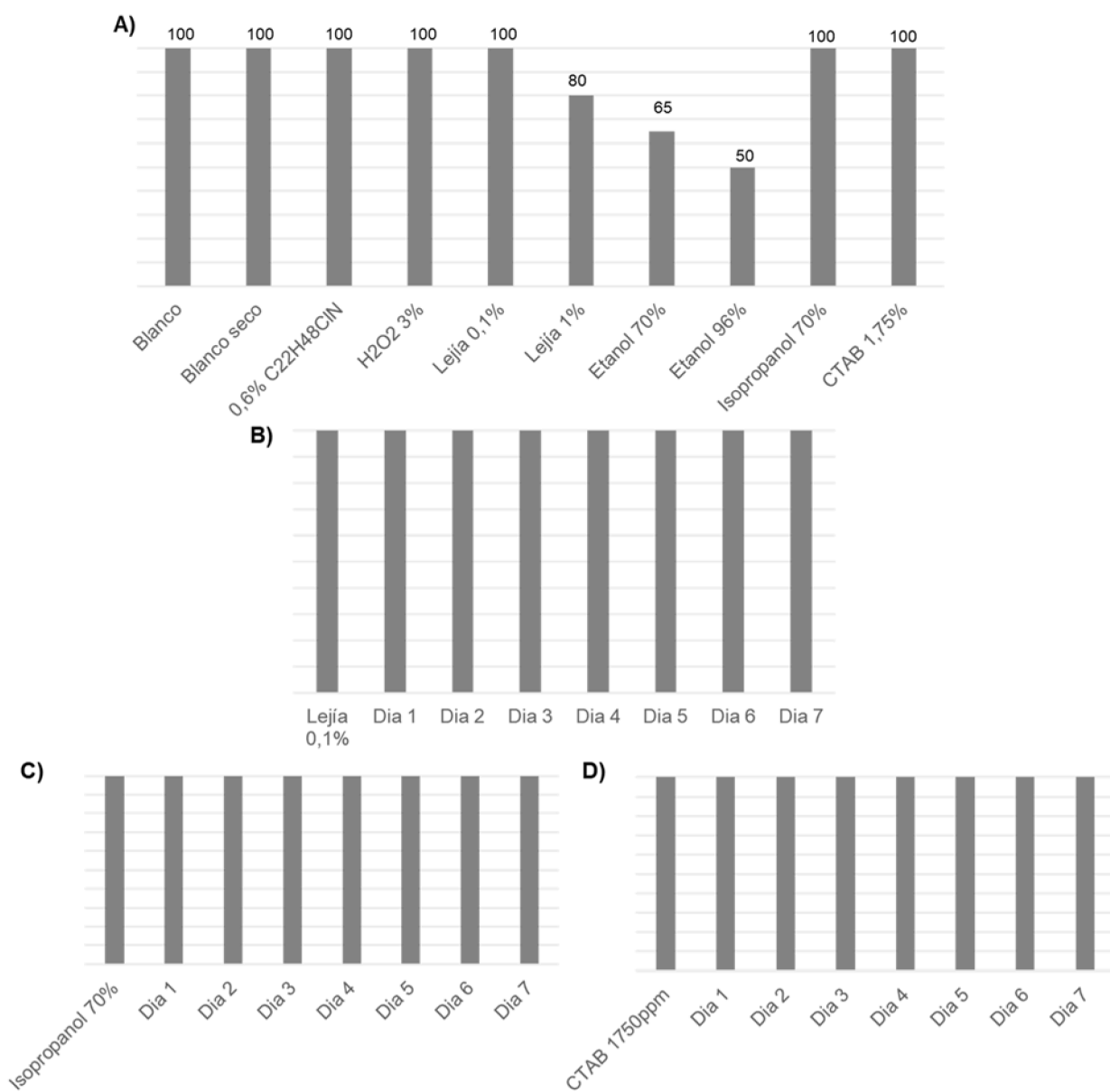


FIG. 15

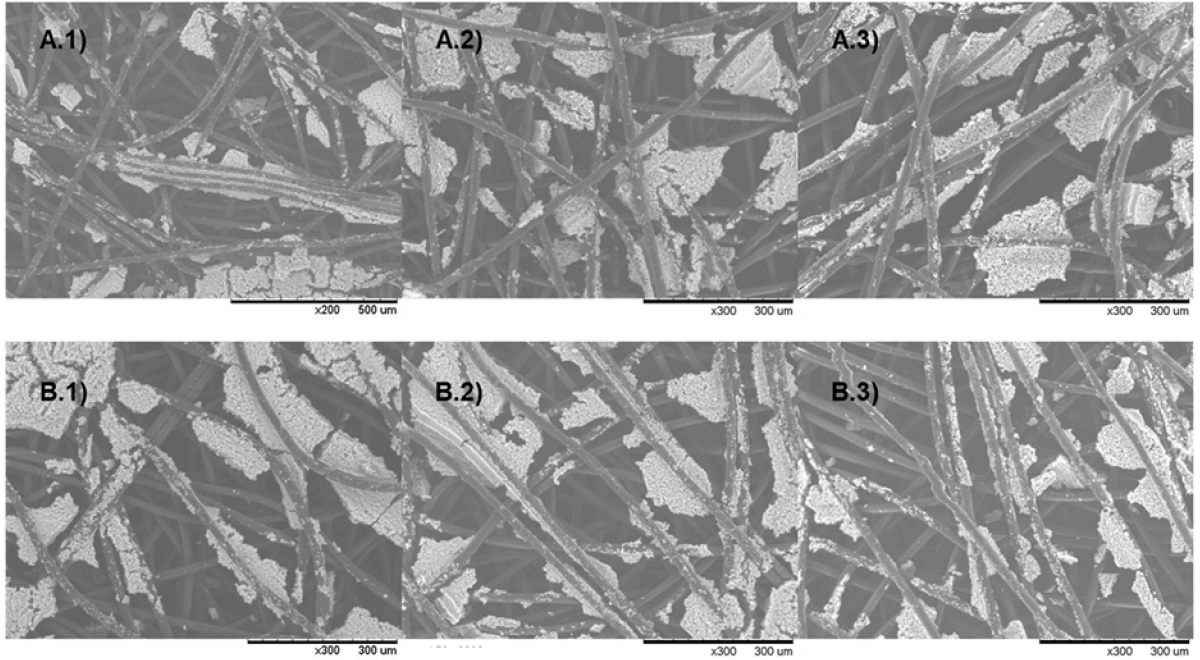


FIG. 16

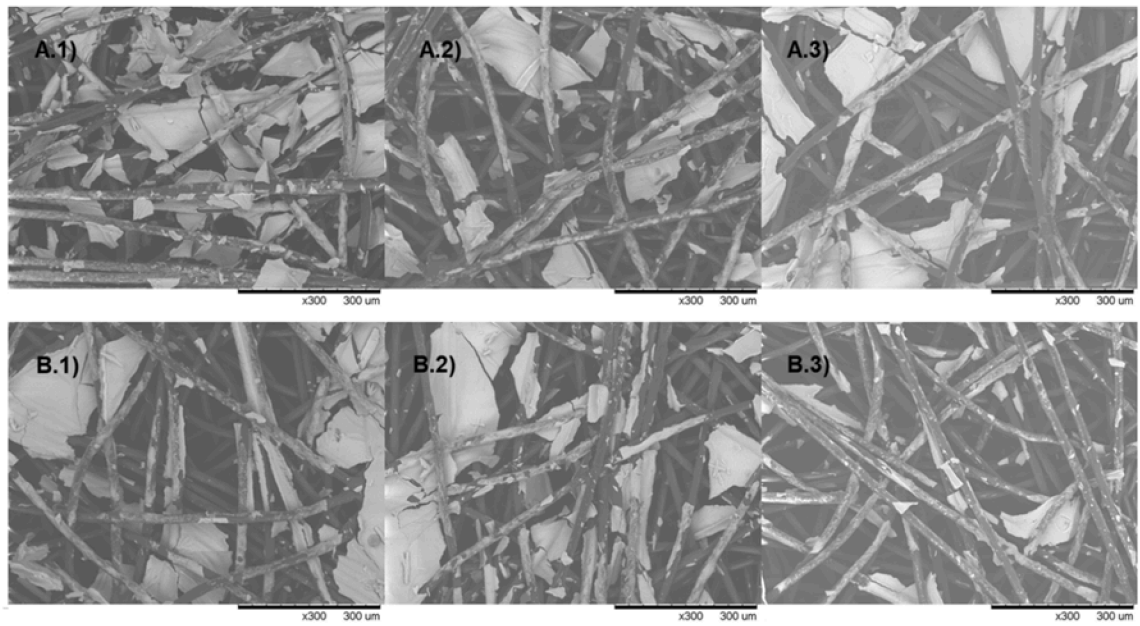


FIG. 17

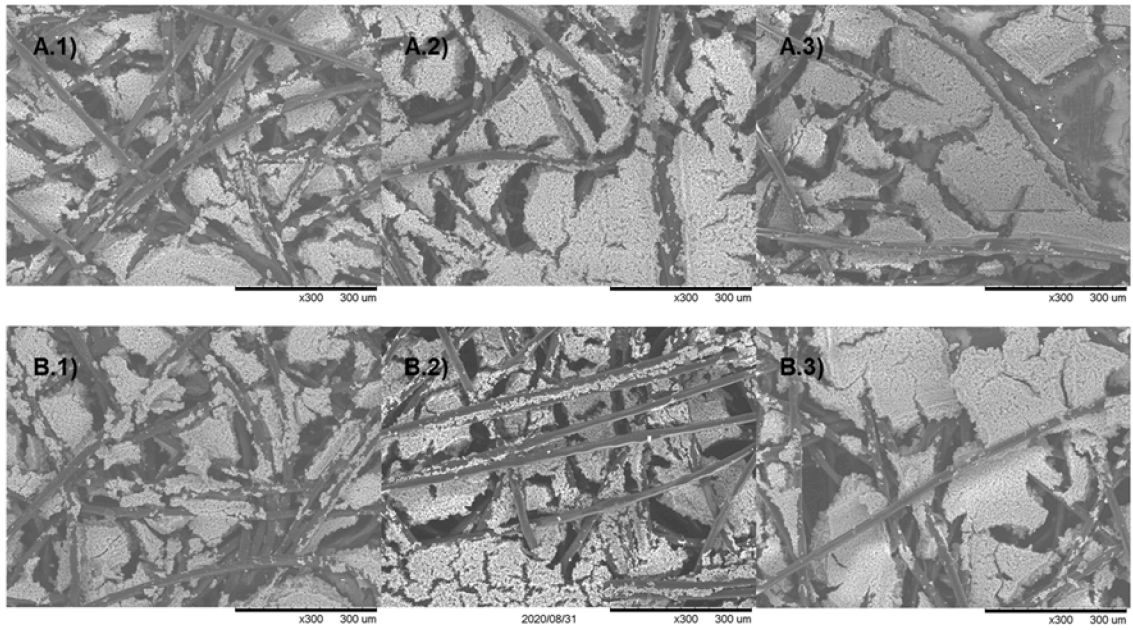


FIG. 18

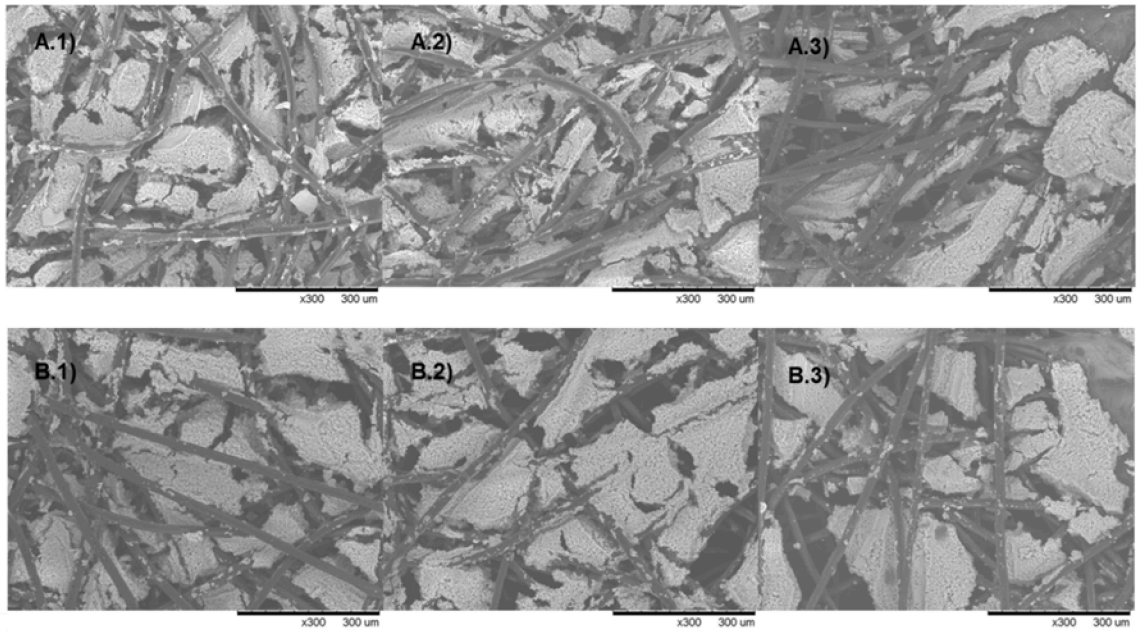
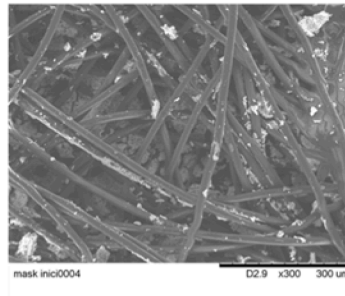


FIG. 19

A)

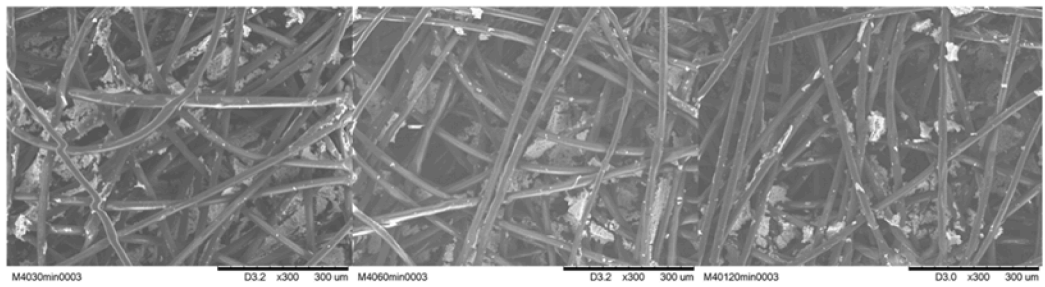


I

II

III

B)



C)

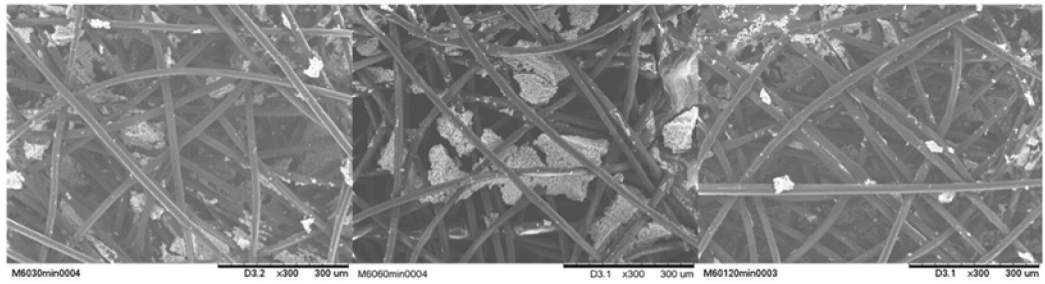
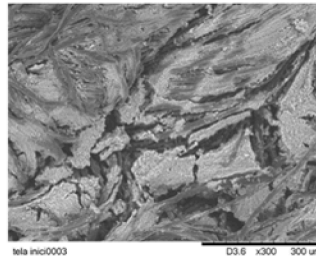


FIG. 20

A)

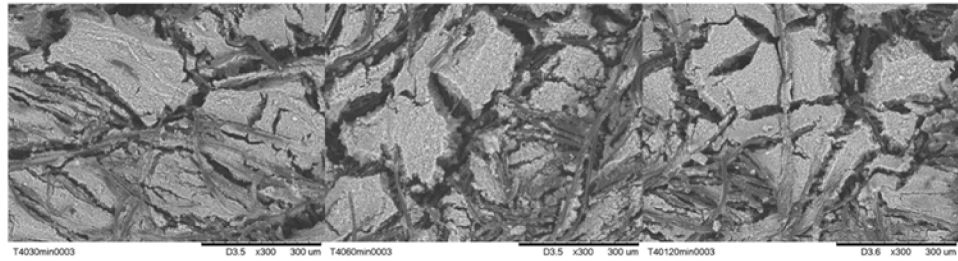


I

II

III

B)



C)

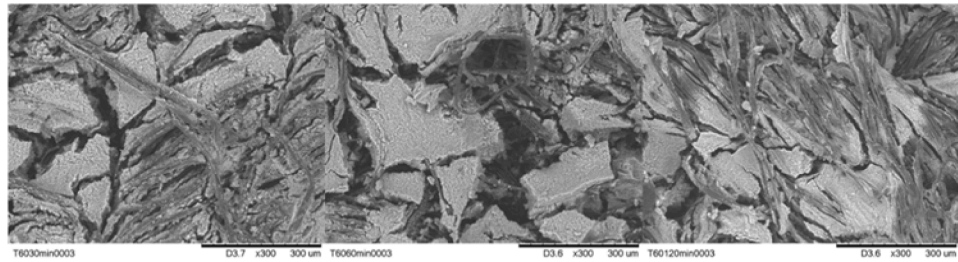


FIG. 21



- ① N.º solicitud: 202031282
② Fecha de presentación de la solicitud: 22.12.2020
③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	LOSADA-GARCIA N <i>et al.</i> Fast Degradation of Bisphenol A in Water by Nanostructured CuNPs@CALB Biohybrid Catalysts. <i>Nanomaterials</i> Jan. 2020 MDPI Switzerland, 31/12/2019, Vol. 10, Nº 1, Páginas 7 (11 pp.), ISSN 2079-4991 (print), <DOI: doi:10.3390/nano10010007>. página 2, apartado 2; página 3, tercer párrafo; página 4, segundo párrafo; resumen.	1-25
A	ANURADHA V. CHITNIS <i>et al.</i> <i>In vitro</i> virucidad activity of comercial enzyme preparations against SARS-COV-virus. Preprints. Short communication, 21/12/2020, Páginas 1-6, <DOI: doi:10.20944/preprints202012.0543.v1>. página 2, segundo párrafo; página 3, tercer párrafo; página 4, segundo párrafo.	1-25
A	RAYANNE M. BEZERRA <i>et al.</i> A new heterofunctional support for enzyme immobilization: PEI functionalized Fe ₃ O ₄ MNPs activated with divinyl sulfone. Application in the immobilization of lipase from <i>Thermomyces lanuginosus</i> . <i>Enzyme and Microbial Technology</i> , 23/04/2020, Vol. 138, Páginas 1-11, <DOI: doi: 10.1016/j.enzmictec.2020.109560 >. página 2, columna derecha, tercer y quinto párrafos.	1-25
A	XI YU <i>et al.</i> Broad spectrum virucidal activity of bacterial secreted lipases against flaviviruses SARS-CoV-2 and other enveloped virus. <i>bioRxiv</i> , 25/05/2020, Páginas 1-30 Recuperado de Internet <URL: doi: https://doi.org/10.1101/2020.05.22.109900 >. resumen.	1-25
A	MADURAY KAMINEE <i>et al.</i> Metal Nanoparticles: a Promising Treatment for Viral and Arboviral Infections. <i>BIOLOGICAL TRACE ELEMENT RESEARCH</i> , 20201007 HUMANA PRESS, CLIFTON, NJ, US. Vincent John B jvincent@ua.edu, 07/10/2020, Vol. 199, Nº 8, Páginas 3159 - 3176, ISSN 0163-4984, <DOI: doi:10.1007/s12011-020-02414-2>. página 3, columna izquierda, segundo párrafo; página 3, columna derecha, tercer párrafo; página 8, columna izquierda, tercer párrafo; página 8, columna derecha, primer párrafo.	1-25
A	US 2015314471 A1 (THOMPSON KIMBERLEE <i>et al.</i>) 05/11/2015, párrafos [0009]-[0011], [0020], [0023], [0040], [0041], [0062].	1-25

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
21.10.2021

Examinador
S. González Peñalba

Página
1/3



- 21 N.º solicitud: 202031282
22 Fecha de presentación de la solicitud: 22.12.2020
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
A	AARON A. CORTES; JORGE M. ZUÑIGA. The use of copper to help prevent transmission of SARS-coronavirus and influenza viruses A general review. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 15/08/2020, Vol. 98, N° 4, Páginas 1-5, ISSN 0732-8893, <DOI: doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2020.115176 >. página 4, columna derecha, cuarto párrafo.	1-25

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 n.º:

Fecha de realización del informe
21.10.2021

Examinador
S. González Peñalba

Página
2/3

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A01N63/50 (2020.01)

A01N59/20 (2006.01)

A01N55/02 (2006.01)

A41D31/30 (2019.01)

A41D13/11 (2006.01)

A61L2/16 (2006.01)

D06M11/83 (2006.01)

B82Y30/00 (2011.01)

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

A01N, A41D, A61L, D06M, 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, NPL, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, INTERNET.