

(1) Número de publicación: 2 363 901

21 Número de solicitud: 201000163

(51) Int. Cl.:

**B82B 1/00** (2006.01) **B82Y 5/00** (2011.01)

# (12)

## SOLICITUD DE PATENTE

A1

 22 Fecha de presentación: 05.02.2010
(1) Solicitante/s: Universidad de Valladolid Plaza de Santa Cruz, 8 47002 Valladolid, ES
(3) Fecha de publicación de la solicitud: 18.08.2011
(2) Inventor/es: Álvarez Rodríguez, Rubén; Rodríguez Cabello, José Carlos; Girotti, Alessandra; Alonso Rodrigo, Matilde y Arias Vallejo, Javier
(3) Fecha de publicación del folleto de la solicitud: 18.08.2011
(7) Agente: No consta

(A) Título: Nanopartículas metálicas funcionalizadas que comprenden un sistema sensible a variaciones de pH y temperatura capaces de formar nano-topografías lineares en 2-D y estructuras globulares submicrométricas.

57 Resumen:

Nanopartículas metálicas funcionalizadas que comprenden un sistema sensible a variaciones de pH y temperatura capaces de formar nano-topografías lineares en 2-D y estructuras globulares submicro-métricas.

OFICINA ESPAÑOLA DE

PATENTES Y MARCAS

**ESPAÑA** 

La invención se refiere a la inmovilización de fragmentos moleculares con sensibilidad específica a temperatura y pH sobre la superficie de la nanopartícula metálica. Las nanopartículas también pueden ser utilizadas: como plantillas para la creación controlada de topografías lineales de metales nanométricos en dos dimensiones (nanohileras) para aplicaciones tecnológicas como la fabricación de nano-conectores y nano-conductores; como plantillas para la creación controlada de topografías que muestran patrones geométricos recíprocos y distancias inter-partícula análogas mayoritariamente dentro del rango comprendido entre 10 y 40 nm; y como unidades discretas de transporte y vehiculización de metales nanométricos mediante la formación de estructuras globulares de escala micro y submicro-métrica para la creación de nano y micro dispositivos inteligentes en aplicaciones tecnológicas, biotecnológicas y biomédicas.

## DESCRIPCIÓN

Nanopartículas metálicas funcionalizadas que comprenden un sistema sensible a variaciones de PH y temperatura capaces de formar nano-topografías lineares en 2-D y estructuras globulares submicro-métricas.

5

La presente invención se refiere a la inmovilización de fragmentos moleculares con sensibilidad específica a temperatura y pH sobre la superficie de la nanopartícula metálica.

La invención proporciona también métodos para la producción de nanopartículas funcionalizadas (por ejemplo, estabilizadas). Además, la presente invención puede proporcionar por ejemplo, monocapas de polímero derivado de la elastina auto-estructuradas (SAM's), donde la monocapa se forma sobre una nanopartícula metálica.

Las nanopartículas pueden ser utilizadas como sensores multirespuesta para aplicaciones biomédicas ya que son capaces de detectar variaciones de pH y temperatura dentro de los parámetros utilizados en análisis y estudios bioló-15 gicos.

Las nanopartículas también pueden ser utilizadas como plantillas para la creación controlada de topografías lineales de metales nanométricos en dos dimensiones (nano-hileras) para aplicaciones tecnológicas como la fabricación de nano-conectores y nano-conductores.

20

Las nanopartículas también pueden ser utilizadas como plantillas para la creación controlada de topografías que muestran patrones geométricos recíprocos y distancias inter-partícula análogas mayoritariamente dentro del rango comprendido entre 10 y 40 nm.

25 Las nanopartículas pueden ser utilizadas como unidades discretas de transporte y vehiculización de metales nanométricos mediante la formación de estructuras globulares de escala micro y submicro-métrica para la creación de nano y micro dispositivos inteligentes en aplicaciones tecnológicas, biotecnológicas y biomédicas.

El termino "metálico" queda referido en este contexto como derivados de la síntesis de metales, óxidos metálicos 30 y otras composiciones que contengan uno o varios metales.

El término "híbrido" queda referido en este contexto como la asociación físico-química de un material o varios de origen inorgánico con un material o varios de origen orgánico. La mencionada asociación debe de ser conceptualizada como una unidad discreta que muestra una fusión sinérgica de las propiedades de los bloques constituyentes.

35

#### Antecedentes de la invención

El número creciente de artículos de investigación que describen el diseño y la síntesis de nuevas estructuras autoensambladas basadas en la combinación de nanopartículas metálicas y biomoléculas refleja la importancia de esta asociación sinérgica de compuesto inorgánico-orgánico en relación a la producción de nuevos materiales híbridos interesantes para aplicaciones biomédicas, biotecnológicas y tecnológicas que comprende desde el desarrollo de sondas inteligentes para la vehiculización y descarga de fármacos hasta la generación de dispositivos metálicos conductores que muestras dimensiones nanométricas [1-3].

45

El desarrollo de los primeros protocolos de síntesis de nanopartículas de oro ha permitido el estudio de la interacción metal-ligando necesario para estabilizar el metal nanoscópico [4-6] y segundo para amplificar las propiedades físico-químicas del agregado en vista a aplicaciones prácticas [1, 3, 7]. En particular, el estudio de la interacción entre polímeros derivados de la elastina (PDE) y nanopartículas de oro ha dado lugar a la creación de sensores y detectores

- 50 [8]. Los PDE son biocompatibles y biodegradables. Esto supone una ventaja a la hora de su utilización en aplicaciones biomédicas. De manera característica, los PDE están basados en sutiles modificaciones de la estructura original de la proteína elastina que exhiben los mamíferos superiores [9]. Afortunadamente, el desarrollo de la ingeniería genética ha permitido la obtención de PDE como polímeros recombinantes [10]. Los PDE de naturaleza recombinante, también llamados "recombinameros" suponen un gran avance respecto a la utilización de protocolos de síntesis tradicionales
- 55 que generalmente son tediosos y complejos [10]. De manera destacada cabe mencionar que la producción de PDE mediante técnicas de ingeniería genética permite el control absoluto de parámetros como el peso molecular, estructura polimérica y conectividad de los PDE producidos [11]. Además, los PDE exhiben un comportamiento reversible de agregación-expansión de su estructura molecular en función de la variación de propiedades del medio como temperatura, pH, concentración iónica, entre otras [9, 12]. Los PDE muestran en su fase condensada uno de los factores
- 60 más relevantes de su naturaleza inteligente: auto-ensamblaje en función de múltiples estímulos. Dicha característica o propiedad has sido ya explotada para el desarrollo y creación de superficies inteligentes [13]. Los PDE son además materiales que muestran una excelente biocompatibilidad tanto en disolución como entrecruzados en forma de hidrogeles [14]. Recientemente han sido publicadas aplicaciones de PDE como vehículos de transporte y liberación controlada de fármacos [15]. De manera paralela, la conceptualización de plataformas de PDE han sido hasta la fecha, una contribu-
- 65 ción sustanciosa para el avance de la medicina regenerativa a nivel de control del crecimiento y proliferación celular para la creación y reparación de tejidos [16].

Los autores de la presente publicación también han presentado el comportamiento inteligente de PDE funcionalizados con grupos fotocrómicos. La modificación de PDE con moléculas fotosensibles ha dado lugar a materiales sensibles a múltiples estímulos incluyendo sensibilidad a radiación UV-visible [17].

- 5 En este marco cabe destacar que la producción de materiales híbridos basados en la combinación de PDE con nanopartículas metálicas esta todavía inexplorado. No obstante, ya ha sido demostrada la habilidad específica de aminoácidos naturales para la producción de nanocadenas de oro [18]. Hoy en día, la producción de topografías metálicas a escala nanométrica reviste gran importancia en el desarrollo de nuevas aplicaciones electro-ópticas avanzadas [3]. Además, la utilización del reconocimiento biomolecular ya ha permitido el control del auto-ensamblamiento de nano-
- 10 partículas inorgánicas así como el desarrollo de nuevos materiales y dispositivos nanotecnológicos [19]. De manera destacada cabe mencionar que la presencia de nanopartículas de oro puede condicionar el plegamiento de proteínas. Por lo tanto, la asociación nanopartícula-proteína muestra connotaciones de carácter terapéutico ya que pueden ser aplicadas en el estudio de patologías provocadas por el plegamiento incorrecto de proteínas [20]. En este sentido, ya han sido publicadas la síntesis de nanopartículas de oro y de plata mediadas por proteínas modelo [21, 22]. Actual-
- 15 mente, la síntesis de nanopartículas de oro mediada o en presencia de proteínas está prácticamente inexplorada, a pesar de que dicha síntesis reviste grandes ventajas con respecto a técnicas y protocolos tradicionales. Los autores de la presente invención ya han desarrollado algunos trabajos relativos al estudio de la interfase oro-proteína y que han dado lugar al desarrollo una patente en éste campo (P-200900418).
- 20 Por otro lado, la preparación de materiales que muestran geometrías globulares de tamaño nanométrico en la fase condensada (tanto micelas como vesículas) son también interesantes para el desarrollo de nano-vehículos de transporte y descarga en aplicaciones biomédicas. Actualmente existe un número creciente de materiales poliméricos tanto recombinantes [15], como sintéticos (copolímeros en bloque) [23-25] que presentan una alternativa muy ventajosa con respecto al tradicional uso de liposomas [26] en la conceptualización de nuevas plataformas de transporte biocompatibles que exhiben dimensiones por debajo de la escala submicro-métrica.

Es este sentido, la obtención de materiales capaces de actuar como nano-contenedores presenta una gran perspectiva en el desarrollo de terapias basadas en la transferencia de: material genético, fármacos o nano-dispositivos; así como la creación de membranas artificiales, nano-reactores y biosensores [15, 27-30].

30

#### Compendio de la invención

- La presente invención proporciona la primera preparación con éxito de nanopartículas funcionalizadas (por ejemplo estabilizadas) con PDE sensibles a pH y a temperatura. Además, las nanopartículas de oro funcionalizadas fueron obtenidas en una única etapa y en un medio homogéneo de un único disolvente. Simultáneo a la formación de las nanopartículas ha sido su funcionalización con materiales que muestran sensibilidad a la temperatura y el pH del medio.
- 40 El modo de realización preferido utiliza un PDE de origen recombinante que se une a la nanopartículas de oro a través de un enlace covalente azufre-oro entre el PDE y la superficie de la nanopartícula. Las nanopartículas funcionalizadas exhiben respuestas cuantificables físicamente expresadas como resultado de cambios en la estructura de sus componentes moleculares que inducen modificaciones de la estructura de la fase condensada en función a variaciones de temperatura y pH.
- 45

La Figura 1 muestra la secuencia del PDE modificado de origen recombinante utilizado en el modo preterido de realización para funcionalizar las nanopartículas. Su estructura incluye la siguiente secuencia aminoacídica: C- $[(VPGVG)_2(VPGEG)(VPGVG)_2]_{15}$ .

50 Donde las letras C, V, P, G, E corresponde con los aminoácidos cisteína, valina, prolina, glicina y ácido glutámico, respectivamente.

La Figura 2 muestra una micrografía de transmisión de electrones (TEM) de nanopartículas de oro funcionalizadas con el PDE (oro-PDE) utilizado en el modo preferido de realización. La barra de escala representa nanómetros.

55

La Figura 3 muestra el espectro de infrarrojos (FT-IR) de los materiales que han sido sintetizados en el modo de realización preferido y son los siguientes: PDE, nanopartículas de oro funcionalizadas con PDE (oro-PDE).

La Figura 4 muestra la energía de los orbitales S2p (donde S corresponde con el átomo azufre y 2p con los orbitales 2p) obtenida mediante XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy) medida para el PDE utilizado en el modo preferido de realización y para el híbrido oro-PDE.

La Figura 5 muestra espectrogramas de absorción de radiación UV-vis realizado en el rango comprendido entre 250 y 800 nm y llevado a cabo para disoluciones a pH ácido (pH = 3) del híbrido (oro-PDE) en función de la temperatura. La concentración de la disolución oro-PDE corresponde con 0.39 mg/mL.

La Figura 6 muestra una repetición de ciclos de calentamiento y de enfriamiento entre 25°C y 35°C llevado a cabo para las nanopartículas funcionalizadas oro-PDE en los que se ha medido la absorción de radiación UV-vis a 505 nm

3

en función de la temperatura y el número ciclos de calentamiento-enfriamiento. La concentración de la disolución oro-PDE corresponde con 0.22 mg/mL.

La Figura 7 muestra la absorbancia del híbrido oro-PDE en función del pH del medio. La concentración de la disolución oro-PDE corresponde con 0.39 mg/mL.

La Figura 8 muestra una repetición de ciclos entre pH ácido (pH = 3) y pH básico (pH = 10) llevado a cabo para las nanopartículas funcionalizadas oro-PDE en los que se ha medido la absorción de radiación UV-vis a 500 nm en función del pH del medio y el número ciclos a temperatura ambiente. La concentración de la disolución oro-PDE corresponde con 0.39 mg/mL.

10

15

La Figura 9 muestra dos electro-micrografías (obtenidas mediante la técnica Cryo-TEM) de nanopartículas de oro funcionalizadas con el PDE utilizado en el modo preferido de realización del híbrido oro-PDE. Las micrografías fueron obtenidas de una disolución a pH = 3. En las micrografías se observa que la distancia entre las nanopartículas funcionalizadas es dependiente de la temperatura. La electro-micrografía de la izquierda (a) fue tomada a 15°C y la de la derecha (b) a 35°C. Comparando la densidad y la distancia entre partículas que aparecen en ambas micrografías es posible razonar que las nanopartículas funcionarizadas oro-PDE muestran un comportamiento de agregación y separación en función de la temperatura a pH ácido (pH = 4). La barra de escala representa nanómetros.

- 20 La Figura 10 muestra una micrografía de transmisión de electrones tomada en áreas de baja densidad de nanopartículas donde puede distinguirse la presencia de una asociación lineal de nanopartículas de oro que muestran distancias inter-partícula correlacionadas. La muestra fue preparada mediante el protocolo de dip-coating. La barra de escala representa nanómetros.
- La Figura 11 muestra un histograma correspondiente a las distancias inter-partícula calculadas para la asociación lineal mostrada en la Figura 10 y que corresponde a la formación de nano-hileras de nanopartículas compuestas por oro-PDE y que comprenden la formación de estructuras lineales con distancias inter-partícula mayoritariamente en el rango comprendido entre 10 y 40 nm.
- 30 La Figura 12 muestra una micrografía mostrada previamente en la Figura 9 y tomada mediante la técnica Cryo-TEM donde se reflejan mediante el trazo de contornos las posibles asociaciones lineales diferenciadas que corresponden con la formación de estructuras lineales de oro-PDE que muestran distancias inter-partícula reciprocas y que pueden ser diferenciadas como nano-hileras de material híbrido oro-PDE. La barra de escala representa nanómetros.
- 35 La Figura 13 muestra un histograma correspondiente a las distancias inter-partícula calculadas para las asociaciones lineales destacadas en la Figura 11 y que corresponden a la formación de nano-hileras de nanopartículas compuestas por oro-PDE y que comprenden la formación de estructuras lineales con distancias inter-partícula mayoritariamente en el rango comprendido entre 10 y 40 nm.
- 40 La Figura 14 muestra una micrografía del experimento de control donde puede observarse la formación de asociaciones lineales y equidistantes de nanopartículas de oro sintetizadas mediante el método de Turkevich que muestran distancias inter-partícula dentro del rango comprendido entre 10 y 40 nm. La barra de escala representa nanómetros.
- La Figura 15 muestra un histograma correspondiente a las distancias inter-partícula calculadas para las distancias observadas en la Figura 14 y que corresponden a la formación de distribuciones lineales y equidistantes de nanopartículas de oro que comprenden la formación de estructuras lineales con distancias inter-partícula mayoritariamente en el rango comprendido entre 10 y 40 nm.
- La Figura 16 muestra una micrografía del híbrido oro-PDE liofilizado donde pueden observarse la presencia de structuras globulares de tamaño submicro-métrico. La barra de escala representa micrómetros.

La Figura 17 muestra una micrografía del híbrido oro-PDE liofilizado donde pueden observarse la presencia de tres estructuras globulares de diferentes tamaños y sección transversal. La barra de escala representa nanómetros.

- La Figura 18 muestra una micrografía del híbrido oro-PDE liofilizado donde puede observarse la ruptura de la superficie externa de la estructura globular y que permite que el contenido interior se desplace hacia el exterior. La barra de escala representa nanómetros.
- La Figura 19 muestra una micrografía del híbrido oro-PDE liofilizado donde puede observarse el contenido de una estructura globular. Dicho contenido se asemeja a una nanocadena compuesta de oro y PDE donde las nanopartículas de oro están unidas entre sí mediante PDE que tiene una estructura condensada oblonga y bien definida. La barra de escala representa nanómetros.

La Figura 20 muestra una micrografía del híbrido oro-PDE liofilizado donde pueden observarse la presencia de una estructuras globular híbrida de dimensiones submicro-métricas. La barra de escala representa nanómetros.

#### Descripción detallada del modo de realización preferido de la invención

La síntesis de nanopartículas funcionalizadas de oro se llevó a cabo basándose en el método de Brust y *col.* modificado por los autores de la presente invención [5]. La síntesis del PDE utilizado en el modo de realización preferido ya ha sido descrita en la literatura por los autores de la presente invención [12]. La estructura del PDE utilizado en el modo de realización preferido de la invención está incluido en la Figura 1 y corresponde con la siguiente secuencia aminoacídica C-[(VPGVG)<sub>2</sub>(VPGEG)(VPGVG)<sub>2</sub>]<sub>15</sub> donde las letras C, V, P, G, y E corresponden con los aminoácidos cisteína, valina, prolina, glicina y ácido glutámico respectivamente. Brevemente, se disolvió el reductor NaBFL en 2 mL de agua ultrapura (9.7 mg, 2.55 x 10<sup>-4</sup> mol) y se añadió a una disolución acuosa de PDE (53.0 mg,

- 10 1.66 x 10<sup>-6</sup> mol en 1 ml de H<sub>2</sub>O). La disolución resultante fue agitada a 4°C unos minutos. Posteriormente, se añadió 2 mL de una disolución acuosa del complejo de oro HAuCl<sub>4</sub> (63.0 mg. 1.6 x 10<sup>-4</sup> mol. en 6 mL) manteniendo la agitación. Los reactivos son solubles en medio acuoso, luego no es necesario el uso de co-disolventes ni de agentes de transferencia de fase para que la reacción de reducción y de crecimiento de las nanopartículas de oro tenga lugar. La disolución roja resultante fue agitada durante 2 horas a 4°C. Posteriormente, la mezcla de reacción fue filtrada
- 15 (tamaño de poro del filtro  $0.22 \ \mu$ m). El híbrido oro-PDE obtenido fue separado de subproductos y reactivos en un proceso de purificación basado en diálisis frente a agua ultrapura. La diálisis de las nanopartículas funcionalizadas oro-PDE fue llevada a cabo durante 48 horas (tripas de diálisis 12-14000 Dalton). Las nanopartículas funcionalizadas oro-PDE fueron obtenidas como un sólido de aspecto algodonoso de color rojo oscuro después de la liofilización de la disolución dializada.
- 20

El contenido en oro metálico presente en las nanopartículas funcionalizadas oro-PDE fue estimado a través de técnicas espectroscópicas (ICP-AES). El contenido en Au<sup>0</sup> encontrado fue de 13.8% en peso.

Las micrografías electrónicas de transmisión (TEM) de las nanopartículas funcionalizadas oro-PDE se corresponden con las publicadas por otros investigadores para otros híbridos metal-compuesto orgánico en que se muestran pequeñas partículas no agregadas de tamaño comprendido entre 1 nm y 10 nm (Figura 2). Las partículas mostradas en la Figura 2 sugieren que el PDE actúa como monocapa estabilizante que impide la formación de agregados de mayor tamaño. El análisis de espectroscopia infrarroja (FT-IR) del híbrido oro-PDE muestra las bandas de absorción características del material de partida PDE (Figura 3). Un sistema híbrido inorgánico-orgánico sería particularmente ventajoso al ser soluble en medio acuoso y contener las propiedades originales del material modificado de elastina para aplicaciones biomédicas. Además, el modo de realización preferido utiliza un PDE de origen recombinante que se une a la nanopartículas de oro a través de un enlace covalente azufre-oro entre el PDE y la superficie de la nanopartícula (Figura 4). La energía de los orbitales enlazantes fue medida mediante la técnica XPS (X-ray Photo-electron Spectroscopy) y los resultados han sido mostrados en la Figura 4.

35

El espectro de absorción en el UV-vis (Figura 5) del híbrido oro-PDE muestra una banda de absorción con  $\lambda_{max}$  = 500 nm. Esta banda ha sido atribuida a la resonancia de plasmones superficiales (SPR) de partículas de oro de tamaño nanométrico [7].

- Por otro lado el híbrido oro-PDE exhibe propiedades espectroscópicas que pueden ser moduladas en función de la temperatura y el pH del medio (Figura 5). A pH ácido (pH = 3) las nanopartículas funcionalizadas muestran una amplificación de la absorción de radiación UV-vis en función de la temperatura (Figura 5). Por lo tanto, el híbrido oro-PDE puede ser utilizado como un sensor de temperatura del medio mediante la relación directa de la absorbancia del híbrido con la temperatura del medio. Además el híbrido oro-PDE puede ser sometido de manera reversible a ciclos de calentamiento y enfriamiento como se muestra en la Figura 6. La amplificación de la absorbancia con respecto a la temperatura no se observa en el híbrido oro-PDE a pH neutro ni a pH básico como puede observarse en la Figura 7. Debido a esta propiedad, el híbrido oro-PDE muestra una absorbancia que puede ser modulada en función del pH del medio como se muestra en la Figura 8. El híbrido oro-PDE ha sido sometido a variaciones de pH del medio de una manera reversible donde se ha demostrado la amplificación de la radiación absorbida a pH ácido (pH = 3) y una disminución de la absorbancia a pH básico (pH = 10). Por lo tanto, el híbrido oro-PDE puede ser utilizado com un sensor de nH en medio a puede ser utilizado com un sensor de temperatura (pla medio con servarse de la absorbancia de la absorbancia que puede ser modulada en función del pH del medio como se muestra en la Figura 8. El híbrido oro-PDE ha sido sometido a variaciones de pH del medio de una manera reversible donde se ha demostrado la amplificación de la radiación absorbida a pH ácido (pH = 3) y una sensor de pH en medio a puede ser utilizado com un sensor de pH en temperatura pla básico (pH = 10). Por lo tanto, el híbrido oro-PDE puede ser utilizado com un sensor de nH en medio a puede ser utilizado com un sensor de nH en medio a puede ser utilizado com un sensor de nH en medio sensorbancia de puede ser utilizado com un sensor de nH en medio absorbancia de puede ser utilizado com un sensor
- sensor de pH en medio acuoso incluyendo los medios biológicos. Los autores de la presente investigación ya han explicado la influencia del pH y de la temperatura en las propiedades ópticas del PDE [12].
- El híbrido oro-PDE fue analizado mediante microscopía electrónica de transmisión. Las muestras fueron preparadas mediante la deposición de una gota de disolución de estudio en una rejilla de microscopía electrónica. Los análisis se llevaron a cabo 24 horas después (como mínimo) para asegurar la completa evaporación de los compuestos volátiles (como el disolvente). Las micrografías electrónicas de transmisión obtenidas mediante la técnica Cryo-TEM del híbrido oro-PDE se corresponden con las publicadas por otros investigadores para otros híbridos metal-compuesto orgánico en que se muestran pequeñas partículas no agregadas de tamaño comprendido entre 1 nm y 10 nm (Figura 9).
- 60 La respuesta a las variaciones térmicas del material derivado de elastina inmovilizado en la superficie de las nanopartículas de oro no sufrió modificaciones notables. De este modo, mediante la observación de micrografías electrónicas de transmisión llevadas a cabo a dos temperaturas distintas, fue posible observar directamente la agregación y separación de las nanopartículas en función de la temperatura. En las micrografías mostradas en la Figura 9 se observa que la distancia entre las nanopartículas funcionalizadas es dependiente de la temperatura. La micrografía de la izquierda ha
- 65 sido tomada a 15°C y la de la derecha a 35°C. Comparando la densidad y la distancia entre partículas que aparecen en ambas micrografías es posible razonar que las nanopartículas funcionarizadas oro-PDE muestran un comportamiento de agregación y separación en función de la temperatura (en disolución a pH = 4). A 15°C las nanopartículas funciona-lizadas están separadas (distancia entre las nanopartículas es de varios ordenes de magnitud con respecto al diámetro

de las nanopartículas) y la densidad de partículas es relativamente baja en la zona de estudio. A 35°C se produce una agregación de las nanopartículas que conlleva un aumento de la densidad de partículas y una disminución general de la distancia entre partículas vecinas, donde en algunas áreas de la zona de estudio la distancia entre partículas adyacentes es del orden del diámetro de las nanopartículas. Esto supone una demostración directa del mecanismo de agregación-expansión mostrado por las nanopartículas funcionarizadas (oro-PDE) en función de la temperatura. Las

- 5 partículas mostradas en la Figura 9 sugieren que el material de elastina actúa como monocapa estabilizante que impide la formación de agregados insolubles.
- De manera destacada y particular para la asociación híbrida oro-PDE, fueron detectadas asociaciones lineares de nanopartículas de oro en zonas de baja densidad de nanopartículas. Por ejemplo, en la micrografía mostrada en la Figura 10 pude observarse una nano-hilera de nanopartículas de oro. Dicha topografía lineal de dos dimensiones (2-d) es característica del híbrido oro-PDE. Desafortunadamente las nano-topografías lineales solo pueden ser apreciadas con claridad en zonas de baja densidad de nanopartículas. Esto se debe a que en zonas de alta densidad de nanopartículas se produce el apilamiento y el solapamiento de bloques partícula-polímero de oro-PDE. Las nano-hileras observadas
- corresponden con una sucesión de nanopartículas de oro que muestran distancias inter-partícula correlacionadas. En 15 la Figura 11 hemos mostrado el histograma correspondiente a la medida de las distancias inter-partícula. En resumen, hemos detectado que mas del 85% de las distancias inter-partícula medidas están dentro del rango comprendido entre 10 y 40 nm. De manera análoga también se han podido diferenciar topografías lineales 2d en la micrografía de la Figura 9 tomada a 15°C. En este caso, la visión de disposiciones lineales es mas compleja debido a que la zona fotografiada
- corresponde con una zona de densidad media-alta de nanopartículas. Por claridad, en la Figura 12 hemos diferenciado las posibles asociaciones lineales análogas a aquellas descritas para la Figura 10. Además, los datos estadísticos de distancias inter-partícula medidas para las asociaciones propuestas en la Figura 10 se encuentran en el mismo rango, es decir, mas del 90% de las distancias inter-partícula medidas se encuentran dentro del intervalo comprendido entre 10 y 40 nm. Los datos estadísticos correspondientes a la Figura 12 se muestran en la Figura 13. Este comportamiento
- del híbrido oro-PDE puede estar asociado al comportamiento intrínseco del PDE utilizado en el modo preferido de 25 realización. Varias publicaciones ya han reflejado la capacidad de los PDE para formar nano-estructuras filamentosas compuestas de filamentos enrollados de espirales  $\beta$  de unos 5 nm de anchura [31, 32]. De esta manera es posible asociar las topografías lineales observadas con la capacidad del PDE utilizado para formar nano-fibras que poseen una estructura lineal de tipo fibrilar. De esta manera nos gustaría destacar la capacidad intrínseca del híbrido oro-PDE para
- disponerse en forma de nano-hileras de dimensiones nanométricas que presentan distancias inter-partícula correlacio-30 nadas y dentro del rango comprendido entre 10 y 40 nm preferiblemente. Este fenómeno en particular reviste gran importancia respecto a la aplicación de híbridos oro-PDE en la producción de nano-materiales conductores así como la preparación de nano-conectores en aplicaciones tanto ópticas como electrónicas [3]. Para comprobar que la disposición del híbrido oro-PDE en nano-topografías lineales 2-d no es un artefacto o un fenómeno aislado diseñamos un
- experimento de control. El experimento de control se ha basado en la producción de nanopartículas de oro estabiliza-35 das con citrato. La síntesis fue llevada a cabo siguiendo un protocolo descrito ya por Turkevich en 1963 [6]. El tamaño de las nanopartículas de oro del experimento de control estaba dentro del rango comprendido entre 10 y 15 nm. El experimento de control consiste en determinar si el PDE utilizado en el modo preferido de reacción es la plataforma necesaria para la producción de nano-topografías lineales 2-d. Para ello, el experimento de control se llevará a cabo
- mezclando las nanopartículas sintetizadas de manera independiente (mediante el protocolo de Turkevich) con el PDE utilizado en el modo preferido de realización. De esta manera, si el PDE induce la formación de topografías lineales 2d con nanopartículas de oro sintetizadas "in situ", entonces también debería de promover la formación de topografías análogas en nanopartículas sintetizadas por otros métodos.
- El experimento de control se llevó a cabo de la siguiente manera. Brevemente, a una disolución coloidal de nano-45 partículas sintetizadas por el método de Turkevieh (1 mL) se le añadió una disolución acuosa de PDE (2 mg en 0.1 mL). La mezcla fue agitada durante dos horas. Posteriormente, se tomo una alícuota que fue dispuesta en una rejilla de microscopía electrónica. La muestra fue analizada una vez que los compuestos volátiles (disolvente) se evaporaron. Una micrografía representativa del experimento de control muestra que las nanopartículas se disponen en asociaciones
- lineales con distancias inter-partícula correlacionadas (Figura 14) y en el mismo rango observado para el híbrido oro-50 PDE es decir entre 10 y 40 nm (Figura 15). Ya hemos demostrado que el híbrido oro-PDE exhibe la capacidad de formar nano-topografías lineales 2-d en muestras sometidas a evaporación lenta y posteriormente analizadas por microscopía de transmisión de electrones. También hemos demostrado que las mencionadas topografías son susceptibles a la concentración y por lo tanto, son mas destacadas y diferenciadas en zonas de baja densidad de oro- PDE debido
- a que en zonas de alta densidad se producen solapamientos y apilamientos de bloques partícula-PDE. Por lo tanto, las nanopartículas objeto de la presente invención pueden ser utilizadas como plantillas para la creación controlada de topografías lineales y/o equidistantes de metales nanométricos para aplicaciones tecnológicas como la fabricación de nano-conectores y nano-conductores. Además, las nanopartículas también pueden ser utilizadas como plantillas para la creación controlada de topografías que muestran patrones geométricos lineales recíprocos y distancias interpartícula mayoritariamente dentro del rango comprendido entre 10 y 40 nm.

60

Por otro lado, también queremos destacar la capacidad del híbrido oro-PDE para auto-ensamblarse en forma de estructuras globulares de dimensiones submicro-métricas cuando el híbrido es sometido a liofilización. Este fenómeno reviste gran interés como un método de preparación y dosificación de híbrido oro-PDE en porciones discretas y en tamaños submicro-métricos. Una micrografía representativa de las estructuras globulares ha sido mostrada en la Figura 16. Las estructuras globulares observadas comprenden un sistema híbrido compuesto de oro-PDE con tamaños inferiores a los micrómetros pudiendo llegar incluso a las decenas de nanómetros en sección transversal como hemos mostrado en la Figura 17. La composición de las estructuras globulares producidas por la liofilización del híbrido oro-

PDE corresponde con agregados convexos de híbrido oro-PDE los cuales contienen distribuciones discretas de metal nanoscópico y PDE como puede observarse en la Figura 18. Este fenómeno reviste gran interés para la dosificación del híbrido oro-PDE en porciones discretas de tamaño determinado. De manera alternativa, la obtención de distribuciones discretas de estructuras globulares compuestas de oro-PDE permite la dosificación homogénea y en seco (sin necesidad

- 5 de disolventes) del híbrido oro-PDE como por ejemplo formando parte de la carga de aerosoles y nebulizadores. Esta capacidad de encapsulamiento mostrado por el híbrido oro-PDE queda latente en la micrografía mostrada en la Figura 18 donde puede observarse que las estructuras globulares no están huecas sino rellenas de material constituyente, lo cual incrementa su estabilidad mecánica con respecto a estructuras globulares huecas (en ausencia de disolvente). Por lo tanto, queda de manifiesto la capacidad intrínseca mostrada por el híbrido oro-PDE para formar estructuras
- 10 globulares que contienen material híbrido que es capaz de auto-estructurarse. En la Figura 19 también se observa como el contenido de una de las estructuras globulares se corresponde con una nano-hilera de híbrido oro-PDE. En este caso, la nano-sucesión de partículas de oro exhibe fibras constituidas por PDE y nanopartículas metálicas (oro) que se asemejan a un collar de cuentas aunque no muestra una geometría lineal debido a que durante el proceso de liofilización se produce la total retirada del disolvente (agua) y como consecuencia se produce el plegamiento de las
- 15 cadenas poliméricas que constituyen el híbrido oro-PDE de manera mas acuciada con respecto a las disposiciones lineales en 2-d observadas en las muestras analizadas mediante evaporación lenta y dip-coating (Figura 10). Por lo tanto, la deshidratación total inducida en el proceso de liofilización conlleva a un repliegue del material oro-PDE que se estabiliza mediante la minimización de la tensión superficial de los agregados y la formación de estructuras globulares de tamaños submicro-métricos como puede observarse en la Figura 20. Entonces, las nanopartículas oro-
- 20 PDE pueden ser utilizadas como unidades discretas de transporte y vehiculización de metales nanométricos mediante la formación de estructuras globulares de escala micro y submicro-métrica para la creación de nano y micro dispositivos inteligentes en aplicaciones tecnológicas, biotecnológicas y biomédicas [15, 27-30].

El modo de preparación preferido contempla la liofilización de disoluciones acuosas de oro-PDE de concentraciones entre 0.001% hasta 1%. La liofilización del híbrido oro-PDE puede ser llevada a cabo mediante una técnica de evaporación a alto vacío y a baja temperatura, en un proceso similar o relativo a la liofilización de materiales orgánicos.

#### 30 Descripción de los modos de realización alternativos de la invención

Habiéndose descrito la invención con respecto a los modos de realización preferidos actualmente, la invención no queda limitada por ellos. Existen alternativas para los diversos elementos que constituyen el híbrido como se describe a continuación. Estas alternativas se pueden emplear individualmente o en consonancia con otras variantes.

#### 1- Nanopartícula metálica

Las nanopartículas son generalmente partículas de tamaños nanoscópicos y que pueden mostrar geometrías variadas como octaedros, esferas, cilindros..etc. Los autores de la presente invención han obtenido nanopartículas de forma esferoidal. La forma puede cubrir todas las posibilidades indicadas para nanopartículas. Tal y como aquí se utiliza el término, por partícula se entiende las de un tamaño de 500 nm o inferior, preferiblemente entre 1 y 10 nm y mas preferiblemente entre 1 y 3 nm. Se puede utilizar una serie de materiales metálicos como parte inorgánica del híbrido. El material preferido en la presente invención es un metal, preferiblemente oro. De manera alternativa, el metal puede seleccionarse entre otros metales como por ejemplo plata, cobre, platino, cobalto, hierro entre todos los metales restantes de la tabla periódica. La presente invención no excluye la posible utilización de compuestos metálicos son el FePt y el Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> respectivamente.

#### 2- El PDE (polímero derivado de elastina)

50

35

La matriz polimérica que se une a la superficie derivada del núcleo de la nanopartícula es una característica importante del modo de realización preferido de la invención. Se prefiere una secuencia aminioacídica del tipo VPGXG donde V, P y G corresponden con los aminoácidos valina, prolina, glicina respectivamente y X corresponde con cualquier aminoácido.

55

En el modo preferido de realización de la invención se ha seleccionado por grupo X el aminoácido ácido glutámico porque puede formar enlaces covalentes (por ejemplo de tipo amida) con otros grupos reactivos por ejemplo con las aminas para dar lugar a amidas derivadas. Sin embargo, no hay que entender que se excluye del marco de la presente invención otros aminoácidos susceptibles de formar enlaces covalentes con grupos otros grupos químicos, como por ejemplo los aminoácidos lisina y ácido aspártico.

60

La secuencia aminoacídica expresada en el modo preferido de realización de la presente invención corresponde con la repetición de las secuencias pentapeptídicas (VPGVG) y (VPGXG). Sin embargo, tampoco se excluye del marco de la presente invención otras secuencias aminoacídicas pentapeptídicas ni de las combinaciones o repeticiones de las mismas que conlleve estructuras diferentes y pesos moleculares variados.

65

La matriz polimérica derivada de la elastina (PDE) se puede unir por otros medios a la superficie de la nanopartícula en lugar de hacerlo a través del enlace SH, como está expresado en el modo preferido de realización de la invención.

No obstante, no se excluyen del marco de la presente invención otros modos covalentes de enlace entre el PDE con la superficie de la nanopartícula, como por ejemplo, a través de enlaces de puente disulfuro S-S.

El PDE se puede unir por otros medios a la superficie de la nanopartícula en lugar de hacerlo a través del aminoá-5 cido cisteína, como está expresado en el modo preferido de realización de la invención. No obstante, no se excluyen del marco de la presente invención otros aminoácidos susceptibles de formar enlaces covalentes con la superficie de la nanopartículas metálicas.

El número de grupos sulfhidrilo (SH) susceptibles de enlazar covalentemente a la superficie de la nanopartícula es uno por unidad de PDE, pero este número de grupos puede ser de orden superior. Por lo tanto, no se excluyen del marco de la presente invención otros PDE diferentes del utilizado en el modo preferido de realización que muestre uno o mas (por ejemplo, dos o tres) grupos SH susceptibles de enlazar covalentemente con la superficie de la nanopartícula.

El PDE se puede unir por otros medios a la superficie de la nanopartícula en lugar de hacerlo a través del aminoácido cisteína y de un enlace covalente, como está expresado en el modo preferido de realización de la invención. No obstante, no se excluyen del marco de la presente invención otros aminoácidos susceptibles de formar enlaces no covalentes con la superficie de la nanopartículas metálicas como pueden ser los enlaces de tipo electrostáticos que pueden formar los aminoácidos cargados positivamente o negativamente como por ejemplo la lisina o el ácido glutámico.

- El PDE utilizado en el modo preferido de realización de la invención muestra el aminoácido cisteína esta en la posición terminal. Este aminoácido es el responsable de la quimisorción del PDE a la superficie de la nanopartícula. Pero este aminoácido puede estar en cualquier parte de la estructura del PDE. Luego, no se excluye del marco de la presente invención otras posiciones para el aminoácido cisteína (por ejemplo, en cualquier otro lugar que no sea el principio o el termino de la secuencia aminoacídica del PDE) dentro de la estructura del PDE.
- 25

45

55

60

La síntesis del PDE utilizado en el modo preferido de realización de la invención se ha llevado a cabo mediante técnicas recombinantes. Sin embargo, no se excluyen del marco de la presente invención la síntesis de PDE a través de técnicas de síntesis tradicionales.

30 Las propiedades inteligentes atribuidas al PDE corresponden con sensibilidad a temperatura y pH. Sin embargo, no se excluyen del marco de la presente invención otras propiedades que pueda mostrar el PDE y que no hayan sido consideradas dentro del modo preferido de realización de la invención como son por ejemplo la modificación del estado de agregación del PDE en función de la concentración de iones del medio.

#### 35 Bibliografía

#### Referencias

1. **De** M, **Ghosh** PS, **Rotello** VM. Applications of Nanoparticles in Biology. *Advanced Materials* 2008:20(22): 4225-4241.

2. Ghosh P, Han G, De M, Kim CK, Rotello VM. Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008:60(11):1307-1315.

3. **Ghosh** SK, **Pal** T. Interparticle coupling effect on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles: From theory to applications. *Chemical Reviews* <u>2007</u>:107(11):4797-4862.

 4. Brust M, Walker M, Bethell D, Schiffrin DJ, Whyman R. SYNTHESIS OF THIOL-DERIVATIZED GOLD
50 NANOPARTICLES IN A 2-PHASE LIQUID-LIQUID SYSTEM. Journal of the Chemical Society-Chemical Communications 1994(7):801-802.

5. Brust M, Fink J, Bethell D, Schiffrin DJ, Kiely C. SYNTHESIS AND REACTIONS OF FUNCTIONALIZED GOLD NANOPARTICLES. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* <u>1995</u>(16):1655-1656.

6. Enustun BV, Turkevich J. COAGULATION OF COLLOIDAL GOLD. *Journal of the American Chemical Society* <u>1963</u>:85(21):3317-3328.

7. **Daniel** MC, **Astruc** D. Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical Reviews* <u>2004</u>:104(1):293-346.

8. Nath N, Chilkoti A. A colorimetric gold nanoparticle sensor to interrogate biomolecular interactions in real time on a surface. *Analytical Chemistry* 2002:74(3):504-509.

9. Urry DW. Physical Chemistry of Biological Free Energy Transduction As Demonstrated by Elastic Protein-Based Polymers. *Journal of Physical Chemistry B* <u>1997</u>:101(51):11007-11028.

10. Rodriguez-Cabello JC, Martin L, Alonso M, Arias FJ, Testera AM. "Recombinamers" as advanced materials for the post-oil age. *Polymer* 2009:50(22):5159-5169.

11. **Rodriguez-Cabello** JC, **Prieto** S, **Reguera** J, **Arias** FJ, **Ribeiro** A. Biofunctional design of elastin-like poly-5 mers for advanced applications in nanobiotechnology. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* 2007:18 (3):269-286.

Girotti A, Reguera J, Arias FJ, Alonso M, Testera AM, Rodríguez-Cabello JC. Influence of the molecular weight on the inverse temperature transition of a model genetically engineered elastin-like pH-responsive polymer.
*Macromolecules* <u>2004</u>:37(9):3396-3400.

13. **Reguera** J, **Fahmi** A, **Moriarty** P, **Girotti** A, **Rodríguez-Cabello** JC. Nanopore formation by self-assembly of the model genetically engineered elastin-like polymcr |(VPGVG)(2)(VPGEG)(VPGVG)(2)|(15). *Journal of the American Chemical Society* <u>2004</u>:126(41): 13212-13213.

15

14. Martin L, Alonso M, Moller M, Rodríguez-Cabello JC, Mela P. 3D microstructuring of smart bioactive hydrogels based on recombinant elastin-like polymers. *Soft Matter* 2009:5(8):1591-1593.

15. **Dreher** MR, **Simnick** AJ, **Fischer** K, **Smith** RJ, **Patel** A, **Schmidt** M, **Chilkoti** A. Temperature triggered selfassembly of polypeptides into multivalent spherical micelles. *Journal of the American Chemical Society* 2008:130 (2):687-694.

Girotti A, Reguera J, Rodríguez-Cabello JC, Arias FJ, Alonso M, Testera AM. Design and bioproduction of a recombinant multi(bio)functional elastin-like protein polymer containing cell adhesion sequences for tissue engineering purposes. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 2004:15(4):479-484.

17. **Rodríguez-Cabello** JC, **Alonso** M, **Guiscardo** L, **Reboto** V, **Girotti** A. Amplified photoresponse of a pphenylazobenzene derivative of an elastin-like polymer by alpha-cyclodextrin: The amplified Delta T-t mechanism. *Advanced Materials* 2002:14(16):1151-1154.

30

18. **Polavarapu** L, **Xu** QH. A single-step synthesis of gold nanochains using an amino acid as a capping agent and characterization of their optical properties. *Nanotechnology* 2008:19(7).

19. **Stevens** MM, **Flynn** NT, **Wang** C, **Tirrell** DA, **Langer** R. Coiled-coil peptide-based assembly of gold nanoparticles. *Advanced Materials* <u>2004</u>:16(11):915-918.

20. Zhang DM, Neumann O, Wang H, Yuwono VM, Barhoumi A, Perham M, Hartgerink JD, Wittung-Stafshede P, Halas NJ. Gold Nanoparticles Can Induce the Formation of Protein-based Aggregates at Physiological pH. *Nano Letters* 2009:9(2):666-671.

40

21. Xie JP, Zheng YG, Ying JY. Protein-Directed Synthesis of Highly Fluorescent Gold Nanoclusters. *Journal of the American Chemical Society* 2009:131(3):888-+.

22. **Murawala** P, **Phadnis** SM, **Bhonde** RR, **Prasad** BLV. *In situ* synthesis of water dispersible bovine serum albumin capped gold and silver nanoparticles and their cytocompatibility studies. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* <u>2009</u>:73(2):224-228.

23. **Opsteen** JA, **Cornelissen** J, van **Hest** JCM. Block copolymer vesicles. *Pure and Applied Chemistry* 2004:76 (7-8):1309-1319.

50

55

24. Qin SH, Geng Y, Discher DE, Yang S. Temperature-controlled assembly and release from polymer vesicles of poly(ethylene oxide)-block-poly(N-isopropylacrylamide). *Advanced Materials* 2006:18(21):2905++.

25. Chen S, Yang B, Guo C, Ma JH, Yang LR, Liang XF, Hua C, Liu HZ. Spontaneous Vesicle Formation of Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)-Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymer. *Journal of Physical Chemistry B* 2008:112(49): 15659-15665.

26. **Yan** W, **Huang** L. Recent advances in liposome-based nanoparticles for antigen delivery. *Polym Rev* 2007:47 (3):329-344.

60

27. Cheng C, Wei H, Zhu JL, Chang C, Cheng H, Li C, Cheng SX, Zhang XZ, Zhuo RX. Functionalized thermoresponsive micelles self-assembled from biotin-PEG-b-P(NIPAAm-co-HMAAm)-b-PMMA for tumor cell target. *Bioconjugate Chemistry* 2008:19(6): 1194-1201.

65 28. Sallaeh RE, Wei M, Biswas N, Conticello VP, Lecommandoux S, Dluhy RA, Chaikof EL. Micelle density regulated by a reversible switch of protein secondary structure. *Journal of the American Chemical Society* 2006:128 (36): 12014-12019.

29. Smart T, Lomas H, Massignani M, Flores-Merino MV, Perez LR, Battaglia G. Block copolymer nanostructures. *Nano Today* <u>2008</u>:3(3-4):38-46.

30. **Tokarev** I, **Minko** S. Multiresponsive, Hierarchically Structured Membranes: New, Challenging, Biomimetic Materials for Biosensors, Controlled Release, Biochemical Gates, and Nanoreactors. *Advanced Materials* 2009:21 (2):241-247.

31. Volpin D, Urry DW, Pasqualironchetti I, Gotte L. Studies by Electron-Microscopy on Structure of Coacervates of Synthetic Polypeptides of Tropoelastin. *Micron* <u>1976</u>:7(3): 193-198.

10

32. Cox BA, Starcher BC, Urry DW. Coacervation of Alpha-Elastin Results in Fiber Formation. *Biochimica Et Biophysica Acta* <u>1973</u>:317(1):209-213.

15			
20			
25			
30			
35			
40			
45			
50			
55			
60			
65			

### REIVINDICACIONES

un núcleo metálico, y

una monocapa de PDE unida químicamente al citado núcleo conteniendo la citada monocapa moléculas capaces de mostrar sensibilidad a variaciones de pH y temperatura.

10

5

2. Una nanopartícula según la reivindicación 1, donde el núcleo comprende un metal o metales seleccionados entre plata, cobre, platino, cobalto, hierro.

3. Una nanopartícula según la reivindicación 1, donde el núcleo es oro.

4. Una nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el PDE muestra una secuencia aminoacídica del tipo VPGXG, donde X puede corresponder con cualquier aminoácido.

<sup>20</sup> 5. Una nanopartícula según las reivindicaciones precedentes donde el agente estabilizador de las nanopartículas corresponde con un PDE.

6. Una nanopartícula según la reivindicación 5, donde el PDE evita la agregación de las nanopartículas de forma irreversible durante su síntesis.

<sup>25</sup> 7. Una nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la monocapa se forma por autoestructuración durante la formación del núcleo.

8. Una nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el núcleo tiene un tamaño de 500 nm o inferior, preferiblemente entre 1 y 10 nm y mas preferiblemente entre 1 y 3 nm.

9. Un método para producir una nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores hasta la presente, incluye las siguientes etapas:

a) Disolver el agente reductor en agua

b) Agitar

- c) Añadir a una disolución acuosa de PDE
- <sup>40</sup> d) Agitar

e) Añadir una disolución acuosa de HAuCU

45 f) Agitar.

10. Un método según la reivindicación 9 donde la síntesis de la nanopartícula tiene lugar en un medio único, homogéneo y acuoso.

50

- 11. Un método para producir distribuciones de nanopartículas lineales y equidistantes que muestran distancias inter-partícula análogas y mayoritariamente dentro del rango entre 40 nm y 10 nm, incluye:
  - a) todas etapas de la reivindicación 9 y además
- 55
- b) evaporar lentamente el disolvente a presión y temperatura ambiente.
- 12. Un método para producir estructuras híbridas globulares convexas de dimensiones submicrométricas constituidas de nanopartículas de oro y PDE, incluye:
  - a) todas etapas de la reivindicación 9 y además
  - b) evaporar lentamente el disolvente a baja presión y baja temperatura.

65

<sup>1.</sup> Una nanopartícula funcionalizada que comprende:

# C-[(VPGVG)<sub>2</sub>(VPGEG)(VPGVG)<sub>2</sub>]<sub>15</sub>

C= cisteína V=valina P=prolina G=glicina E=ácido glutámico

Figura 1



Figura 2



Figura 3



Figura 4



Figura 5



Figura 6



Figura 7



Figura 8



Figura 9



Figura 10



Figura 11



Figura 12



Figura 13



Figura 14



Figura 15



Figura 16



Figura 17



Figura 18



Figura 19



50 nm

Figura 20



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201000163

(2) Fecha de presentación de la solicitud: 05.02.2010

32 Fecha de prioridad:

# INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(5) Int. Cl.: **B82B1/00** (2006.01) **B82Y5/00** (2011.01)

## DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados		Reivindicaciones afectadas		
Х	ALVAREZ-RODRIGUEZ, R., ALC temperature sensitive gold cluster polymer journal. 18 de Enero de 20 todo el documento	CODRIGUEZ, R., ALONSO, M., GIROTTI, A. et al. One-pot synthesis of pH and sensitive gold clusters mediated by a recombinant elastin-like polymer. European rnal. 18 de Enero de 2010 (publicación online). Vol 46, Nº 4. ISSN 0014-3057, imento			
E	ES 2351017 A1 (UNIVERSIDAD D páginas 3,4; reivindicaciones.	E VALLADOLID) 31.01.2011,	1-10		
Х	ALVAREZ-RODRÍGUEZ, R., ARIAS, F.J., SANTOS, M. et al. Gold Tailored Photosensitive Elastin-like Polymer: Synthesis of Temperature, pH and UV-vis Sensitive Probes. Macromolecular rapid communications. 22 de Enero de 2010 (publicación online). Vol 31, Nº 6. ISSN 1521-3927, todo el documento.		1-10		
A	NATH, N., CHILKOTI, A. Interfact biopolymer adsorbed on functional resonance. Journal of the America ISSN 0002-7863, todo el documen	HILKOTI, A. Interfacial phase transition of an environmentally responsive elastin dsorbed on functionalized gold nanoparticles studied by colloidal surface plasmon burnal of the American Chemical. 2001. Vol 123, Nº 34. Páginas 8197-8202, 363, todo el documento.			
A	FUJITA, Y., MIE, M., KOBATA temperature-sensitive elastin-like p 2009. Vol 30, № 20, Páginas 3450	KE. E. Construction of nanoscale protein particle using peptide and polyaspartic acid chain. Biomaterials. 1 de Julio de -3457. ISSN 0142-9612, todo el documento.	1-12		
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 C: referido a divulgación no escrita P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentad de la solicitud E: documento anterior, pero publicado después de la fec de presentación de la solicitud					
El presente informe ha sido realizado     X   para todas las reivindicaciones     D   para las reivindicaciones nº:					
Fecha de realización del informe 28.07.2011		<b>Examinador</b> A. Barrios de la Fuente	Página 1/6		

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

B82Y, B82B

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, TXT, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, NPL

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.07.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	11,12	SI
	Reivindicaciones	1-10	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones Reivindicaciones	1-12	SI NO

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

#### Base de la Opinión.-

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

### 1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ALVAREZ-RODRIGUEZ, R., ALONSO, M., GIROTTI, A. et al. One-pot synthesis of pH and temperature sensitive gold clusters mediated by a recombinant elastin-like polymer. European polymer journal. 18 de Enero de 2010 (publicación online). Vol 46, Nº 4. ISSN 0014-3057, todo el documento	18.01.2010
D02	ES 2351017 A1 (UNIVERSIDAD DE VALLADOLID) 31.01.2011, páginas 3,4; reivindicaciones.	31.01.2011
D03	ALVAREZ-RODRÍGUEZ, R., ARIAS, F.J., SANTOS, M. et al. Gold Tailored Photosensitive Elastin-like Polymer: Synthesis of Temperature, pH and UV-vis Sensitive Probes. Macromolecular rapid communications . 22 de Enero de 2010 (publicación online). Vol 31, Nº 6. ISSN 1521-3927, todo el documento.	22.01.2010
D04	NATH, N., CHILKOTI, A. Interfacial phase transition of an environmentally responsive elastin biopolymer adsorbed on functionalized gold nanoparticles studied by colloidal surface plasmon resonance. Journal of the American Chemical. 2001. Vol 123, N <sup>o</sup> 34. Páginas 8197-8202, ISSN 0002-7863, todo el documento.	2001
D05	FUJITA, Y., MIE, M., KOBATAKE. E. Construction of nanoscale protein particle using temperature-sensitive elastin-like peptide and polyaspartic acid chain. Biomaterials. 1 de Julio de 2009. Vol 30, Nº 20, Páginas 3450-3457. ISSN 0142-9612, todo el documento.	21.07.2009

# 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 presente solicitud tiene por objeto una nanopartícula funcionalizada que comprende un núcleo metálico (Oro, plata, cobre, platino, cobalto o hierro) y una monocapa de polímero derivado de elastina (PDE) que presenta moléculas que muestran sensibilidad a pH y temperatura. El PDE muestra una secuencia aminoacidica del tipo VPGXG, donde X puede corresponder con cualquier aminoácido.

También es objeto de la presente solicitud el método para sintetizar dicha nanopartícula así como, un método para producir distribuciones de nanopartículas lineales y equidistantes dentro del rango de 10-40 nm, y un método para obtener estructuras híbridas globulares convexas de dimensiones submicrométricas.

D01 divulga nanopartículas metálicas funcionalizadas con una monocapa de PDE sensible a variaciones de pH y temperatura.

D02 y D03 divulgan nanopartículas metálicas funcionalizadas sensibles a variaciones de pH, temperatura y radiación ultravioleta visible que comprenden una monocapa de un PDE.

D04 divulga nanopartículas que comprenden un núcleo de oro funcionalizado con una monocapa auto-estructurada de ácido mercaptoundecanoico sobre el que se adsorbe un PDE.

D05 divulga partículas proteicas con un tamaño inferior a 100 nm de diámetro que comprenden un PDE sensible a variaciones de temperatura que está fusionado a una cadena de ácido poliaspártico.

### NOVEDAD (Art. 6.1, Ley 11/86)

El documentos D01 se consideran el estado de la técnica más próximos al objeto de la presenten solicitud.

D01 divulga nanopartículas funcionalizadas que comprenden un núcleo de oro y una monocapa de PDE unida químicamente al núcleo, conteniendo dicha monocapa moléculas capaces de mostrar sensibilidad a variaciones de pH y Temperatura. El PDE muestra una secuencia aminoacídica del tipo VPGXG. Las nanopartículas divulgadas tienen un tamaño inferior a 500 nm (ver página 645 y 646).

Por tanto, sobre la base de lo divulgado en D01, se considera que el objeto de las reivindicaciones 1,3-8 no es nuevo.

D02 tiene por objeto una solicitud de patente cuya fecha de presentación es anterior a la fecha de presentación de la presente solicitud. Aunque su publicación es posterior a la fecha de presentación de esta solicitud, se considera, sobre la base del artículo 6.3 de la Ley de patentes 11/86, que este documento forma parte del estado de la técnica. (Este documento se cita en el Informe sobre el estado de la técnica con la letra E).

D02 divulga nanopartículas funcionalizadas que comprenden un núcleo metálico y una monocapa de PDE unida químicamente al núcleo, conteniendo dicha monocapa moléculas capaces de mostrar sensibilidad a variaciones de pH y Temperatura. El núcleo metálico es de oro, plata, cobre, platino, cobalto o hierro. El PDE muestra una secuencia aminoacídica del tipo VPGXG, donde X puede corresponder con cualquier aminoácido. Las nanopartículas divulgadas tienen un tamaño inferior a 500 nm (ver páginas 3 y 4, y reivindicaciones 1-3, 6, 12,13).

En D02 se divulga también un método para producir dicha nanopartícula que comprende las siguientes etapas; Disolver el agente reductor en agua, agitar, añadir dicha disolución al PDE, agitar, añadir una disolución acuosa de HAuCl4 y agitar. La síntesis de la nanopartícula se lleva a cabo en medio único, homogéneo y acuoso (ver página 4, línea 33 y reivindicación 11).

Por lo tanto, sobre la base de lo divulgado en D02, se considera que el objeto de las reivindicaciones 1-10 no es nuevo.

D03 divulga nanopartículas funcionalizadas que comprenden un núcleo de oro y una monocapa de PDE unida químicamente al núcleo, conteniendo dicha monocapa moléculas capaces de mostrar sensibilidad a variaciones de pH y Temperatura. El PDE muestra una secuencia aminoacídica del tipo VPGXG. Estas nanopartículas presentan un tamaño inferior a 500 nm (ver página 2 y 3).

Por lo tanto, sobre la base de lo divulgado en D03, el objeto de las reivindicaciones 1, 3-8 no es nuevo.

En conclusión, y teniendo en cuenta lo divulgado en los documentos D01, D02 y D03 el objeto de las reivindicaciones 1-10 no es nuevo en el sentido del artículo 6 de la Ley de Patentes 11/86.

#### ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 de la Ley 11/86)

#### REIVINDICACIÓN 2

En los documentos D01 y D03, se divulgan nanopartículas con núcleos de Oro, pero no se menciona la posibilidad de que este núcleo pueda ser de otro metal distinto. No obstante, el uso de metales seleccionados entre plata, cobre, platino, cobalto o hierro para la fabricación de nanopartículas representa una alternativa conocida en el estado de la técnica (ver D02) y por tanto evidente para un experto en la materia. Por lo tanto, se considera que el objeto de la reivindicación 2 no implicaría actividad inventiva para un experto en la materia.

### **REIVINDICACIONES 9-12**

D01 divulga un método de síntesis de nanopartículas muy similar al que es objeto de la reivindicación 9.

La diferencia principal entre el método objeto de reivindicación 9 y el divulgado en D01, tiene que ver con el orden en el que se añaden los distintos reactivos. Así, en el método objeto de la reivindicación 9, sobre la disolución acuosa del reductor se añade el PDE y por último el HAuCl4, mientras que en D01 en primer lugar se mezcla la disolución acuosa de PDE con HAuCl4 y se añade posteriormente la disolución acuosa del reductor.

Esta diferencia no parece ser crítica en la medida en que el resultado obtenido por los dos procedimientos es el mismo. Teniendo en cuenta que tampoco se indica en la descripción que exista un efecto técnico sorprendente derivado de esta diferencia, se considera que el método objeto de la reivindicación 9 es una posible alternativa al método divulgado en D01, que además ya se encuentra anticipada en el estado de la técnica (ver D02). Por lo tanto, sobre la base de lo divulgado en D01 se considera que el objeto de las reivindicaciones 9 y 10 no implicaría actividad inventiva para un experto en la materia. En lo que respecta al objeto de las reivindicaciones 11 y 12, se divulga en D01 que las nanopartículas obtenidas adoptan distribuciones lineales y equidistantes que muestran distancias inter-partícula análogas y dentro del rango de 10-40 nm, siendo estas distribuciones visibles por microscopía tras someter la muestra a evaporación lenta del disolvente a presión y temperatura ambiente. Igualmente se divulga que las nanopartículas, que han sido sometidas a un proceso de liofilización, presentan una estructuras globulares convexas (ver página 646).

Por tanto, teniendo en cuenta lo divulgado en D01, y puesto que las reivindicaciones 9 y 10 no implican actividad inventiva tal y como se ha expuesto anteriormente, se considera, igualmente, que el objeto de las reivindicaciones 11 y 12 no presenta actividad inventiva para un experto en la materia.

En relación al documento D03, en este documento se divulga un método de síntesis de nanopartículas en el que los reactivos utilizados son los mismos que los del método objeto de la reivindicación 9, sin embargo no se indica el orden en el que estos se van adicionando. No obstante, y sobre la base de lo expuesto anteriormente, se considera que el objeto de la reivindicación 9 y 10 no implicarían actividad inventiva para un experto en la materia a la luz de lo divulgado en D03.

En conclusión, y a la luz de las enseñanzas técnicas de D01 y D03, se considera que el objeto de las reivindicaciones 2, 9 y 10-12 no implicaría actividad inventiva para un experto en la materia en el sentido del artículo 8.1 de la Ley de Patentes 11/86.