



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 331 781**

② Número de solicitud: 200800451

⑤ Int. Cl.:
B82B 1/00 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
C07K 14/575 (2006.01)
G01N 33/483 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **31.01.2008**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **14.01.2010**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
14.01.2010

⑦ Solicitante/s: **Universidad Pablo de Olavide**
Carretera de Utrera, Km 1
41013 Sevilla, ES
Universidad de Sevilla,
Consejo Superior de Investigaciones Científicas y
Fundación Reina Mercedes para la Investigación
Sanitaria

⑦ Inventor/es: **Mejías Romero, José Antonio;**
Castillo Hernández, Paula Margarita;
Zaderenko Partida, Ana Paula;
Caro Salazar, Carlos Alberto;
Pozo Pérez, David;
Fernández Montesinos, Rafael;
Delgado Mora, Mario;
González-Rey, Elena y
García Luna, Pedro Pablo

⑦ Agente: **Temño Cenicerros, Ignacio**

⑤ Título: **Nanopartículas metálicas funcionalizadas con el neuropéptido VIP y procedimiento de preparación.**

⑤ Resumen:

Nanopartículas metálicas funcionalizadas con el neuropéptido VIP y procedimiento de preparación.

Constituye el objeto de la presente invención nanopartículas metálicas funcionalizadas con el neuropéptido VIP, así como el procedimiento de preparación de dichas nanopartículas.

Las nanopartículas objeto de la presente invención presentan uniones selectivas de nanopartículas a péptidos en dos orientaciones posibles, grupo NH₂ o grupo COOH. En esta última orientación, los péptidos si son reconocidos por los receptores de membranas celulares, lo que proporciona una herramienta que permite discernir efectos dependientes e independientes de receptor.

El péptido empleado ha sido el VIP, mediante el cual se obtiene un amplio espectro de funciones biológicas, incluida inmunomodulación, actuando predominantemente como un potente anti-inflamatorio y un agente inhibidor de la respuesta del Th1 en el sistema inmunitario y emergiendo como un importante factor terapéutico para el tratamiento de enfermedades con componentes inflamatorias y autoinmunes.

ES 2 331 781 A1

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas metálicas funcionalizadas con el neuropéptido VIP y procedimiento de preparación.

5 **Sector y objeto de la invención**

Sector químico, bioquímico, inmunológico. Producto para aplicaciones biomédicas. Liberación de fármacos de forma selectiva e identificación de tejidos y/o células diana.

10 Constituye el objeto de la presente invención nanopartículas metálicas funcionalizadas con el neuropéptido VIP, así como el procedimiento de preparación de dichas nanopartículas.

Estado de la técnica

15 Durante las últimas décadas, se ha progresado mucho en el diseño de biosensores ópticos y su aplicación a medioambiente [Ji, J.; Schanzle, J. A.; Tabacco, M. B. *Anal. Chem.* (2004), 76, 1411-1418.], biotecnología [Kohls, O.; Scheper, T. *Sens. Actuators, B* (2000), 70, 121-130.], diagnóstico médico [Yonzon, C. R.; Haynes, C. L.; Zhang, X.; Walsh, J. T.; Van Duyne, R. P. *Anal. Chem.* (2004), 76, 78-85], selección de fármacos [Ho, H.; Leclerc, M. *J. Am. Chem. Soc.* (2004), 126, 1384-1387.] y seguridad alimentaria [Wiskur, S. L.; Anslyn, E. V. *J. Am. Chem. Soc.* (2001), 20 123, 10109-10110.].

El potencial de los biosensores basados en resonancias de plasmones de superficie se descubrió a principios de los 80s por Liedberg *et al.*, quienes detectaron mediante el uso de anticuerpos interacciones proteína-carbohidrato [MacKenzie, C. R.; Hiram, T.; Deng, S. j.; Bundle, D. R.; Narang, S. R. *J. Biol. Chem.* (1996), 271, 1527-1533.], proteína-ADN [Brockman, J. M.; Frutos, A. G.; Corn, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* (1999), 121, 8044-8051.], ADN-ADN [Gotoh, M.; Hasegawa, Y.; Shinohara, Y.; Shimizu, M.; Tosu, M. *DNA Res.* (1995), 2, 285-293.] y adhesión de células [Van Der Merwe, P. A.; Barclay, A. N. *Curr. Opin. Immunol.* (1996), 8, 257-261].

El primer biosensor de anticuerpos basado en la respuesta de la extinción de nanopartículas de Au coloidales a perturbaciones locales del índice de refracción, se desarrolló hace menos de una década [Englebienne, P. *Analyst* (1998), 123, 1599-1603.]. Desde entonces, los biodetectores basados en las resonancias de plasmones localizados en superficie (LSPR) de nanopartículas se han empleado de forma creciente en detecciones biológicas [Haes, A. J.; Van Duyne, R. P. *J. Am. Chem. Soc.* (2002), 124, 10596-10604; C. R. Yonzon, E. Jeoung, S. Zou, G. C. Schatz, M. Mwsich, R. P. Van Duyne *J. Am Chem. Soc.* (2004), 126, 12669] y químicas [McFarland, A. D.; Van Duyne, R. P. 35 *Nano Lett.* (2003), 3, 1057-1062.].

Gracias al enorme interés de esos nano-bioconjugados se han desarrollado un amplio rango de aplicaciones tales como distribución de fármacos, marcadores moleculares, análisis bioquímicos ultrasensibles, desarrollo de dispositivos "lab-on-a-chip", construcción de nanocomponentes electrónicos, motores nano-moleculares... etc [C. M. Niemeyer, 40 C. A. Mirkin Eds. *Nanobiotechnology*, Wiley-VCH 2004].

También se han usado como agentes potenciadores de contraste en microscopía electrónica [D. L. Feldheim, C. A. Foss, Jr. Eds. *Metal nanoparticles. Synthesis, Characterization and Applications*, Marcel-Dekker 2002.].

45 Existe un creciente interés por los efectos biológicos de las nanopartículas, de su toxicidad y su alcance en función del medio [M. Tsoli *et al.* *Small* (2005); 1:841], por ejemplo, su uso potencial como herramienta terapéutica en tratamientos de : cáncer [Ivan H. El-Sayed, Xiaohua Huang and Mostafa A. El- Sayed. *Nano Letters* (2005) Vol.5, N°5. 829-834].

50 Entre los diferentes tipos de nanopartículas, los metales nobles son de especial relevancia pues gracias a sus propiedades plasmónicas se produce un aumento de la señal, mejorando la sensibilidad de la técnica y haciéndolos idóneos como marcadores moleculares en medidas de transmisión y dispersión de luz [M.A. El-Sayed *Acc. Chem. Res.* (2001), 34, 257.], SERS [M. Käll, H. Xu, P. Johansson, *Journal of Raman Spectroscopy*, (2005), 36, 510.], infrarrojo (IR) y fluorescencia [S. Schultz, D.R. Smith, J.J.Mock, D.A.Schultz P.N.A.S. (2000), 97, 996].

55 Por otro lado, los efectos biológicos del neuropéptido VIP tienen un interés creciente por su capacidad moduladora en patologías en las que hay un componente inflamatorio y/o autoinmunitario [Grimm, M. C. *et al.* (2003) *J. Immunol.* 171, 4990-4994; Pozo, D. (2003) *Trends Mol. Med.* 9, 211-217; Ganea, D., and Delgado, M. (2002). *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 13, 229-237; Delgado, M. *et al.* (2003). *Trends Immunol.* 24, 221-224]. Asimismo las células de determinados tumores humanos sobreexpresan receptores específicos para VIP en sus membranas plasmáticas. Su toxicidad y efectos adversos son escasos. Sin embargo, una de las limitaciones para el uso clínico de los neuropéptidos en general, y del VIP en particular, es su corta vida media en circulación, lo que haría necesaria la administración crónica del mismo, aumentando los costes económicos y dificultando su posología al paciente.

65 La funcionalización de nanopartículas se sabe que aumenta en determinados casos la vida media de la molécula unida a la misma, ya que dificulta el ataque proteolítico. En cualquier caso, ya sea como agente terapéutico sobre células dianas o como modo de liberación de otros fármacos sobre tumores que sobreexpresan receptores de VIP, la funcionalización de nanopartículas de VIP se enfrenta al problema de diseñar un método eficaz por el que se

pueda funcionalizar de forma que su extremo carboxilo-terminal quede libre, ya que es por éste extremo por donde interacciona con sus receptores específicos de membrana. En general, la funcionalización de un péptido para dejar libre su extremo aminoterminal no presenta dificultades en la actualidad, justo lo opuesto a lo que ocurre cuando se pretende dejar expuesto el extremo carboxilo.

5 El procedimiento objeto de la presente invención permite la funcionalización de VIP en nanopartículas metálicas dejando intacta su capacidad de interacción con sus receptores específicos, lo que permitirá formular estrategias de detección y liberación selectiva de fármacos sobre células tumorales o el tratamiento de enfermedades con un componente autoinmune y/o inflamatorio.

10 En resumen, los estudios hasta la fecha descritos mantienen una orientación de nanopartícula/péptido dejando libre el grupo amino de la proteína para participar en las funciones de reconocimiento celular. En las nanopartículas objeto de la presente invención, una de las configuraciones deja libre el grupo amino, mientras que otra permite dejar el extremo ácido del VIP disponible, el grupo funcional realmente encargado de mantener esa recepción específica e intervenir en las funciones celulares. Las nanopartículas así funcionalizadas son estables, no tóxicas, solubles en agua, y compatibles con los sistemas biológicos. Permiten asimismo el estudio y adscripción de efectos dependientes (carboxilo libre) e independientes de receptor (amino libre).

20 En cuanto al procedimiento de preparación, no hay técnica actual sobre la funcionalización de nanopartículas con proteínas que tengan libre su extremo ácido. Gracias al procedimiento objeto de la presente invención, se obtienen aquí nanopartículas funcionalizadas con péptidos, que gracias a tener su grupo ácido disponible, pueden participar en otras funciones de reconocimiento celular.

25 Para que el VIP [Grimm, M. C. *et al.* (2003) *J. Immunol.* 171, 4990-4994; Pozo, D. (2003) *Trends Mol. Med.* 9, 211-217; M; Ganea, D., and Delgado, M. (2002). *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 13, 229-237; Delgado, M. *et al.* (2003). *Trends Immunol.* 24, 221-224; D. Pozo, M. Delgado. *FASEB Journal.* (2004); 18: 1325] sea reconocido a nivel celular, necesita de esta segunda orientación (grupo ácido disponible) y así poder transducir éstas funciones de reconocimiento celular en una respuesta biológica.

30 Por tanto, el procedimiento objeto de la presente invención permite sintetizar nanopartículas que puedan ser usadas como sensores distintos grupos orgánicos y más específicamente nanopartículas con proteínas con grupos ácidos disponibles que puedan intervenir en funciones de reconocimiento celular.

35 Explicación de la invención

Constituye un objeto de la presente invención las nanopartículas metálicas funcionalizadas, compuestas por un núcleo metálico unido a un mercaptoderivado, el cual a su vez se une a través de al menos uno de sus grupos ácidos a un polímero derivado del polietilenglicol (PEG) bis-amino terminado, estando dichas nanopartículas funcionalizadas con un neuro-péptido, particularmente el péptido intestinal vasoactivo (VIP).

40 En una posible configuración, el neuropéptido se une a través de su grupo carboxilo a uno de los grupos amino del PEG bis-amino terminado, quedando el grupo amino del péptido libre para interaccionar con receptores específicos.

45 En otra posible configuración, las nanopartículas están conjugadas con un diácido a través de uno de los grupos amino del PEG bis-amino terminado, estando dicho diácido a su vez enlazado a través de uno de los grupos ácido con el grupo amino del neuropéptido, quedando expuesto el grupo carboxilo del neuropéptido para interaccionar con receptores específicos.

50 En una de las realizaciones preferidas de las nanopartículas objeto de la presente invención, el material metálico del núcleo es plata y el mercapto-derivado es tiopronina, encontrándose la tiopronina y la plata en proporción 3:1 en las nanopartículas.

55 En una realización preferida de la configuración que deja expuesto el grupo carboxilo del neuropéptido, el diácido es ácido succínico.

Las nanopartículas metálicas funcionalizadas objeto de la invención presentan geometría esférica y tienen un diámetro medio de 5 nm.

60 Constituye igualmente un objeto de la presente invención un procedimiento de preparación de nanopartículas funcionalizadas con un neuropéptido que incluye las siguientes etapas:

a) formación de nanopartículas con un núcleo de material metálico unido a un mercaptoderivado, mediante adición de una disolución del mercapto-derivado a una disolución acuosa de una sal del material metálico, posterior reducción con un agente reductor, particularmente borohidruro de sodio, precipitación de las nanopartículas formadas mediante adición de metanol y recogida por centrifugación, terminando esta etapa con un lavado de las nanopartículas precipitadas y separadas con etanol, metanol y acetona.

ES 2 331 781 A1

b) dialización frente a agua de las nanopartículas separadas en la etapa anterior, así como eliminación del disolvente utilizado para el lavado hasta conseguir una concentración inferior a $2 \cdot 10^{-7}$ moles/ml y disolución en ácido 2-morfolinoetanosulfónico (MES) 50 mM.

5 c) conjugación de las nanopartículas núcleo metálico/mercaptoderivado preparadas y dializadas en las etapas anteriores con polietilenglicol bis-amino terminado, mediante adición inicial de EDC [N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida] 0,1 mM y NHS [N-hidroxisuccinimida] 0,25 mM y ulterior adición de PEG bis-amino terminado, manteniendo agitación durante 24 h.

10 d) dialización en agua de la disolución de nanopartículas núcleo metálico/mercaptoderivado/PEG bis-amino terminado de la etapa anterior y eliminación del disolvente hasta conseguir una concentración inferior a $2 \cdot 10^{-7}$ moles/ml y disolución en MES 50 mM.

El procedimiento incluye adicionalmente las siguientes etapas:

15 e) funcionalización de las nanopartículas núcleo metálico/mercaptoderivado/PEG bis-amino terminado obtenidas en las etapas anteriores con un neuropéptido, mediante adición de EDC 0,1 mM y NHS 0,25 mM y ulterior adición del neuropéptido manteniendo en agitación durante 24 h.

20 f) purificación de las nanopartículas funcionalizadas núcleo metálico/mercaptoderivado/PEG bis-amino terminado/neuropéptido mediante diálisis frente a agua desionizada durante 24 horas.

25 Las nanopartículas obtenidas mediante este procedimiento dejarían disponible el grupo amino del péptido funcionalizado para interactuar con las membranas celulares.

Para conseguir la recepción celular específica buscada, la proteína unida a la nanopartícula debe tener disponible su grupo ácido. Para conseguir ésta orientación, se amplía el procedimiento de preparación, incorporando un nuevo ligando de unión entre el PEG y la proteína.

30 Se ha elegido un diácido como intermediario entre el polietilenglicol (bis-aminoterminado) y el VIP. El diácido, particularmente el succínico, emplea uno de sus carboxilos para enlazar con el amino del PEG procedente de la etapa anterior, dejando el otro grupo ácido disponible para su siguiente funcionalización. En este nuevo procedimiento se obtiene, gracias a la incorporación del diácido tras el polietilenglicol, una nanopartícula estabilizada, funcionalizada, de forma que posee un grupo ácido disponible donde posteriormente se unirá el grupo amino de una proteína, y así poder participar en las funciones de reconocimiento celular.

40 En este caso, el procedimiento de preparación incluye las siguientes etapas:

a) Formación de nanopartículas con un núcleo de material metálico unido a un mercaptoderivado, mediante adición de una disolución del mercaptoderivado a una disolución acuosa de una sal del material metálico, posterior reducción con un agente reductor, particularmente borohidruro de sodio, precipitación de las nanopartículas formadas mediante adición de metanol y recogida por centrifugación, terminando esta etapa con un lavado de las nanopartículas precipitadas y separadas con etanol, metanol y acetona.

45 b) Dialización frente a agua de las nanopartículas separadas en la etapa anterior, así como eliminación del disolvente utilizado para el lavado hasta conseguir una concentración inferior a $2 \cdot 10^{-7}$ moles/ml y disolución en ácido 2-morfolinoetanosulfónico (MES) 50 mM.

50 c) Conjugación de las nanopartículas núcleo metálico/mercaptoderivado preparadas y dializadas en las etapas anteriores con polietilenglicol bis-amino terminado, mediante adición inicial de EDC [N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida] 0,1 mM y NHS [N-hidroxisuccinimida] 0,25 mM y ulterior adición de PEG bis-amino terminado, manteniendo agitación durante 24 h.

55 d) Dialización en agua de la disolución de nanopartículas núcleo metálico/mercaptoderivado/PEG bis-amino terminado de la etapa anterior y eliminación del disolvente hasta conseguir una concentración inferior a $2 \cdot 10^{-7}$ moles/ml y disolución en MES 50 mM.

60 y adicionalmente:

e) Conjugación de las nanopartículas núcleo metálico/mercaptoderivado/PEG bis-amino terminado precedentes de las etapas anteriores con un diácido mediante adición de EDC y NHS en cantidades equimolares y ulterior adición del diácido, manteniendo en agitación durante 24 horas.

65 f) Purificación de las nanopartículas núcleo metálico/mercaptoderivado/PEG bis-amino terminado/diácido mediante dialización frente a agua desionizada y disolución de las mismas en MES.

- g) Funcionalización de las nanopartículas procedentes de la etapa anterior con un neuropéptido mediante adición inicial de EDC y NHS manteniendo en agitación durante 30 min y ulterior adición del neuropéptido manteniendo la reacción durante 24 h.
- 5 h) Purificación de las nanopartículas núcleo metálico/mercaptoderivado/PEG bis-amino terminado/diácido/neuropéptido mediante diálisis frente a agua desionizada.

En una forma de realización preferente, el material metálico del núcleo de las nanopartículas es plata, el mercaptoderivado es tiopronina y el neuropéptido es el péptido intestinal vasoactivo. Preferentemente, en el procedimiento para preparar las nanopartículas cuya configuración deja libre el grupo carboxilo, el diácido utilizado es ácido succínico.

Breve descripción de las figuras

15 Figura 1: Esquema de funcionalización de nanopartículas metálicas desde la tiopronina al VIP.

Figura 2: Estructura del VIP. Péptido Intestinal Vasoactivo.

Figura 3: Imágenes tomadas con microscopía óptica de la línea celular macrofágica Raw 264.7. Izquierda: imagen de control. Derecha: células incubadas con nanopartículas Ag/tiopronina.

20 Figura 4: Imagen TEM de las nanopartículas Ag/tiopronina.

Figura 5: Esquema de una molécula de tiopronina adsorbida en una nanopartícula de Ag (no está a escala) numerada para la interpretación del espectro RMN.

25 Figura 6: Espectro a 500 MHz de Ag-tiopronina en D₂O a 298 K. De arriba a abajo: Espectro ID TOCSY (3.9 ppm), espectro ID TOCSY (4.2 ppm), y espectro ¹H.

Figura 7: Espectro a 500 MHz 2D HMBC de Ag-tiopronina en D₂O a 298 K.

30 Figura 8. Espectro de absorción UV-Vis de nanopartículas de Ag/tiopronina, Ag/tiopronina/PEG, Ag/tiopronina/PEG/VIP, Ag/tiopronina/PEG/ácido succínico y Ag/tiopronina/PEG/ácido succínico/VIP en disolución acuosa.

Figura 9: Espectro FTIR de nanopartículas de Ag/tiopronina, Ag/tiopronina/PEG y Ag/tiopronina/PEG/succinico en KBr. Izquierda: Región del espectro entre 2500-3500 cm⁻¹. Derecha: región entre 1000-2000 cm⁻¹.

Descripción detallada de la invención

40 Constituye un objeto de la presente invención la preparación de nanopartículas metálicas estables, solubles en agua, protegidas con polímeros biocompatibles y funcionalizadas con péptidos. Se aportan datos que permiten caracterizar dichas nanopartículas. Los péptidos son neuropéptidos y específicamente el péptido intestinal vasoactivo (VIP), cuya estructura se muestra en la figura 2.

45 Con el VIP se obtiene un amplio espectro de funciones biológicas, incluida inmunomodulación, actuando predominantemente como un potente anti inflamatorio y un agente inhibidor de la respuesta del Th1 en el sistema inmunitario. Por lo tanto, el VIP emerge como un importante factor terapéutico para el tratamiento de enfermedades con componentes inflamatorias y autoinmunes [Grimm, M. C. *et al.* (2003) *J. Immunol.* 171, 4990-4994; Pozo, D. (2003) *Trends Mol. Med.* 9, 211-217; M; Ganea, D., and Delgado, M. (2002). *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 13, 229-237; Delgado, M. *et al.* (2003). *Trends Immunol.* 24, 221-224; D. Pozo, M. Delgado. *FASEB Journal.* (2004); 18: 1325].

Preparación de nanopartículas Ag/tiopronina

55 Para la síntesis de nanopartículas de plata se ha seguido el método publicado por Hyang and Murray [T. Huang, R. W. Murray. *J. Phys. Chem. B.* (2003); 107: 7434.], en el cual los iones de plata en disolución acuosa procedentes de la disolución AgNO₃ y tiopronina N-(2-mercaptopropionil) glicina, son reducidos con borohidruro sódico. Para una relación tiopronina:plata 3:1, se adiciona la disolución de tiopronina sobre la plata, reduciendo inmediatamente con NaBH₄. De la disolución negra resultante se precipitarán las nanopartículas Ag-Tiopronina con la adición de metanol. Las partículas se recogen por centrifugación, lavadas sucesivas veces con etanol, metanol y acetona, dializadas frente a agua y finalmente se elimina su disolvente a presión reducida para asegurar la concentración en cada una de las etapas de funcionalización.

65 A pesar de los estudios que existen sobre la reducción de amidas a aminas por la acción del NaBH₄ en la presencia de metales de transición [Y. Suzuki Y. Miyaji, Z. Imai. *Tetrahedron Letters.* (1969); 52: 4555], los resultados obtenidos demuestran que la molécula de tiopronina no se ve afectada por el NaBH₄, sino que se produce un cambio químico en el que la molécula de tiopronina sufre la pérdida del H de su grupo tiol mediante su adsorción en la superficie de la partícula metálica.

Preparación de nanopartículas Ag/tiopronina/PEG

De la Fuente *et al* [J. M. de la Fuente, C. C. Berry, M. O. Riehle, A. S. G. Curtis. Langmuir. (2006); 22: 3286]. han funcionalizado nanopartículas metálicas de oro con PEG. demostrando que el uso del polietilenglicol tras la nanopartícula estabilizada, disminuye las interacciones inespecíficas de las mismas sobre la superficie celular.

Para la conjugación de las nanopartículas de Ag/tiopronina con polietilen-glicol se siguió un método paralelo al propuesto por de la Fuente *et al* [J. M. de la Fuente, C. C. Berry, M. O. Riehle, A. S. G. Curtis. Langmuir. (2006); 22: 3286] adaptado para nanopartículas de plata.

El producto anterior (Ag/tiopronina) dializado y rotado se disuelve en una disolución de MES (ácido 2-morfolinoetanosulfónico) 50 mM. Se añade EDC(N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida) (0.1 mmol) y NHS N-hidroxisuccinimida (0.25 mmol). Se deja reaccionar brevemente, se añade el PEG (Polietilenglicol bis-aminoterminado) manteniendo la agitación durante 24 horas. La disolución resultante Ag/tiopronina/PEG se dializa en agua y finalmente, se elimina su disolvente para asegurar la concentración en la siguiente etapa. Este procedimiento conduce a la primera orientación, dónde el grupo amino del PEG está expuesto a la disolución y disponible para su unión con el grupo ácido de un péptido.

Preparación de nanopartículas Ag/tiopronina/PEG funcionalizadas con VIP

Se han descrito [J. M. de la Fuente, C. C. Berry, M. O. Riehle, A. S. G. Curtis. Langmuir. (2006); 22: 3286]. nanopartículas de oro protegidas con tiopronina y estabilizadas con PEG. Posteriormente, se hizo reaccionar tras el PEG, la secuencia de péptidos GRGDSP. Las nanopartículas así obtenidas son estables, solubles en condiciones fisiológicas y exhiben baja toxicidad. Se demuestra que las nanopartículas de oro protegidas con tiopronina inducen o endocitosis o adhesión a la membrana celular dependiendo de la composición química de la superficie de la partícula.

En la presente invención, el péptido empleado ha sido el VIP. Con el VIP se obtiene un amplio espectro de funciones biológicas, incluida inmunomodulación, actuando predominantemente como un potente anti inflamatorio y un agente inhibidor de la respuesta del Th1 en el sistema inmunitario. Para preparar las nanopartículas funcionalizadas con VIP, se disuelven en MES las nanopartículas Ag/tiopronina/PEG en análogas proporciones, posteriormente se añaden EDC y NHS en la misma relación que en el apartado anterior para preparar las Ag/tiopronina/PEG. Finalmente se adiciona el VIP en relación al PEG añadido. Se permite la reacción durante 24 horas. Para su purificación final se dializa frente a agua miliQ durante 24. Este procedimiento conduce a la primera orientación, dónde el grupo amino del VIP está expuesto a la disolución.

Preparación de nanopartículas Ag/tiopronina/PEG/succínico

Para diseñar nanopartículas que sean capaces de reaccionar con péptidos a través de su grupo amino se emplea un diácido, preferentemente el ácido succínico, como intermediario entre el PEG y el VIP.

Se toman cantidades equivalentes del producto anterior Ag/tiopronina/PEG dializado y rotado y se disuelven en MES (ácido 2-morfolinoetanosulfónico) 50 mM. Posteriormente y sin esperar, se añaden EDC(N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida) y NHS N-hidroxisuccinimida en cantidades equimolares. Finalmente se añade el ácido succínico en función de la funcionalización con PEG conseguida en la etapa anterior y se permite la reacción con agitación suave durante 24 horas. Se dializa frente a agua miliQ hasta su total purificación. Se obtienen así nanopartículas con grupos ácidos disponibles para funcionalizar con proteínas.

Preparación de nanopartículas Ag/tiopronina/PEG/succínico/VIP

El diácido (particularmente el succínico) dejó disponible en la etapa anterior su otro grupo ácido por donde reaccionará el VIP: El VIP así funcionalizado mantiene libre su resto ácido que es el grupo que realmente interviene en las funciones de reconocimiento celular, en concreto el VIP ejerce importantes beneficios activando funciones del sistema inmune.

Para funcionalizar nanopartículas Ag/PEG/Succínico con VIP, se disuelven en MES las nanopartículas Ag/tiopronina/PEG/succínico, posteriormente se añaden EDC y de NHS en las proporciones anteriormente empleadas y se deja en agitación suave durante 30 minutos.

Se añade el VIP correspondiente a la cantidad de succínico añadida, disueltos en agua miliQ y se permite la reacción durante 24 horas. Para su purificación final se dializa frente a agua miliQ para conseguir alta pureza en el producto. En esta segunda orientación propuesta, se consigue dejar libre el extremo ácido del péptido que es el grupo funcional que realmente interviene en las funciones de reconocimiento celular.

En la figura 1 se esquematiza todo el procedimiento de funcionalización de nanopartículas metálicas desde la tiopronina al VIP.

En la figura 8 se muestran las variaciones en el plasmón superficial en todas las etapas de las nanopartículas tras su funcionalización. Los espectros IR (FTIR) de las nanopartículas descritas, preparadas en KBr se muestran en la Fig. 9.

Modo de realización de la invención*Nanopartículas 3:1:Ag/tiopronina*

5 Tal y como se ha explicado en la descripción detallada, para la preparación de nanopartículas de plata se ha seguido el método publicado por Hyang and Murray [T. Huang, R. W. Murray, J. Phys. Chem. B. 2003; 107: 7434.] siguiendo la proporción 3:1, en el cual los iones de plata en disolución acuosa procedentes de la disolución AgNO₃ y tiopronina, son reducidos con borohidruro sódico.

10 El análisis de las nanopartículas de Ag/tiopronina proporciona los datos necesarios para calcular su recubrimiento durante la funcionalización en las etapas posteriores.

15 Las nanopartículas son esféricas y tienen un diámetro medio de 5 nm, determinado por TEM (Transmission Electron Microscopy). Las imágenes se tomaron con el microscopio de alta resolución Philips CM200. Las muestras se prepararon secando las nanopartículas sobre una gradilla de cobre (ver Fig. 4).

20 Los desplazamientos químicos correspondientes al espectro de ¹H-RMN de las nanopartículas de Ag/tiopronina, se muestran en la tabla 1 y en la figura 7. El espectro RMN se realizó a 500 MHz con un espectrómetro Bruker AMX-500 en D₂O. El estándar HMBC se optimizó a J_{H,C}=8 Hz. El número asignado a cada protón en la molécula se muestra en la figura 5, y los desplazamientos químicos se muestran en la tabla 1. También se comparan las asignaciones de las bandas con las aportadas por Kohlmann *et al.* J. Phys. Chem. B. 2001; 105: 8801.

25 En la figura 6 se muestran dos espectros 1D TOCSY. Los experimentos TOCSY se realizaron con la secuencia DPFGE, a pulsos selectivos de 50 ms (Gaussian), con un tiempo de mezcla de 120 ms. En la figura 9 se muestra la correlación entre los grupos metil y carbonilamida (177.6 ppm) con una correlación de 3 enlaces, así como la correlación a 2 enlaces que existe entre los protones del metileno y los del grupo carbonilamida a 178 ppm.

30 El espectro UVA-VIS de las nanopartículas de Ag/tiopronina en disolución acuosa muestra claramente una banda con un máximo a λ≈380 nm que pertenece a la absorción característica del plasmón superficial de las nanopartículas de plata. (ver Fig. 8) y cuyas variaciones demostrarán la funcionalización de las nanopartículas. - Los espectros UV-Vis fueron recogidos con un espectrómetro Ocean optics equipado con un detector HR4000.

Nanopartículas 3:1 funcionalizadas con PEG: Ag/tiopronina/PEG

35 El producto anterior dializado y rotado se disuelve en una disolución de MES (ácido morfolino etano sulfónico) 50 mM. A la muestra disuelta se le añaden EDC N-(3-dimetil-aminopropil)-N'-etilcarboimida hidroclorehidrico) (0.1 mmol) y NHS N-Hidroxisuccinimida (0.25 mmol). Se deja reaccionar con agitación suave durante 30 min y se añade el PEG en proporción a la tiopronina reaccionada. Se deja agitando 24 horas, se dializa en agua Ag/tiopronina/PEG y se elimina el disolvente para asegurar la concentración en la siguiente etapa.

Nanopartículas 3:1 PEG funcionalizadas con VIP:Ag/tiopronina/PEG/VIP

40 A las nanopartículas de Ag/tiopronina/PEG disueltas en MES, se les añaden las cantidades de EDC y NHS que se muestran en las relaciones anteriores. Se adiciona el VIP correspondiente en relación al PEG reaccionado y disuelto en agua miliQ. Se permite la reacción durante 24 horas con suave agitación. Para su purificación final se dializa frente a agua miliQ durante 24 horas.

45 Este procedimiento conduce a la primera orientación, dónde el grupo amino del PEG está expuesto a la disolución y disponible para su unión con el grupo ácido de un péptido.

Nanopartículas 3:1 PEG funcionalizadas con ácido succínico: Ag/tiopronina/PEG/Succínico

50 Para diseñar nanopartículas que sean capaces de reaccionar con péptidos a través de su grupo amino y así dejar el extremo ácido del péptido libre en disolución, se ha empleado un diácido, el ácido succínico, como intermediario entre el PEG y del VIP. A nanopartículas de Ag/tiopronina/PEG disueltas en MES, se adicionan cantidades equimolares de EDC, NHS según los procedimientos anteriores. Se añade el succínico necesario según el PEG funcionalizado. Se permite la reacción con agitación suave durante 24 horas. Se dializa frente a agua miliQ durante 48 horas, renovando el agua cada 10 horas.

Nanopartículas 3:1 PEG ácido succínico funcionalizadas con VIP: Ag/tiopronina/PEG/Succínico/VIP

60 Para funcionalizar el VIP a nanopartículas Ag/PEG/Succínico, se disolverán previamente en MES y se activarán con EDC y NHS las cantidades necesarias de nanopartícula respecto a la funcionalización conseguida en las etapas anteriores. Se deja reaccionar brevemente previo a la adición del VIP y se permite la reacción durante 24 horas. Para su purificación final se dializa frente a agua miliQ durante 24 horas, renovando el agua cada 10 horas. Así se ha conseguido dejar libre el extremo ácido del péptido que es grupo funcional que realmente interviene en las funciones de reconocimiento celular.

ES 2 331 781 A1

TABLA 1

*Asignación de Desplazamientos Químicos (500 MHz) para el espectro ¹H-NMR obtenidos y comparados con Kohlmann *et al.* J. Phys. Chem. B. 2001; 105: 8801*

núcleo	grupo	Tiopronina δ(ppm)	Au/tiopronina δ(ppm)	Nuestros datos Ag/tiopronina δ(ppm)
H1	metil	1.48	1.6	1.8
H2	metino	3.65	4.3	4.2
H4	amida	8.39	8.3	-
H5	metileno	4.01	4.0	3.9-3.7

REIVINDICACIONES

- 5 1. Nanopartículas metálicas funcionalizadas compuestas por un núcleo metálico unido un mercaptoderivado, el cual a su vez se une a través de al menos uno de sus grupos ácidos a un polímero derivado del polietilenglicol (PEG) bis-amino terminado, **caracterizadas** porque las nanopartículas están funcionalizadas con un neuropéptido.
- 10 2. Nanopartículas metálicas funcionalizadas según la reivindicación 1, **caracterizadas** porque el neuropéptido es el péptido intestinal vasoactivo (VIP).
- 15 3. Nanopartículas metálicas funcionalizadas según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizadas** porque el neuropéptido se une a través de su grupo carboxilo a uno de los grupos amino del PEG bis-amino terminado, quedando el grupo amino del péptido libre para interactuar con receptores específicos.
- 20 4. Nanopartículas metálicas funcionalizadas según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizadas** porque las nanopartículas están conjugadas con un diácido a través de uno de los grupos amino del PEG bis-amino terminado, estando dicho diácido a su vez enlazado a través de uno de los grupos ácido con el grupo amino del neuropéptido, quedando expuesto el grupo carboxilo del neuropéptido para interactuar con receptores específicos.
- 25 5. Nanopartículas metálicas funcionalizadas según las reivindicaciones 1-4, **caracterizadas** porque el material metálico del núcleo es plata.
- 30 6. Nanopartículas metálicas funcionalizadas según las reivindicaciones 1-5, **caracterizadas** porque el mercaptoderivado es tiopronina.
- 35 7. Nanopartículas metálicas funcionalizadas según las reivindicaciones 5 y 6, **caracterizadas** porque la tiopronina y la plata se encuentran en proporción 3:1 en la nanopartícula.
- 40 8. Nanopartículas metálicas funcionalizadas según las reivindicaciones 4-7, **caracterizadas** porque el diácido es ácido succínico.
- 45 9. Nanopartículas metálicas funcionalizadas según las reivindicaciones 1-8, **caracterizadas** porque presentan geometría esférica y tienen un diámetro medio de 5 nm.
- 50 10. Procedimiento de preparación de nanopartículas funcionalizadas con un neuropéptido de acuerdo a las reivindicaciones 1-3 que incluye las siguientes etapas:
- 55 a) formación de nanopartículas con un núcleo de material metálico unido a un mercaptoderivado, mediante adición de una disolución del mercaptoderivado a una disolución acuosa de una sal del material metálico, posterior reducción con un agente reductor, particularmente borohidruro de sodio, precipitación de las nanopartículas formadas mediante adición de metanol y recogida por centrifugación, terminando esta etapa con un lavado de las nanopartículas precipitadas y separadas con etanol, metanol y acetona;
- 60 b) dialización frente a agua de las nanopartículas separadas en la etapa anterior, así como eliminación del disolvente utilizado para el lavado hasta conseguir una concentración inferior a $2 \cdot 10^{-7}$ moles/ml y disolución en ácido 2-morfolinoetanosulfónico (MES) 50 mM;
- 65 c) conjugación de las nanopartículas núcleo metálico/mercaptoderivado preparadas y dializadas en las etapas anteriores con polietilenglicol bis-amino terminado, mediante adición inicial de EDC [N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida] 0,1 mM y NHS [N-hidroxisuccinimida] 0,25 mM y ulterior adición de PEG bis-amino terminado, manteniendo agitación durante 24 horas; y
- 70 d) dialización en agua de la disolución de nanopartículas núcleo metálico/mercaptoderivado/PEG bis-amino terminado de la etapa anterior y eliminación del disolvente hasta conseguir una concentración inferior a $2 \cdot 10^{-7}$ moles/ml y disolución en MES 50 mM, estando el procedimiento **caracterizado** porque incluye adicionalmente las siguientes etapas:
- 75 e) funcionalización de las nanopartículas núcleo metálico/mercaptoderivado/PEG bis-amino terminado obtenidas en las etapas anteriores con un neuropéptido, mediante adición de EDC 0,1 mM y NHS 0,25 mM y ulterior adición del neuropéptido manteniendo en agitación durante 24 h
- 80 f) purificación de las nanopartículas funcionalizadas núcleo metálico/mercaptoderivado/PEG bis-amino terminado/neuropéptido mediante diálisis frente a agua desionizada durante 24 horas.

ES 2 331 781 A1

11. Procedimiento de preparación de nanopartículas funcionalizadas con un neuropéptido de acuerdo a las reivindicaciones 1, 2 y 4 que incluye las siguientes etapas:

- 5 a) formación de nanopartículas con un núcleo de material metálico unido a un mercaptoderivado, mediante adición de una disolución del mercaptoderivado a una disolución acuosa de una sal del material metálico, posterior reducción con un agente reductor, particularmente borohidruro de sodio, precipitación de las nanopartículas formadas mediante adición de metanol y recogida por centrifugación, terminando esta etapa con un lavado de las nanopartículas precipitadas y separadas con etanol, metanol y acetona;
- 10 b) dialización frente a agua de las nanopartículas separadas en la etapa anterior, así como eliminación del disolvente utilizado para el lavado hasta conseguir una concentración inferior a $2 \cdot 10^{-7}$ moles/ml y disolución en ácido 2-morfolinoetanosulfónico (MES) 50 mM;
- 15 c) conjugación de las nanopartículas núcleo metálico/mercaptoderivado preparadas y dializadas en las etapas anteriores con polietilenglicol bis-amino terminado, mediante adición inicial de EDC [N-(3-dimetilamino-propil)-N'-etilcarbodiimida] 0,1 mM y NHS [N-hidroxisuccinimida] 0,25 mM y ulterior adición de PEG bis-amino terminado, manteniendo agitación durante 24 h;
- 20 d) dialización en agua de la disolución de nanopartículas núcleo metálico/mercaptoderivado/PEG bis-amino terminado de la etapa anterior y eliminación del disolvente hasta conseguir una concentración inferior a $2 \cdot 10^{-7}$ moles/ml. y disolución en MES 50 mM; estando el procedimiento **caracterizado** porque incluye adicionalmente las siguientes etapas:
 - 25 e) conjugación de las nanopartículas núcleo metálico/mercaptoderivado/PEG bis-amino terminado precedentes de las etapas anteriores con un diácido mediante inicial de EDC y NHS en cantidades equimolares y ulterior adición del diácido, manteniendo en agitación durante 24 horas;
 - 30 f) purificación de las nanopartículas núcleo metálico/mercaptoderivado/PEG bis-amino terminado/diácido mediante dialización frente a agua desionizada y disolución de las mismas en MES;
 - 35 g) funcionalización de las nanopartículas procedentes de la etapa anterior con un neuropéptido mediante adición inicial de EDC y NHS manteniendo en agitación durante 30 min y ulterior adición del neuropéptido manteniendo la reacción durante 24 horas; y
 - h) purificación de las nanopartículas núcleo metálico/mercaptoderivado/PEG bis-amino terminado/diácido/neuropéptido mediante diálisis frente a agua desionizada.

12. Procedimiento de preparación de nanopartículas funcionalizadas con un neuropéptido según las reivindicaciones 9 y 10, **caracterizado** porque el material metálico del núcleo es plata.

13. Procedimiento de preparación de nanopartículas funcionalizadas con un neuropéptido según las reivindicaciones 9-11, **caracterizado** porque el mercaptoderivado es tiopronina.

14. Procedimiento de preparación de nanopartículas funcionalizadas con un neuropéptido según las reivindicaciones 9-12, **caracterizado** porque el neuropéptido es el péptido intestinal vasoactivo.

15. Procedimiento de preparación de nanopartículas funcionalizadas con un neuropéptido según las reivindicaciones 10-14, **caracterizado** porque el diácido utilizado es ácido succínico.

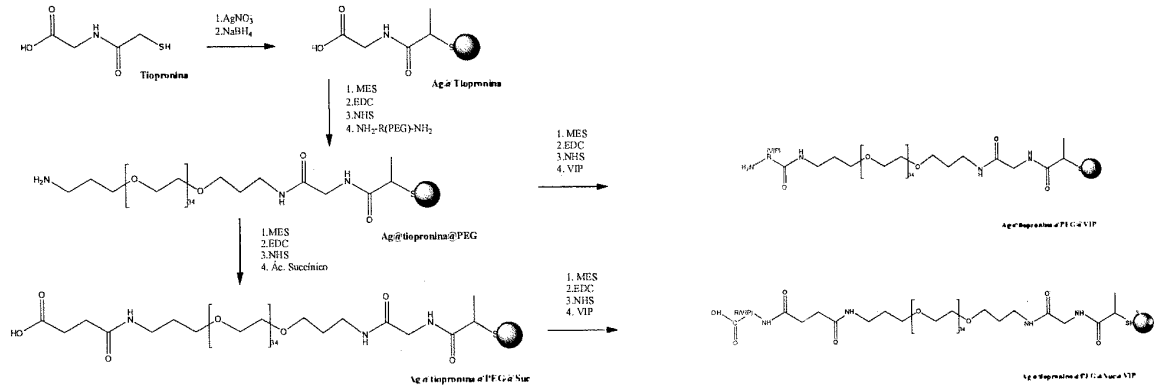


Figura 1

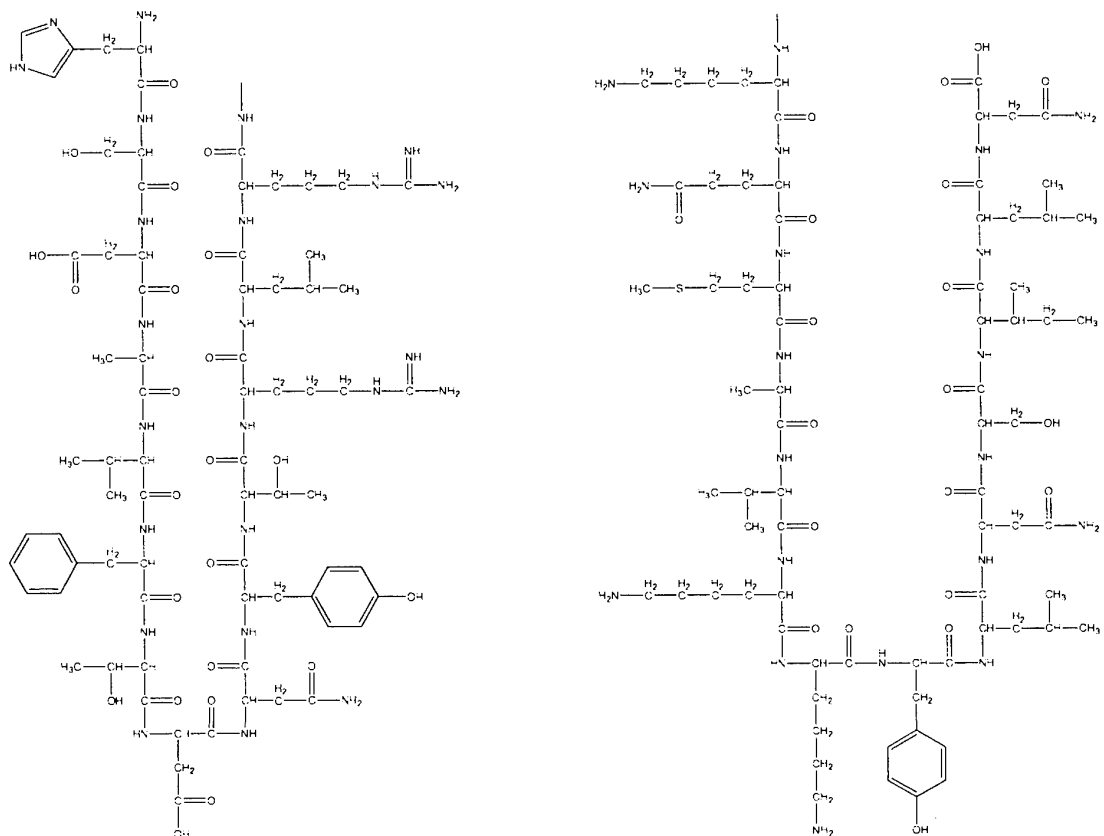


Figura 2

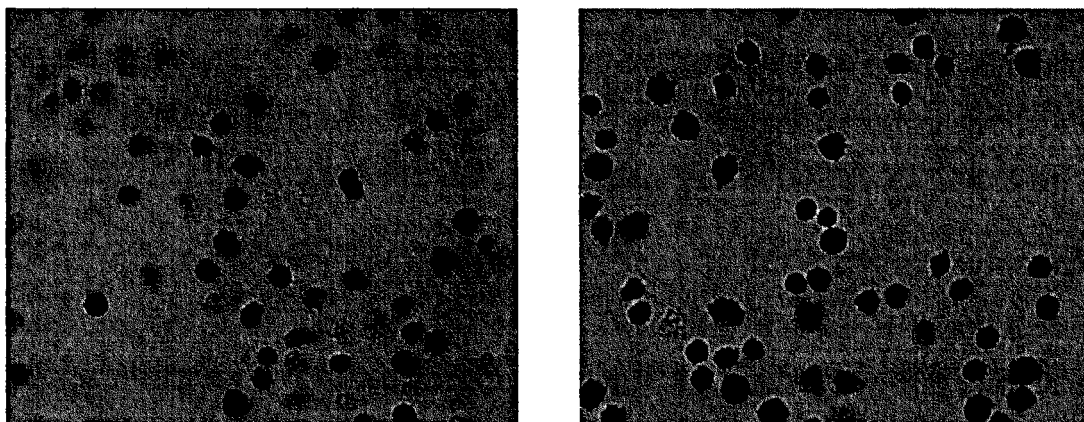


Figura 3

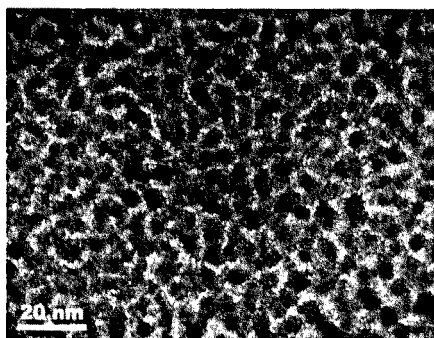


Figura 4.

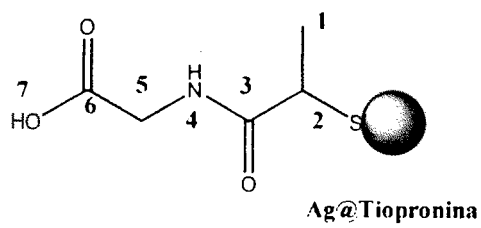


Figura 5

ES 2 331 781 A1

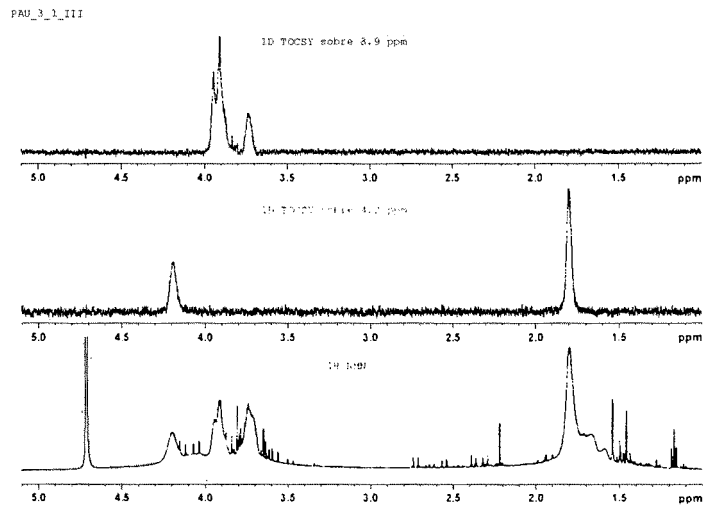


Figura 6

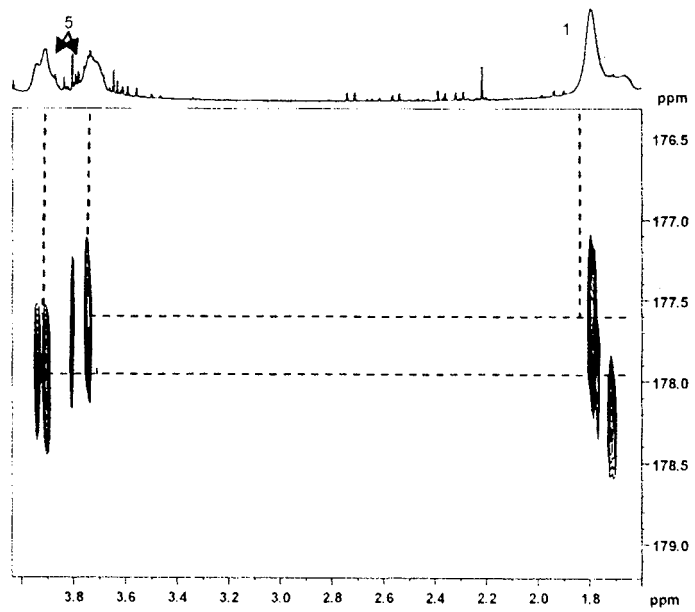
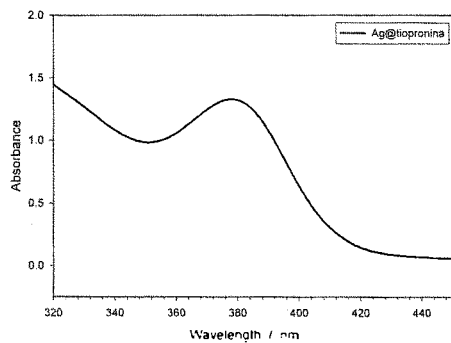
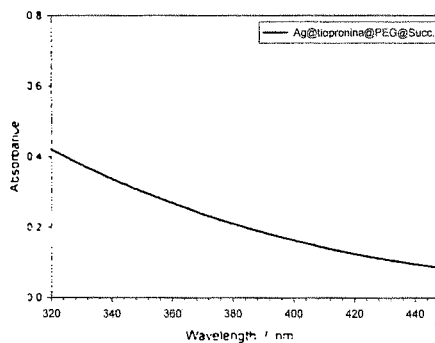


Figura 7

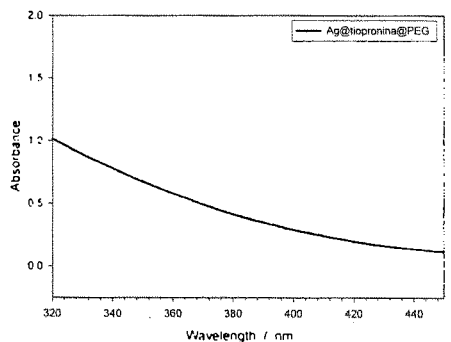
Ag/tiopronina



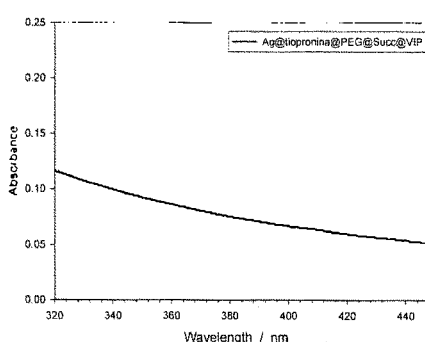
Ag/tiopronina/PEG/Succ.



Ag/tiopronina/PEG



Ag/tiopronina/PEG/Succ/VIP



Ag/tiopronina/PEG/VIP

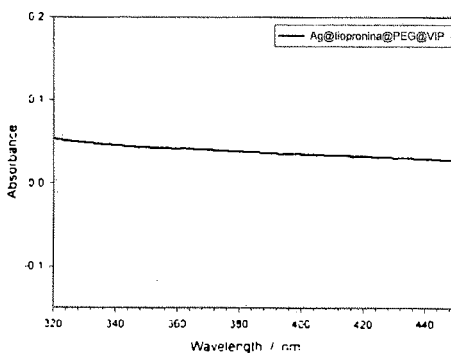


Figura 8

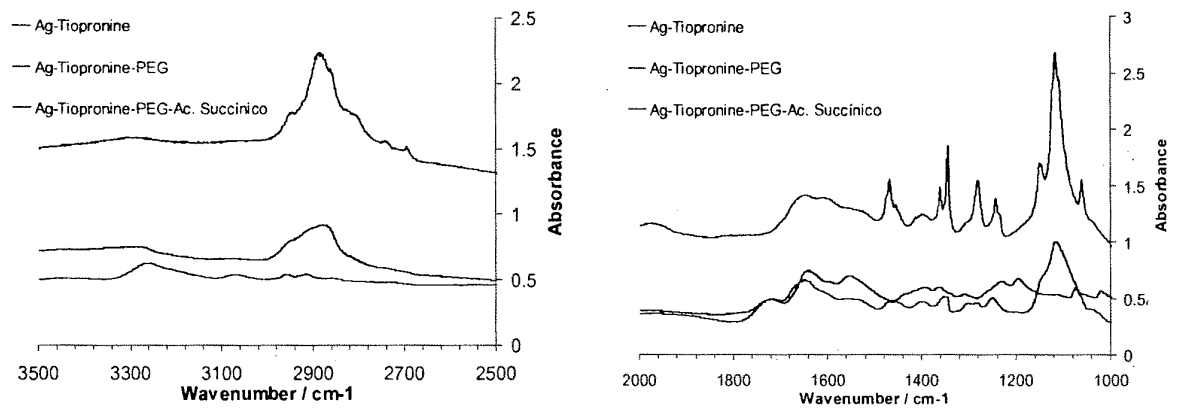


Figura 9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 331 781

② Nº de solicitud: 200800451

③ Fecha de presentación de la solicitud: 31.01.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	FUENTE, J.M. et al. "Nanoparticle Targeting at Cells". Langmuir 2006, volumen 22, páginas 3286-3293. Ver página 3293, columna 1, párrafo 2; página 3293, columna 2, párrafo 1; página 3287, columna 1, párrafo 5; columna 2, párrafo 7; página 3288, columna 1, párrafo 2; esquema 1.	1,3,5-7,9, 10,12
Y		4,8,11, 13-15
Y	WO 2006025627 A1 (YONSEY UNIVERSITY) 09.03.2006, figura 3; página 10, líneas 7-14; página 11, líneas 9-21.	4,8,11, 13-15
A	HUANG, T. & MURRAY, R.W. "Luminiscence of Tiopronin Monolayer Protected Silver Clusters Changes To That of Gold Clusters upon Galvanic Core Metal Exchange". The Journal Of Physical Chemistry B, 2003, volumen 107, páginas 7434-7440. Ver página 7434, columna 2, párrafo 3; página 7435, columna 1, párrafo 3.	5,7,9,12

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

21.12.2009

Examinador

N. Martín Laso

Página

1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

B82B 1/00 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

C07K 14/575 (2006.01)

G01N 33/483 (2006.01)

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

B82B, A61K, C07K, G01N

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, XPESP, NPL, CAS.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.12.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-15	SÍ
	Reivindicaciones		NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	2	SÍ
	Reivindicaciones	1,3-15	NO

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

Base de la Opinión:

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

1. Documentos considerados:

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Langmuir, 2006, volumen 22, páginas 3286-3293.	07/03/2006
D02	WO2006/025627 A1	09/03/2006
D03	The Journal Of Physical Chemistry B, 2003, Volumen 107, páginas 7434-7440.	20/05/2003

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

La solicitud se refiere a nanopartículas metálicas compuestas por un núcleo metálico unido a un mercaptoderivado, que enlaza a su vez a un polímero derivado del polietilenglicol bisaminoterminado, estando dichas nanopartículas funcionalizadas con un neuropéptido. Se refiere igualmente a nanopartículas que incluyen además un diácido así como a sus métodos de preparación.

El documento D01 divulga nanopartículas compuestas por oro unido a tiopronina, polietilenglicol bisaminoterminado y funcionalizadas con el péptido GRGDSP. Dichas nanopartículas resultan estables en condiciones fisiológicas, presentan baja toxicidad y muestran gran afinidad por los receptores de la superficie celular (página 3293, columna 1, párrafo 2; columna 2, párrafo 1). Las nanopartículas de Au-tiopronina-PEG-RGD se preparan según las siguientes etapas: disolución del trihidrato de tetracloroaurato y tiopronina en metanol-ácido acético, reacción con borohidruro sódico y purificación de las nanopartículas de Au-tiopronina obtenidas por diálisis; reacción de las nanopartículas anteriores disueltas en MES (ácido 2-morfolinoetanosulfónico) con EDC [N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida], NHS (N-hidroxisuccinimida) y polietilenglicol bis-aminopropil terminado, dialización y eliminación de disolventes; reacción de las nanopartículas Au-tiopronin-PEG disueltas en MES con EDC, NHS y a continuación con el péptido GRGDSP; purificación de las nanopartículas de AU-tiopronina-PEG-RGD por diálisis (página 3287, columna 1, párrafo 5; columna 2, párrafo 7; página 3288, columna 1, párrafo 2, esquema 1).

La diferencia entre el documento D01 y el objeto de la invención definido en las reivindicaciones 1, 3, 6 y 10 de la solicitud radica en la funcionalización de la nanopartícula con neuropéptidos. Dado que dichos péptidos son estructuralmente semejantes al divulgado en D01 (los neuropéptidos son péptidos compuestos por cadenas cortas de aminoácidos) y que el grupo funcional reactivo en dichos péptidos es el mismo que el del péptido GRGDSP divulgado en D01 (grupo amino o carboxilo), se considera que un experto en la materia podría llevar a cabo la funcionalización de nanopartículas como las divulgadas en D01 con un neuropéptido con una razonable expectativa de éxito, dando como resultado la invención recogida en las reivindicaciones 1, 3, 6 y 10 de la solicitud.

Por lo tanto, aunque se puede reconocer novedad, el objeto de la invención definido en las reivindicaciones 1, 3, 6 y 10 de la solicitud carece de actividad inventiva a la luz de lo divulgado en D01 (Art. 8.1 LP11/1986).

En relación a las reivindicaciones 4, 8, 11 y 13-15 de la solicitud, la diferencia que existe entre la invención recogida en dichas reivindicaciones y el documento D01 radica en la incorporación en la nanopartícula de un diácido (ácido succínico).

El problema técnico planteado en la solicitud es la preparación de nanopartículas que sean capaces de reaccionar con péptidos a través del grupo amino del péptido y así dejar el extremo ácido del péptido libre para interactuar con receptores específicos. Esto se consigue en la solicitud mediante la incorporación de ácido succínico en la nanopartícula, al reaccionar un extremo carboxilo del ácido succínico con el derivado del PEG de la nanopartícula y el otro extremo carboxilo del ácido succínico con el grupo amino del péptido, quedando así el grupo ácido del péptido libre.

Este problema y su correspondiente solución ya han sido divulgados en D02, donde se describen nanopartículas metálicas que incorporan como ligando ácido dimercaptosuccínico. Un extremo carboxilo del ácido dimercaptosuccínico se adhiere al núcleo de la nanopartícula, el grupo tiol se utiliza para enlazar con moléculas adyacentes de dimercaptosuccínico y el grupo carboxilo del otro extremo del ácido dimercaptosuccínico enlaza con el componente activo como puede ser una proteína (figura 3; página 10, líneas 7-14; página 11, línea 9-21).

Un experto en la materia podría incorporar las características divulgadas en D02 a la invención recogida en D01, dando como resultado el objeto técnico de las reivindicaciones 4, 8, 11 y 13-15 de la solicitud.

Hoja adicional

Por lo tanto se considera que el objeto de la invención recogido en dichas reivindicaciones carece de actividad inventiva a la luz de lo divulgado en D01 y D02 (Art. 8.1 LP11/1986).

En relación a las reivindicaciones 5, 7, 9 y 12 de la solicitud, la diferencia que existe entre el objeto de la invención definido en dichas reivindicaciones y el documento D01 radica en la utilización de plata como metal del núcleo de las nanopartículas en lugar de oro.

Sin embargo, dado que la utilización de plata como material metálico del núcleo de nanopartículas es conocido en el estado de la técnica (ver por ejemplo el documento D03; página 7434, columna 2, párrafo 3; página 7435, columna 1, párrafo 3; que divulga la preparación de nanopartículas con un núcleo metálico de plata y monocapas de tiopronina), se considera que la sustitución de oro por plata constituye una alternativa que el experto en la materia se plantearía sin esfuerzo inventivo.

Por lo tanto, el objeto de la invención recogido en las reivindicaciones 5, 7, 9 y 12 de la solicitud carece de actividad inventiva a la luz de lo divulgado en el estado de la técnica (Art. 8.1 LP11/1986).

Por el contrario, no se han encontrado en el estado de la técnica documentos que revelen ni contengan sugerencia alguna que dirija al experto en la materia hacia la invención definida en la reivindicación 2 de la solicitud, relativa a nanopartículas metálicas funcionalizadas con el péptido intestinal vasoactivo (VIP).

En consecuencia, el objeto de la invención recogido en las reivindicación 2 de la solicitud es nuevo y posee actividad inventiva (Art. 6.1 y 8.1 LP11/1986).