



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 536**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/00** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

**C12Q 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06820366 .0**

96 Fecha de presentación : **29.11.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1957038**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.08.2008**

54

Título: **Partículas.**

30

Prioridad: **29.11.2005 GB 0524313**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**06.10.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**06.10.2011**

73

Titular/es: **IMPERIAL INNOVATIONS LIMITED**  
**52 Princes Gate Exhibition Road**  
**London SW7 2PG, GB**

72

Inventor/es: **Stevens, Molly M.;**  
**Ulijn, Rein;**  
**Laromaine, Sagué Anna y**  
**Koh, Liling**

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 365 536 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

## Partículas

La presente invención se refiere a partículas. Más concretamente, se refiere al desensamblaje y/o al ensamblaje selectivo de agregados de nanopartículas como respuesta a enzimas. En ciertos aspectos, el desensamblaje de agregados de nanopartículas como respuesta a enzimas se usa en el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades.

Recientemente, se han hecho grandes esfuerzos por investigar el ensamblaje y desensamblaje controlados de nanopartículas inorgánicas para generar nuevos materiales y dispositivos potencialmente útiles para la detección, la catálisis, el transporte y otras aplicaciones en Medicina e Ingeniería (Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 4128). Estos nano-materiales ajustables y/o conmutables pueden tener ciertas aplicaciones médicas, tales como la biodetección y la administración de fármacos. Para tales aplicaciones, sería valiosa la capacidad de ensamblar y desensamblar dinámicamente tales estructuras, como la producida por condiciones ambientales fisiológicamente accesibles (Stevens, *et al, advanced Materials*, 2004 16, 915). Hay estudios previos que han descrito el uso de sistemas de ADN de reconocimiento biomolecular muy específicos, el sistema de estreptavidina/biotina y sistemas de anticuerpo/antígeno para dirigir el (des)ensamblaje de nanopartículas (Mirkin, *et al, Nature* 1996, 382, 607; Rosi y Mirkin, *Chem. Rev.*, 2005, 105, 1547–1562; Katz y Willner, *Angewandte Chemie*, 2004, 43, 6042–6108). Estos sistemas tienen un enorme potencial como herramientas de diagnóstico, pues son sensibles, dan una respuesta rápida, no dependen de un equipamiento especializado y son compatibles con las condiciones biológicas. Los estímulos que se pueden usar para (des)ensamblar nanoestructuras incluyen la temperatura, la polaridad del disolvente, la concentración iónica (incluyendo el pH), campos eléctricos o magnéticos ligeros. Estos estímulos habitualmente afectan al microambiente y, por tanto, no siempre son compatibles con los fluidos biológicos. La mayoría de las interacciones biológicas sólo pueden soportar fluctuaciones ambientales bastante ligeras.

Recientemente, se ha descrito una serie de sistemas que aprovechan la acción catalítica de las enzimas para controlar el estado ensamblado de las nanopartículas con aplicaciones en biodetección. En estos sistemas, se modifica la superficie de las nanopartículas con moléculas sensibles a enzimas que pueden formar interacciones covalentes o no covalentes con grupos ligados situados sobre nanopartículas vecinas. Cuando lo desencadena una enzima, se puede producir el ensamblaje o desensamblaje de nanopartículas. Zhao *et al* usaron un enfoque con nanopartículas magnéticas como interruptores magnéticos de relajación para detectar la actividad proteasa (Zhao, *et al, Angew. Chem., Int. Ed.*, 2003, 42, 1375–1378). En este enfoque, las secuencias sensibles a la proteasa estaban flanqueadas en ambos terminales por moléculas de biotina, mientras que las nanopartículas estaban revestidas de avidina. En este enfoque, la acción enzimática es seguida por la adición separada de nanopartículas. Como tal, actualmente no se presta a una monitorización en tiempo real de la acción enzimática. Kanaras *et al.* demostraron que es posible usar una serie de enzimas de restricción y unión del ADN para ensamblar diferentes poblaciones de nanopartículas de oro revestidas de ADN (Kanaras, *et al, Angew. Chem., Int. Ed.*, 2003, 42, 191–194). En este enfoque, se necesitan dos o más poblaciones separadas de nanopartículas. En el documento WO 02/098364, Manuel Perez *et al.*, *Nature Biotechnology*, 2002, 20, 816–820 y en Manuel Perez *et al.*, *Chem BioChem* 2004, 5, 261–264, se describen más conjugados de nanopartículas magnéticas. El documento WO 2005/100602 describe un ensamblaje de nanopartículas que comprende conectores de polinucleótidos. Chang *et al.*, “Biochemical and Biophysical Research Communications”, 334 (2005), 1317–1321 revela sondas de puntos cuánticos activadas por proteasas.

Los presentes inventores han descubierto una estrategia para el ensamblaje/desensamblaje reversible de agregados de nanopartículas que es producido por reacciones enzimáticas y, por tanto, se puede aplicar a fluidos biológicos.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un agregado de nanopartículas que comprende nanopartículas ligadas a otras nanopartículas indirectamente por medio de un resto de unión de fluorenil–metoxi–carbonilo (Fmoc), en el que las nanopartículas están ligadas al resto de unión de Fmoc mediante conectores peptídicos que son capaces de ser escindidos por una enzima proteasa, en el que la escisión de los conectores peptídicos por la enzima proteasa da como resultado un resto de repulsión que se revela sobre las nanopartículas, que aumenta el desensamblaje del agregado de nanopartículas debido a la repulsión entre los restos de repulsión.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para formar un agregado de nanopartículas del primer aspecto que comprende: ligar nanopartículas a otras nanopartículas indirectamente por medio de un resto de unión de fluorenil–metoxi–carbonilo (Fmoc), en el que las nanopartículas son ligadas al resto de unión de Fmoc mediante conectores peptídicos que son capaces de ser escindidos por una enzima proteasa para dejar ver un resto de repulsión.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una nanopartícula acoplada a un resto de unión de fluorenil–metoxi–carbonilo (Fmoc) mediante un conector peptídico que puede ser escindido por una enzima proteasa para dejar ver un resto de repulsión.

La escisión del conector por parte de la enzima puede ser reversible o irreversible. Las características preferidas de cada aspecto de la invención se exponen en la presente memoria en las reivindicaciones dependientes.

La presente invención se describirá más detalladamente con referencia a las figuras no restrictivas anexas, en las que:

5 La Figura 1 ilustra un agregado de partículas según la presente invención y cómo puede ser desagregado por una proteasa, la termolisina;

la Figura 2a es una imagen de microscopio electrónico de transmisión de un agregado de nanopartículas ensambladas según la presente invención y la Figura 2b es una imagen de microscopio electrónico de transmisión del agregado de nanopartículas tras la exposición a una enzima;

10 la Figura 3 ilustra dos enfoques diferentes para el desensamblaje enzimático de las nanopartículas. El Enfoque 1 es según la presente invención y el Enfoque 2 no es según la presente invención;

la Figura 4 ilustra cómo se puede usar el ensamblaje y desensamblaje de agregados de nanopartículas según la presente invención para rastrear la especificidad de las enzimas;

la Figura 5 ilustra las constantes de equilibrio del ensamblaje reversible de nanopartículas según la invención;

15 la Figura 6 es una tabla que describe las proteasas implicadas en la cicatrización de heridas;

la Figura 7A ilustra un agregado de nanopartículas según la presente invención y cómo puede ser desensamblado por una proteasa, la termolisina; la Figura 7B es una imagen de microscopio electrónico de transmisión (TEM) de 8,5 nm de nanopartículas de oro a un pH 8 tras la funcionalización con el péptido 1 según lo descrito en el ejemplo de la presente memoria; y la Figura 7C es la imagen de TEM correspondiente tras la adición de la termolisina;

20 la Figura 8A muestra los espectros UV–visible de oro de Fmoc–Gly–Phe–Cys–NH<sub>2</sub> (línea continua) antes de la adición de enzima y oro de <sup>19</sup>Phe–Cys–NH<sub>2</sub> a las 6 h (línea discontinua) de la adición de termolisina 7,2nM; la Figura 8B es una gráfica de espectros UV–visible que muestra las superficies de la curva que fueron calculadas para todas las muestras; la Figure 8C es una gráfica que representa la  $\Delta$  proporción de A/D en intervalos de 5 min para concentraciones 7,2nM y 1nM de termolisina; y la Figura 8D es una gráfica que representa  $\{(\Delta \text{ proporción de A/D}) / \Delta t\}$  a las 2 h frente a  $-\log [\text{termolisina}]$ ; y

25 la Figura 9 es una gráfica que representa el porcentaje del cambio de la intensidad frente al tiempo cuando se añaden 0,45 ng/ml (línea continua) y 1 ng/ml (línea discontinua) de Antígeno Prostático Específico (APE) a un agregado de nanopartículas de oro que se mantiene unido por un péptido capaz de ser escindido por el APE.

30 En la presente invención, las enzimas se usan para controlar la unión entre las partículas y, por tanto, median en el desensamblaje y/o ensamblaje de los agregados de partículas. Las enzimas presentan considerables ventajas frente a los procedimientos químicos convencionales en cuanto a que:

- son excepcionalmente quimio-, regio- y enantioselectivas;
- funcionan en condiciones suaves (p.ej., acuosas, pH 5–8);
- pueden catalizar reacciones cerca de superficies *in vivo* y, por tanto, están bien dotadas para catalizar reacciones en interfases (Castner y Ratner, *Surface Science*. 2002, 500, 28);
- sus reacciones son reversibles en condiciones apropiadas, pudiéndose ajustar el sentido favorable en las superficies (de hecho, recientemente, se ha demostrado que tanto las lipasas como las proteasas se pueden usar para la “hidrólisis en sentido inverso”, i.e., acoplamiento de aminas o alcoholes a ácidos carboxílicos en superficies en condiciones apropiadas (Doezé, *et al, Chem., Int. Ed Eng.* 2004 43, 3138; Ulijn, *et al, J. Am. Chem. Soc.* 2002 124, 10988; Humphrey, *et al, J. Am. Chem. Soc.* 2002 125, 13952; Ulijn, *et al, Org Biomol. Chem.* 2003 1, 1277);
- con las técnicas modernas de Biología Molecular, hay disponible un amplio espectro de enzimas con diferentes selectividades;
- desempeñan papeles fundamentales en procesos celulares esenciales y en estados patológicos y, por tanto, los materiales sensibles a estas enzimas son de interés para los diagnósticos y la administración de fármacos sensibles a enzimas.

45 Se ha demostrado que las enzimas pueden ser activas cerca de superficies a las que se hayan incorporado conectores no contaminantes tales como polietilenglicol (PEG) (Doezé, *et al, Chem, Int. Ed. Eng.* 2004 43, 3138;

Ulijn, *et al*, *J. Am. Chem. Soc.* 2002 124, 10988; Bosma, *et al*. *Chem. Commun.*, 2003 2190–2791; Humphrey, *et al*, *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 125, 13952.; Ulijn, *et al*, *Org Biomol. Chem.* 2003, 1, 1277; Ulijn, *et al* *J. Chem Soc., Perkin Trans. 2*, 2002, 1024; Mrksich, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2002; 6, 794; Tirrell, *et al*, *Surface Science* 2002, 500, 61). Cuando se usan nanopartículas, la necesidad de conectores no contaminantes puede ser menor debido a una

5 disminución de la adsorción de proteínas inespecíficas con una mayor curvatura superficial (Vertegel, *et al*, *Langmuir*, 2004, 20, 6800–6807). También se ha demostrado que las enzimas pueden interactuar con nanopartículas y grupos funcionales ligados a la superficie sin pérdida de actividad o estructura plegada (Shenar y Rotello, *Acc. Chem. Res.* 2003, 36, 549).

10 Los conectores peptídicos pueden ser ligados covalentemente a la partícula. Alternativamente, pueden ser unidos al conector por medio de interacciones no covalentes, tales como enlaces iónicos, interacciones hidrófobas, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, enlaces dipolo–dipolo e interacciones pi–pi.

15 Los conectores peptídicos adecuados para su uso en la presente invención son aquellos que son capaces de ser escindidos, específicamente o inespecíficamente, por una enzima proteasa, tales como una hidrolasa. Las hidrolasas tienen la capacidad de escindir (o acoplar) una variedad de moléculas a superficies apropiadas con una alta selectividad, permitiendo controlar selectivamente el desensamblaje y/o ensamblaje de agregados de nanopartículas.

20 Aproximadamente el 2–3% del proteoma mamífero está constituido por proteasas: enzimas que hidrolizan proteínas y péptidos (Rawlings, *et al*, *Nucleic Acids Res.* 2002, 30, 343). Muchas de estas enzimas están implicadas en funciones fisiológicas esenciales, tales como la defensa inmunológica y la diferenciación celular. Hay varias proteasas que participan en estados patológicos, tales como el VIH, la enfermedad de Alzheimer, la Hepatitis C, la candidiasis y la pancreatitis (Maly, *et al*, *ChemBioChem* 2002, 3, 16; Davis, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 2002, 99, 2222–2227). Los materiales producidos por estas enzimas permiten su detección exacta y su cuantificación directamente en fluidos biológicos y además pueden permitir la administración localizada de fármacos en el lugar en el que se necesite el fármaco.

25 Los conectores peptídicos adecuados pueden comprender 2, 3, 4, 5, 6 o más aminoácidos. Los conectores que tienen aproximadamente 6 aminoácidos pueden ser particularmente útiles, pues muchas enzimas reconocen 3 aminoácidos a ambos lados del sitio de escisión.

30 Los ejemplos de proteasas incluyen proteasas serina (tales como tripsina, proteinasa alfa–I, quimiotripsina, trombina), proteasas treonina, proteasas cisteína (tales como papaína, catepsina B, enzima convertora de la interleucina–1–beta (ICE)), proteasas de ácido aspártico (tales como plasmepsina y proteasa de VIH–1), metaloproteasas (tales como termolisina) y proteasas de ácido glutámico. En la Figura 6, se describen otras proteasas.

35 En la presente invención, la escisión del conector por la enzima da como resultado un resto de repulsión que se revela sobre las partículas (bien directamente sobre la partícula o sobre la parte del conector que queda sobre la partícula tras la escisión) que aumenta el desensamblaje del agregado debido a la repulsión entre los restos de repulsión. El resto de repulsión puede ser un resto cargado (negativo o positivo) que repela a otros restos tales

40 mediante repulsión electrostática. El resto cargado puede estar cargado positivamente y puede ser una amina, de manera que la escisión del conector cree partículas catiónicas que se repelan entre sí. Se puede aumentar el efecto proporcionando conectores peptídicos zwitteriónicos con aminoácidos con carga opuesta en cualquier lado del enlace escindible. Otros medios para inducir la dispersión podrían incluir la retirada de interacciones de atracción, tales como interacciones pi–pi (mediante el uso de aminoácidos aromáticos u otras moléculas aromáticas). También se puede hacer uso de la retirada de grupos hidrófobos o de puentes de hidrógeno para conseguir la repulsión. En la invención, se usan nanopartículas. Las nanopartículas son partículas cuyo tamaño se mide en nanómetros, incluyendo nanotubos y nanovarillas (en las que el ancho de las mismas está en el intervalo de los nanómetros). Las nanopartículas pueden tener un tamaño de menos de 50 nm y el tamaño puede estar en el intervalo de 10 nm a 100

45 nm. Un ejemplo de nanopartículas adecuadas para su uso en la presente invención es el de nanopartículas de oro.

Según lo mencionado anteriormente, las nanopartículas son ligadas indirectamente por medio de un resto de unión de Fmoc, i.e., las nanopartículas son ligadas al resto de unión por el conector y los restos de unión se unen entre sí.

50 La Figura 1 ilustra cómo se puede desensamblar un agregado de partículas según la presente invención mediante una proteasa, la termolisina. Se acopla una partícula (en este caso, una nanopartícula de oro) a un grupo Fmoc por medio de un conector (en este caso, un péptido). La hidrofobicidad de los grupos Fmoc en solución acuosa les hace atraerse entre sí formando un agregado de partículas. Sin embargo, cuando se expone el agregado a una enzima (en este caso, a la proteasa termolisina), se rompen los conectores y se dispersa el agregado de partículas. Esta dispersión se puede medir espectrofotométricamente usando un espectroscopio UV–visible o un microscopio electrónico de transmisión (TEM) (Figura 2).

55 La Figura 3 (Enfoque 1) ilustra un agregado de nanopartículas según la presente invención. En este caso, se

modifica una sola población de partículas con péptidos que contienen cisteína que tienen un conector escindible por proteasa y un grupo Fmoc. Tras la escisión enzimática del conector peptídico, se retira el grupo hidrófobo y se revela la carga positiva (amina), produciéndose así el desensamblaje mediante repulsión electrostática entre las partículas catiónicas.

5 La Figura 3 (Enfoque 2) ilustra un agregado de partículas que no es según la presente invención, porque las partículas están ligadas directamente a otras partículas mediante los conectores. Se usan dos poblaciones diferentes de partículas modificadas por péptidos, cada una de las cuales está modificada con péptidos que contienen cisteína, y son ensambladas a las partículas bien por el terminal C o el terminal N. Estas partículas modificadas forman elementos constitutivos de un sistema reversible. Una proteasa adecuada que es capaz de reconocer las secuencias peptídicas ensamblará o desensamblará reversiblemente estas partículas mediante una reacción de hidrólisis reversible. La posición de equilibrio entre el material peptídico y las partículas individuales dependerá de factores tales como la fuerza iónica y el pH del medio, y de la presencia de codisolventes orgánicos, y puede ser ajustable.

15 Aunque la hidrólisis de los enlaces de tipo amida de péptidos se observa en soluciones acuosas diluidas, se ha demostrado la acción inversa, i.e., el acoplamiento de aminoácidos a péptidos sintéticos, en la interfase de sólido/líquido. Este descubrimiento permite la síntesis eficiente de péptidos directamente sobre la fase sólida catalizada por una proteasa que se podría aplicar al rastreo de la especificidad de la proteasa. La Figura 4 ilustra cómo se pueden usar las proteasas para acoplar aminoácidos marcados fluorescentemente (Fmoc) solubles (AA<sub>1</sub>) a aminoácidos inmovilizados en una superficie (AA<sub>2</sub>) en una reacción de "hidrólisis inversa", usando un formato de microdisposición para medir la preferencia de una proteasa por los aminoácidos, i.e., se observa una señal fluorescente sólo cuando la proteasa que se esté rastreando sea capaz de formar un enlace peptídico entre los aminoácidos inmovilizados en la superficie (AA<sub>2</sub>) y los aminoácidos marcados fluorescentemente (Fmoc) solubles (AA<sub>1</sub>). De igual manera, se podría invertir la hidrólisis de ésteres catalizada por lipasas para sintetizar ésteres sobre un soporte sólido. Estas observaciones indican que se pueden emplear hidrolasas tanto para la hidrólisis como para las reacciones de acoplamiento cuando los ligandos están ligados a un soporte sólido.

25 La presente invención se puede usar en el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades. El desensamblaje de un agregado de partículas puede indicar la presencia de una determinada enzima y, por consiguiente, servir para diagnosticar una enfermedad o afección. Por lo tanto, en otros aspectos, la presente invención proporciona un agregado de partículas del primer aspecto o una nanopartícula del tercer aspecto para su uso en medicina. La presente invención también proporciona el uso de un agregado de partículas del primer aspecto o de una nanopartícula del tercer aspecto en la elaboración del diagnóstico de una enfermedad o afección asociadas con la enzima. Por ejemplo, es posible diagnosticar el cáncer de próstata detectando el antígeno prostático específico (APE) mediante la presente invención. Con el uso de partículas que incluyan un conector que sea escindido específicamente por el APE (tal como, por ejemplo, SSFYSGGGC), se puede detectar el APE mediante la monitorización de la dispersión de un agregado según la invención.

35 Es posible monitorizar el desensamblaje del agregado de partículas mediante el cambio de color en disolución. También se puede monitorizar salpicando la solución en una placa de CCF para ver una mancha roja o azul (detección de alto rendimiento o podría ser accesible a un simple kit de diagnóstico *in vitro* usado en un hospital o una clínica de medicina general).

40 Además, el desensamblaje de un agregado de partículas según la presente invención realizado por una enzima se puede usar para la administración de fármacos. Así pues, es posible retener un fármaco en un agregado de nanopartículas de la invención, de manera que sólo se libere cuando el agregado de nanopartículas entre en contacto con una enzima en la zona de una enfermedad, y la enzima provoque el desensamblaje del agregado. Por lo tanto, la presente invención también proporciona:

45 el uso de un agregado de nanopartículas que comprende nanopartículas ligadas a otras nanopartículas indirectamente mediante un resto de unión de fluorenil-metoxi-carbonilo (Fmoc), en el que las nanopartículas están ligadas al resto de unión de Fmoc mediante conectores peptídicos que son capaces de ser escindidos por una enzima proteasa para dejar ver un resto de repulsión y un fármaco, en el que el fármaco es retenido en el agregado hasta que los conectores peptídicos son escindidos por la enzima proteasa, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con la enzima proteasa.

50 Como se menciona anteriormente, se sabe que hay varias proteasas implicadas en estados patológicos, incluyendo VIH, la enfermedad de Alzheimer, Hepatitis C, candidiasis, pancreatitis, cáncer, inflamación y cicatrización de heridas.

55 Los medicamentos según la invención serán habitualmente suministrados como parte de una composición farmacéutica estéril que normalmente incluirá un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esta composición farmacéutica puede estar en cualquier forma adecuada (en función del procedimiento deseado de administración a un paciente). Se puede proporcionar en una forma de dosificación unitaria; generalmente se proporcionará en un

recipiente cerrado herméticamente y se puede proporcionar como parte de un kit. Tal kit incluiría normalmente (aunque no necesariamente) instrucciones de uso. Puede incluir una pluralidad de dichas formas de dosificación unitarias.

5 La composición farmacéutica se puede adaptar a la administración por cualquier vía apropiada, por ejemplo, por la vía oral (incluyendo bucal o sublingual), rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal, sublingual o transdérmica), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica). Tales composiciones se pueden preparar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica de la Farmacia, por ejemplo, mezclando el ingrediente activo con el o los vehículos o excipientes en condiciones estériles.

10 Las composiciones farmacéuticas adaptadas a una administración oral se pueden presentar como unidades diferenciadas tales como cápsulas o comprimidos; como polvos o gránulos; como soluciones, jarabes o suspensiones (en líquidos acuosos o no acuosos; o como espumas o batidos comestibles; o como emulsiones). Los excipientes adecuados para comprimidos o cápsulas de gelatina dura incluyen lactosa, almidón de maíz o derivados del mismo, ácido esteárico o sales del mismo. Los excipientes adecuados para su uso con cápsulas de gelatina blanda incluyen, por ejemplo, aceites vegetales, ceras, grasas, polioles semisólidos o líquidos, etc.

15 Para la preparación de soluciones y jarabes, los excipientes que se pueden usar incluyen, por ejemplo, agua, polioles y azúcares. Para la preparación de suspensiones, se pueden usar aceites (p.ej., aceites vegetales) para proporcionar suspensiones de aceite en agua o de agua en aceite. Las composiciones farmacéuticas adaptadas a una administración transdérmica se pueden presentar como parches diferenciados destinados a permanecer en contacto directo con la epidermis del receptor durante un periodo de tiempo prolongado. Por ejemplo, el ingrediente activo se puede administrar desde el parche mediante iontoforesis, tal y como se describe en términos generales en "Pharmaceutical Research", 3(6):318 (1986). Las composiciones farmacéuticas adaptadas a una administración  
20 tópica se pueden formular como pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, pulverizados, aerosoles o aceites. Para las infecciones oculares o de otros tejidos externos, por ejemplo, de la boca y de la piel, las composiciones se aplican preferiblemente como una pomada o una crema tópica. Cuando se formulan en una pomada, el ingrediente activo se puede emplear bien con una base de parafina o de pomada hidromiscible. Alternativamente, el ingrediente activo se puede formular en una crema con una base cremosa de aceite en agua o una base de agua en aceite. Las composiciones farmacéuticas adaptadas a una administración tópica en el ojo incluyen gotas oculares en las que el ingrediente activo está disuelto o suspendido en un vehículo adecuado, especialmente, un disolvente acuoso. Las composiciones farmacéuticas adaptadas a una administración tópica en la  
25 boca incluyen píldoras, pastillas y enjuagues bucales.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas a una administración rectal se pueden presentar como supositorios o enemas. Las composiciones farmacéuticas adaptadas a una administración nasal en la que el vehículo es un sólido incluyen un polvo de grano grueso que tiene un tamaño de partícula, por ejemplo, en el intervalo de 20 a 500 micrómetros, que se administra de manera que se haga una aspiración, i.e. mediante la inhalación rápida por la fosa nasal del polvo contenido en un recipiente sostenido cerca de la nariz. Las composiciones adecuadas en las que el vehículo es un líquido para su administración como un pulverizado nasal o como gotas nasales incluyen soluciones acuosas u oleaginosas del ingrediente activo. Las composiciones farmacéuticas adaptadas a una administración por inhalación incluyen polvos o vaporizaciones de partículas finas que se pueden generar por medio de diversos tipos de aerosoles presurizados dosificadores, nebulizadores o insufladores. Las composiciones farmacéuticas adaptadas a una administración vaginal se pueden presentar como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverizado. Las composiciones farmacéuticas adaptadas a una administración parenteral incluyen solución de inyección estéril acuosa y no acuosa que puede contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos que vuelven la formulación sustancialmente isotónica con la sangre del receptor; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes de espesamiento. Los excipientes que se pueden usar para las soluciones inyectables incluyen, por ejemplo, agua, alcoholes, polioles, glicerina y aceites vegetales. Las composiciones se pueden presentar en recipientes monodosis o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales cerrados herméticamente, y se pueden almacenar en estado criodesecado (liofilizado) que sólo requiera la adición del líquido estéril portado, por ejemplo, de agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Se pueden preparar soluciones y suspensiones extemporáneas para inyección a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos.  
30

Las composiciones farmacéuticas pueden contener agentes conservantes, agentes disolventes, agentes estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, aromatizantes, sales (las propias sustancias de la presente invención se pueden proporcionar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable), tampones, agentes de revestimiento u antioxidantes. También pueden contener agentes terapéuticamente activos además de la sustancia de la presente invención.  
35

Las dosis de las sustancias de la presente invención pueden variar entre amplios límites en función de la enfermedad o del trastorno que se vaya a tratar, de la edad y del estado del individuo que se vaya a tratar, etc. y, en última

instancia, el médico será quien determine las dosis apropiadas para su uso. Las dosificaciones se pueden repetir, como es habitual, según lo apropiado. Si aparecen efectos secundarios, se puede reducir la cantidad y/o la frecuencia de la dosis según la práctica clínica normal.

5 Los agregados de nanopartículas de la presente invención se pueden usar para analizar la presencia de enzimas en muestras acuosas. Si una enzima que está siendo detectada es específica de un determinado microorganismo, tal como de *E. coli*, el análisis indicará la presencia de ese microorganismo. Así pues, se podría analizar indirectamente una disposición de enlaces de partícula–conector–“aglutinante” que sean específicos de ciertas enzimas de retardo de microorganismos. Un ejemplo en el que se podría usar tal ensayo es en el análisis de la calidad del agua potable. Por ejemplo, la  $\beta$ -D–glucuronidasa puede indicar la presencia de *E. coli*; la  $\beta$ -D–galactosidasa y la  $\beta$ -D–glucosidasa se pueden usar para detectar la respuesta de coliformes y enterococos, que son indicadores de actividad microbiológica en el agua (véase Manafi, OECD Worksop Molecular Methods for Safe Drinking Water, Interlaken '98, 1–16).

15 A continuación, se describirán modos más específicos, pero no restrictivos, en los que la invención se puede llevar a cabo y usar. Se pueden inmovilizar conectores peptídicos sobre la superficie de nanopartículas de oro como se explica a continuación.

Se usan diferentes poblaciones de nanopartículas (NP) de oro que varían de 10 nm a 50 nm, pero que no se limitan a este intervalo de tamaños. Las partículas primero se estabilizan, por ejemplo, formando un complejo con bis(p–sulfonatofenil)fenilfosfino di–potasio deshidratado.

20 Se sintetizan péptidos con residuos de cisteína terminales (bien en el terminal N o C de la cadena peptídica) y se añaden a soluciones de nanopartículas de oro (TedPella, Redding, CA) para permitir que los grupos de azufre de los residuos de cisteína se unan directamente a la superficie de oro. Se monitoriza la eficiencia del acoplamiento de péptido/nanopartícula separando las NP de la solución mediante una centrifugación suave, entonces se sigue la disminución de la concentración de péptidos solubles mediante cromatografía en fase líquida de alta resolución (CLAR) y espectroscopia UV–Visible. Además, se emplea una espectroscopia de infrarrojos (IR) para medir y cuantificar la presencia de amidas en la superficie, como recientemente demostraron Shenar y Rotello, *Acc. Chem. Res.* 2003, 36, 549. Los péptidos se sintetizan bien manualmente o usando un sintetizador automático de péptidos, usando estrategias con Fmoc que son ampliamente conocidas en la técnica.

30 Para el Enfoque 1 expuesto en la Figura 3, se sintetiza Fmoc–Phe–Phe–Gly–Cys–NP, pues estos péptidos modificados serán escindidos por la termolisina de *B. thermoproteolyticus* Rokko. Para el Enfoque 2 expuesto en la Figura 3 (no según la invención), se preparan tanto NP–Cys–Gly–Gly como Phe–Gly–Cys–NP como un sustrato para la termolisina. La termolisina es una enzima muy estable que prefiere hidrolizar (o sintetizar en función del equilibrio de su reacción) enlaces peptídicos en el terminal N de aminoácidos hidrófobos y es bastante inespecífica para los aminoácidos C–terminales. Primero se acoplan químicamente nanopartículas de oro que portan aminoácidos inmovilizados C– y N–terminalmente para producir el material inicial ensamblado. El acoplamiento químico de las nanopartículas se lleva a cabo en dimetilformamida (DMF) usando agentes de acoplamiento convencionales de hidroxibenzotriazol/diisopropilcarbodiimida. Inicialmente, se usa una mezcla (1:1) de NP–Cys–Gly–Gly y Phe–Gly–Cys–NP. Se evalúa la eficiencia del acoplamiento químico usando una microscopía electrónica de transmisión (TEM) y una espectroscopia de IR. Las estructuras de nanopartículas ensambladas químicamente se aíslan del medio de reacción mediante una centrifugación suave y se vuelven a suspender en solución tamponada.

40 Para analizar si las enzimas proteolíticas pueden escindir péptidos que están ligados a nanopartículas, se inmovilizan oligopéptidos con terminales de Fmoc sobre NP según lo descrito anteriormente siguiendo el enfoque 1. Los péptidos constan de secuencias que son conocidas por ser escindidas por termolisina (p.ej., se espera escindir Fmoc–Phe–Phe–Gly–Cys–termolisina entre los residuos de Phe). Se exponen las NP modificadas a la termolisina durante cantidades variables de tiempo, luego se centrifugan las suspensiones de NP y se analiza el sobrenadante mediante CLAR en cuanto a la presencia de los Fmoc–Phe escindidos. Los controles implican péptidos D que no deberían ser escindidos enzimáticamente (Ulijn, *et al*, *J. Am. Chem. Soc.* 2002 124, 10988).

50 Se pueden usar conectores de glicina de diferentes longitudes para medir la longitud óptima de los conectores. La poliglicina aporta una flexibilidad configuracional óptima y se puede acoplar de manera sencilla usando una síntesis en fase sólida. Se puede comparar con Fmoc–Phe–Phe–(Gly)<sub>n</sub>–Cys con n = 3, 5, 10 residuos de glicina. Como experimento de control, se usan nanopartículas modificadas con Fmoc–(D)Phe–Phe–(Gly)<sub>n</sub>–Cys. Aquí no se debería observar ninguna hidrólisis enzimática y, por tanto, ningún desensamblaje de nanopartículas, pues la termolisina reconoce exclusivamente aminoácidos L. Se realiza una TEM de los ensamblajes de nanopartículas inicial y final.

55 Con el Enfoque 1 anteriormente descrito, se pueden cuantificar las concentraciones enzimáticas usando un ensayo colorimétrico. A los pocillos individuales de una placa de 96 pocillos que contiene cantidades optimizadas de nanopartículas peptídicas agregadas, se añaden diferentes concentraciones de termolisina (aunque se podría usar cualquier enzima que esté siendo analizada con un conector apropiado) y se mide la respuesta cinética en tiempo

real con un lector de placas colorimétrico aprovechando el desplazamiento que tiene lugar en el pico de resonancia del plasmón superficial de los espectros UV-Visible.

Con el Enfoque 2 anteriormente descrito (no según la invención), se seleccionan condiciones (concentración enzimática, pH, fuerza iónica) que permitan el seguimiento en tiempo real de la agregación de nanopartículas usando espectroscopia UV-Visible. A medida que se agregan las nanopartículas y forman mayores ensamblajes, se va produciendo en un viraje a rojo en el pico de resonancia del plasmón superficial de los espectros UV-Visible. Se usan diferentes concentraciones de enzima en los pocillos individuales de una placa de 96 pocillos. Se comparan las velocidades de reacción del ensamblaje (partiendo de nanopartículas) y el desensamblaje (partiendo de ensamblajes). Debido a las partículas de ácido carboxílico y amina formadas en estas reacciones, se puede observar una agregación inespecífica a través de una atracción electrostática. El procedimiento principal para distinguir entre una agregación covalente (enzimática) y una no covalente (p.ej., electrostática) consiste en seleccionar los controles apropiados. El acoplamiento enzimático sólo se espera cuando se usan aminoácidos L, por lo que cualquier agregación observada con el uso de aminoácidos D será no covalente. Otro procedimiento consiste en añadir codisolventes para interrumpir las interacciones no covalentes: los ensamblajes no covalentes se desagregarán mientras que los ensamblajes covalentes permanecerán intactos. La variación de la fuerza iónica mediante el uso de sales comunes (KCl, NaCl) o tampones de alta fuerza iónica se usa para identificar las condiciones en las que se minimice la agregación inespecífica.

Diversos factores afectan a la posición de equilibrio de la reacción enzimática de ensamblaje de NP. La constante de equilibrio total se puede expresar como la proporción de partículas ensambladas frente a partículas libres ( $K_{eq} = NP_{ass} / (NP_1 \cdot NP_2)$ ).  $K_{eq}$  se compone de tres equilibrios separados: la ionización de la NP peptídica con un grupo de ácido carboxílico libre ( $K_1$ ); la de la NP peptídica con la amina libre ( $K_2$ ) y la propia síntesis/hidrólisis de la amida ( $K_3$ ); véase la Figura 5. El equilibrio de la hidrólisis de amidas ya se ha estudiado en profundidad previamente, tanto en medios acuosos diluidos (Ulijn, *et al J. Chem Soc., Perkin Trans. 2* 2002, 1024) como en hidrogeles poliméricos (Ulijn, *et al, Org. Biomol. Chem.* 2003 1, 1277). En base a estos descubrimientos previos, se espera que los equilibrios de ionización  $K_1$  y  $K_2$  (Figura 5) contribuyan significativamente a la posición de equilibrio. Como es natural, la ionización se suprimirá cuando los péptidos estén inmovilizados sobre NP debido a la dificultad de formación de cargas en las proximidades de las cargas iguales (i.e., no se favorece la acumulación de muchas cargas similares sobre una superficie).  $K_1$  y  $K_2$  se cuantifican mediante la valoración de ácido-base de las NP, mientras que  $K_3$  se obtiene de medir las proporciones entre las nanopartículas ensambladas y las libres usando TEM, espectroscopia UV-Visible e IR. Para garantizar que se ha alcanzado el equilibrio, se iniciarán las reacciones desde ambos sentidos (i.e., las nanopartículas libres y las estructuras ensambladas preparadas según lo descrito anteriormente).

Se espera que la fuerza iónica de la solución contribuya significativamente a la posición de equilibrio de la hidrólisis/síntesis de péptidos. Se espera que la ionización se inhiba significativamente en medios de baja fuerza iónica, conduciendo a un aumento de la síntesis y al ensamblaje de NP resultante. En una hidrólisis de alta fuerza iónica, se espera favorecer el desensamblaje. Estos efectos se pueden cuantificar mediante la valoración de ambas NP con terminales de ácido y amina libres a diferentes valores de fuerza iónica (obtenidos usando soluciones tamponadas a diferentes concentraciones). La dependencia de la constante de equilibrio total  $K_{eq}$  en la fuerza iónica se cuantifica usando los procedimientos descritos anteriormente. Se seleccionan condiciones en las que el equilibrio entre la entropía y la entalpía permita el ensamblaje en condiciones cercanas al equilibrio. Esto permite el ensamblaje reversible y un grado de corrección de errores, permitiendo así la formación de estructuras más sensibles.

La especificidad principal de las enzimas que hidrolizan péptidos describe la preferencia por los aminoácidos de cualquier lado del enlace de tipo amida (aminoácidos con cadenas laterales R1 y R'1; véase la Figura 5). Para analizar la validez de este enfoque, se comparan tres proteasas diferentes:  $\alpha$ -quimiotripsina pancreática bovina comercialmente disponible, termolisina de *B. thermoproteolyticus* Rokko y elastasa de páncreas porcino. Estas proteasas muestran especificidades opuestas aunque complementarias por ciertas combinaciones de aminoácidos R1/R'1; véase la Tabla 1. Aunque la  $\alpha$ -quimiotripsina es selectiva de los aminoácidos hidrófobos de la posición R1, es bastante inespecífica del residuo R'1. Por el contrario, la termolisina presenta una preferencia por los residuos hidrófobos de gran tamaño de la posición R'1 y es inespecífica en R1. La elastasa tiene preferencia por los aminoácidos pequeños de ambas posiciones. Por consiguiente, se espera que la hidrólisis/síntesis del enlace de tipo amida en Gly-Leu sea catalizada por la termolisina y el de Leu-Gly, de forma preferente, por la  $\alpha$ -quimiotripsina, etc. Recientemente, se ha demostrado este comportamiento altamente específico en péptidos ligados a hidrogeles poliméricos (Doezé, *et al, Chem., Int. Ed Eng.* 2004 43, 3138). Para analizar si se puede aprovechar esta especificidad en el ensamblaje específico de mezclas de nanopartículas, se preparan cuatro tipos diferentes de nanopartículas: NP de glicina N-terminal, NP de glicina C-terminal, NP de leucina N-terminal y NP de leucina C-terminal. Se usan partículas de diferente tamaño para permitir la fácil distinción entre ellas. Se evalúa si las tres enzimas son catalíticamente activas sobre los péptidos inmovilizados en las NP. Se optimizan las condiciones y se exponen las mezclas cuaternarias de las NP a cada una de las enzimas nombradas anteriormente. Se evalúa si sólo se observa la agregación de nanopartículas para la combinación de las nanopartículas que coincide con la

selectividad de las enzimas. El proceso de ensamblaje se controla mediante espectroscopia UV-Visible y TEM. Se reducen las cantidades de enzima lo máximo posible para establecer la sensibilidad del sistema. Estos experimentos aportan una prueba sobre el concepto de usar estos materiales en biodetección.

5 Tabla 1: Especificidad de cuatro proteasas modelo diferentes que se usan para medir la selectividad del ensamblaje de nanopartículas. Los aminoácidos están ligados a las nanopartículas mediante residuos de cisteína. Sí/No indica si se espera o no el ensamblaje de las NP.

Enzima	Gly-Gly	Gly-Leu	Leu-Leu	Leu-Gly
$\alpha$ -quimiotripsina (EC 3.4.21.1)	No	No	Sí	Sí
Elastasa (EC 3.4.21.36)	Sí	No	No	No
Termolisina (EC 3.4.24.27)	No	Sí	Sí	No

10 Como ejemplo específico de una aplicación biomédicamente relevante de los ensamblajes de nanopartículas de la invención, se estudian metaloproteasas matriciales (MMP) en fluidos de heridas crónicas. Existe la necesidad urgente de contar con dispositivos que permitan la medición precisa y directa de la actividad proteasa de los fluidos de heridas no cicatrizantes (crónicas), que actualmente requiere la dilución y el ajuste del pH del fluido (Greener, B., *et al*, *J. Wound Care*, 12, 2). Estas MMP son capaces de hidrolizar selectivamente secuencias peptídicas específicas que constan de al menos 6 residuos de aminoácido para una escisión óptima. Se identifican las MMP que desempeñan papeles clave en la cicatrización de heridas, y se diseña un sistema de nanopartícula/péptido y se analiza la selectividad (la detección de MMP simple en fluidos biológicos), la sensibilidad (que es la concentración mínima que se puede detectar) y la reproductibilidad usando un formato de placa de 96 pocillos.

15 La Figura 6 proporciona datos de: (i) colagenasas (MMP-1, MMP-8, MMP-13); (ii) gelatinasas (MMP-2, MMP-9); (iii) estromelisinina (MMP-3, MMP-10, MMP-11); y (iv) MMP-12. Además, la Figura 6 aporta datos de la elastasa neutrófila, la trombina y la elastasa. La Figura 6 también proporciona datos de los diversos sustratos para cada proteasa enumerada y, además, ofrece datos sobre la especificidad del sustrato de cada proteasa de interés (proteasa diana), i.e., la secuencia de aminoácidos que cada proteasa reconoce y puede hidrolizar. Por ejemplo, la proteasa MMP-1 tiene una especificidad catalítica para un intervalo de diferentes colágenos tales como (I, II, III, VII, VIII, X, XI); gelatina; agregano; tenascina; L-selectina: IL-1Beta; proteoglucanos; entactina; ovostatina; MMP-2; MMP-9. Más específicamente, la MMP-1 reconoce e hidroliza las siguientes secuencias:

- 25 (i) Ac-Pro-Leu-Gly-Ser~Leu-Leu-Gly-OEt;  
(ii) Mca-Pro-Leu-Gly~Leu-Dpa-Ala-Arg-NH<sub>2</sub>;  
(iii) Pro-Met-Ala~Leu-Trp-Ala-Thr;  
(iv) Leu-Pro-Met~Phe-Ser-Pro;  
(v) Ac-Pro-Leu-Ala-Ser~Nva-Trp-NH<sub>2</sub>;  
30 (vi) Arg-Trp-Thr-Asn-Asn-Phe-Arg-Glu-Tyr;  
(vii) Pro-Glu-Gly~Ie-Ala-Gly;  
(viii) Pro-Glu-Gly~Leu-Leu-Gly.

35 Las características preferidas de cada aspecto de la invención se presentan en cuanto a cada uno del resto de los aspectos por analogía. Los documentos de la técnica anterior mencionados en la presente memoria están incorporados dentro de los límites de la legislación vigente.

Ahora se describirá la presente invención más detalladamente en referencia a los siguientes ejemplos no restrictivos.

**Ejemplo 1: Red de nanopartículas funcionalizadas con péptido auto-ensamblado capaz de ser activada por termolisina de *B. Thermoproteolyticus rokko***

*Procedimientos generales:* se adquirieron nanopartículas de oro con un diámetro de 10 nm en BBI International (Agar Scientific, RU). Se calculó su diámetro medido por TEM (media de 100 partículas) como  $8,5 \pm 1,0$  nm. La bis(p-sulfonatofenil)fenilfosfina dipotasio deshidratada se obtuvo en Strem Chemicals (MA). A no ser que se indique lo contrario, el resto de los reactivos y materiales se obtuvieron en Sigma-Aldrich (RU). Todas las soluciones se prepararon usando agua desionizada de gran pureza (purificada en un sistema Nanopure Diamond de Triple Red Laboratory Technology, RU).

*Síntesis de péptidos:* los aminoácidos y la resina se adquirieron en Novabiochem (RU) y el resto de los reactivos para la síntesis en fase sólida se obtuvieron en AGTC Bioproducts (RU). El péptido 1 (Fmoc-Gly-Phe-Cys) y el péptido 2 (Fmoc-Gly-d-Phe-d-Cys) se sintetizaron usando una estrategia de Fmoc en fase sólida estándar. Se secaron los péptidos al vacío y se purificaron mediante CLAR en fase inversa (Gilson) usando un gradiente de agua/acetronitrilo al 20%–65% que contenía TFA al 0,1%. La identidad de los péptidos se confirmó mediante espectrometría de masas (Micromass Ltd., Altrincham, RU) y RMN (Espectrómetro JEOL 270NMR).

*Funcionalización de las nanopartículas con péptido:* se estabilizaron nanopartículas de oro de 8,5 nm mediante la formación de un complejo con bis(p-sulfonatofenil)fenilfosfina dipotasio deshidratada durante 12 h. Las nanopartículas de oro estabilizadas permanecieron estables en solución acuosa a temperatura ambiente durante un período de meses. Se prepararon soluciones finales de nanopartículas de oro estabilizadas (concentración recibida) en fosfato de sodio 10mM (pH 8) y NaCl 100mM, y se incubaron a temperatura ambiente durante una noche con 20  $\mu$ l de péptido 1 (50 $\mu$ M) en *N,N*-dimetilformamida (DMF) para proporcionar conjugados de nanopartículas de oro. Se retiró el exceso de péptido por centrifugación y se extrajo el sobrenadante antes de volver a suspender las nanopartículas hasta un volumen inicial con tampón de fosfato (pH 8), albúmina de suero bovino al 0,05% (p/v) (ASB) y NaCl 100mM.

*Monitorización de la hidrólisis enzimática:* todas las reacciones se llevaron a cabo en cubetas de plástico desechables y el análisis se realizó *in situ* y por duplicado. Las soluciones de termolisina fueron recién preparadas en fosfato de sodio 10mM (pH 8) al intervalo de concentraciones requerido. Los espectros UV-Visible se registraron a temperatura ambiente tras la adición de la termolisina a los conjugados de oro funcionalizados con péptido. Los espectros se registraron en un espectrofotómetro UV-Visible UV-500 Unicam en el intervalo de 200–800 nm con una resolución de 1 nm y una corrección del fondo usando tampón de fosfato, NaCl y ASB al 0,05% (p/v) en cubetas de poliestireno con una longitud del recorrido de 1 cm. *Caracterización mediante TEM:* las muestras para la microscopía electrónica se prepararon sobre una rejilla de TEM de cobre revestida de carbono con malla de orificios 300 de Agar Scientific. Se colocó una rejilla de TEM sobre un trozo de papel tisú médico y se aplicó una gota de solución con una pipeta a la rejilla. El papel tisú sirvió para absorber el exceso de solución. Entonces se lavó la rejilla con 5 gotas de agua desionizada siguiendo el procedimiento anterior para eliminar el exceso de sal de la superficie de la rejilla. La TEM se realizó sobre un JEOL TEM FX(II) a 200 KV.

Se diseñó una red de nanopartículas funcionalizadas con péptido auto-ensamblado capaz de ser activada por termolisina de *B. Thermoproteolyticus rokko* usando el tripéptido Fmoc-Gly-Phe-Cys-NH<sub>2</sub> (péptido 1). El Cys-NH<sub>2</sub> terminal permite la fácil unión a la superficie de nanopartículas de oro mediante la formación de un enlace de tiolato de oro. La termolisina presenta una preferencia por los residuos hidrófobos de gran tamaño de la posición P1' (Phe) y es inespecífica para el residuo P1 (Gly). Por consiguiente, cabría esperar que la hidrólisis del enlace de tipo amida de Gly-Phe fuera específicamente catalizado por la termolisina y que resultara simultáneamente en la dispersión de las nanopartículas y en un cambio visible del color.

Las imágenes de la microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las nanopartículas de oro estabilizadas revelaron una población muy dispersada de nanopartículas (Fig. 7A). Tras funcionalizar con péptido 1, se observó la agregación de las nanopartículas (Fig. 7B). Esta observación concurre con los picos de resonancia de los plasmones superficiales de UV-Visible, en los que las nanopartículas de oro estabilizadas con un solo pico a 522 nm (característico de las partículas dispersadas) presentaron una ampliación y un viraje a rojo en el pico hasta 565 nm tras la funcionalización con péptido 1, lo que indicó un aumento del tamaño del ensamblaje de nanopartículas.

Para analizar la sensibilidad del sistema hacia las enzimas, se incubaron nanopartículas funcionalizadas con péptido a temperatura ambiente con concentraciones de termolisina que variaban de 7,2nM ( $7,2 \times 10^{-9}$ M) a 2,08  $\mu$ M (una sola molécula,  $2,08 \times 10^{-21}$ M). Las imágenes de la microscopía electrónica de transmisión (TEM) tras la adición de termolisina revelaron una población muy dispersada de nanopartículas (Fig. 7C). Los espectros UV-Visible muestran un cambio claro del pico de resonancia de plasmón de 565 nm a 532 nm 6 h después de la adición de la termolisina 7,2nM (Fig. 8A). Se observaron desplazamientos espectrales UV-Visible similares de alrededor de 30 nm a diferentes escalas temporales para el intervalo de concentraciones de termolisina analizado. La CLAR del sobrenadante sólo detectó la presencia de Fmoc-Gly, indicando que éste fue el fragmento escindido del tripéptido 1 y confirmando así el lugar de la hidrólisis enzimática. En los experimentos de control, las partículas de oro de 8,5 nm funcionalizadas con Fmoc-Gly-Phe-Cys-NH<sub>2</sub> no se desensamblaron tras la introducción de tripsina, una enzima que escinde exclusivamente péptidos con residuos de Arg o Lys en la posición P1. Como se esperaba, las

nanopartículas funcionalizadas con Fmoc–Gly–d–Phe–d–Cys no se dispersaron tras la introducción de termolisina.

La monitorización de la reacción de hidrólisis mediante la observación directa del desplazamiento de la resonancia de plasmones sólo es posible para grandes desplazamientos espectrales. Un procedimiento muy sensible y preciso para cuantificar el cambio de la forma espectral se puede realizar mediante el cálculo del cambio de la proporción de A/D (superficie agregada/dispersada) de la superficie bajo el pico de resonancia en un plasmón. La Fig. 8B muestra la región bajo la que se calculó la integral para los espectros UV–Visible de todas las muestras analizadas, abarcando la región D (dispersión) de 490 a 540 nm y la región A (agregación) de 550 a 700 nm. Se analizaron las muestras y se obtuvo una proporción A/D de diferentes puntos temporales. Con este enfoque, se pudo seguir en tiempo real la dispersión de las nanopartículas (Fig. 8C). Mediante la variación de la concentración enzimática, se observó una dependencia lineal de más de 4 órdenes de magnitud.

Se determinó la detección de una sola molécula enzimática midiendo la  $\Delta$  proporción de A/D hasta 2,08 zM de termolisina. La  $\Delta$  proporción de A/D aumenta durante un período de 47 h para 7,2 nm y 2,08 zM, hasta un 96,5% y 25,2% respectivamente.

La Fig. 8D es una representación gráfica de  $\{(\Delta \text{ proporción de A/D}) / \Delta t\}$  para las diferentes concentraciones de termolisina analizadas. Para las concentraciones que varían de 7,2 nm hasta 0,1 fM ( $0,1 \times 10^{-12}$  M) de termolisina, es posible obtener una regresión lineal a partir de la cual se pueda cuantificar la concentración enzimática.

Este ejemplo ilustra un sistema de ensamblaje de nanopartículas de oro funcionalizadas con péptido sensible a enzimas que permite la rápida detección de enzimas y que tiene una sensibilidad mucho mayor (una sola molécula) que el publicado previamente. El sistema de la presente memoria también ofrece un control dinámico frente a ensamblajes generados en condiciones suaves que puede ser útil para el desarrollo de una nueva clase de materiales dinámicos biológicamente controlados con aplicaciones en la administración de fármacos y en la monitorización *in vivo* de enzimas. Además, se puede usar el enfoque modular (ancla (p.ej., grupo cisteína–NH<sub>2</sub>), conector escindible enzimáticamente, accionador (p.ej., Fmoc)) como base para diseñar el sistema que detecte fácilmente un amplio intervalo de enzimas con una alta sensibilidad.

## Ejemplo 2: Rastreo del antígeno prostático específico

El cáncer de próstata es actualmente la forma más frecuente de cáncer en occidente y la segunda causa de mortalidad relacionada con el cáncer en varones (Mazhar, *et al.*, *BJU International*, 2006, 98(4): p. 725–730). El procedimiento más ampliamente usado para el rastreo y la detección temprana del cáncer de próstata es el análisis en sangre del antígeno prostático específico (APE) que mide el nivel de APE del suero. El Organismo estadounidense para el Control de Alimentos y Medicamentos ha aprobado el uso del análisis del APE junto con un examen rectal digital para ayudar a detectar el cáncer de próstata en varones de 50 años o mayores, así como usar el análisis del APE para controlar la reaparición del cáncer de próstata tras el tratamiento.

La producción de APE depende de los andrógenos en la glándula prostática normal y se puede detectar tras la pubertad en el suero de los varones sanos. El APE es producido por el epitelio de la glándula prostática y secretado en el fluido seminal, en el que se puede encontrar a concentraciones de 0,2–5 g/l (Wang, *et al.*, *Prostate*, 1981, 2(1): p. 89–96). En circulación, la concentración de APE de los varones sanos es normalmente muy inferior ( $\leq 2,0$  ng/ml) y el aumento de los niveles de APE total en suero (APeT) está asociado con un mayor riesgo de cáncer de próstata.

La capacidad de identificar el APE enzimáticamente activo con un sensor colorimétrico ayudará en el rastreo del cáncer de próstata, especialmente, en hombres con APE en el intervalo de 2,5–4,0 ng/ml. Este ejemplo demuestra la detección de APE enzimáticamente activo usando la presente invención.

Se funcionalizaron nanopartículas de oro con fluorenil–9–metoxicarbonilo (Fmoc)–SSFY–†–SGGGC–CONH<sub>2</sub>. La secuencia peptídica se seleccionó para que fuera específica de la escisión enzimática del APE (Coombs, *et al.*, *Chem Biol*, 1998, 5(9): p. 475–88). † indica el lugar de la hidrólisis. La incorporación de un residuo de cisteína en el terminal C proporciona el enlace con la superficie de oro por medio de un enlace de tiolato de oro y la agregación de las nanopartículas de oro está inducida por interacciones  $\pi$ – $\pi$  entre los grupos Fmoc del terminal N.

Se añadió APE a una concentración de 0,45 ng/ml o 1,0 ng/ml al agregado así formado, y se monitorizó la dispersión del agregado debida a la escisión por el APE de la secuencia peptídica SSFYSGGGC.

La Figura 9 ilustra los resultados experimentales obtenidos usando este sistema basado en nanopartículas. Tras 5 min, se observa una diferenciación de la concentración de APE. El sistema de nanopartículas es muy sensible a las bajas concentraciones enzimáticas y se puede observar un límite de separación entre 0,45 ng/ml y 1,0 ng/ml. Así pues, el procedimiento de detección reconoce selectivamente la forma enzimática de APE, así como PSA–A2M (en la que una parte del APE forma un complejo con  $\alpha_2$ –macroglobulina (A2M)) que no es recogida por los inmunoanálisis. Esto se debe al uso de sustratos peptídicos sintéticos de bajo peso molecular para crear el sistema basado en nanopartículas de oro. El sistema es mucho más simple en comparación con los inmunoanálisis

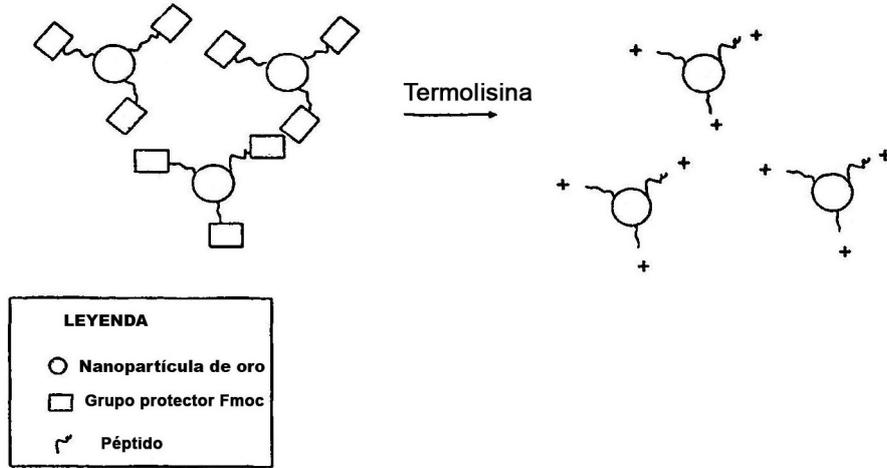
convencionales y proporciona una fácil detección con el cambio visual del color.

## REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un agregado de nanopartículas que comprende nanopartículas ligadas a otras nanopartículas indirectamente por medio de un resto de unión de fluorenil–metoxi–carbonilo (Fmoc), en el que las nanopartículas están ligadas al resto de unión de Fmoc mediante conectores peptídicos que son capaces de ser escindidos por una enzima proteasa, en el que la escisión de los conectores peptídicos por la enzima proteasa da como resultado un resto de repulsión revelado sobre las nanopartículas, que aumenta el desensamblaje del agregado de nanopartículas debido a la repulsión entre los restos de repulsión.
- 2.** Un agregado según lo reivindicado en la reivindicación 1, en el que el resto de repulsión es un resto cargado que repele a otros restos de repulsión mediante repulsión electrostática.
- 10 **3.** Un agregado según lo reivindicado en la reivindicación 2, en el que el resto cargado es una amina.
- 4.** Un agregado según lo reivindicado en la reivindicación anterior, en el que la nanopartícula es una nanopartícula de oro.
- 5.** Un agregado según lo reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un fármaco que es liberado cuando los conectores peptídicos son escindidos por la enzima proteasa.
- 15 **6.** Una nanopartícula acoplada a un resto de unión de fluorenil–metoxi–carbonilo (Fmoc) mediante un conector peptídico que puede ser escindido por una enzima proteasa para revelar un resto de repulsión.
- 7.** Una nanopartícula según lo reivindicado en la reivindicación 6 modificada por las características de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4.
- 20 **8.** Un procedimiento para formar un agregado de nanopartículas según lo reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende: ligar nanopartículas a otras nanopartículas indirectamente por medio de un resto de unión de fluorenil–metoxi–carbonilo (Fmoc), en el que las nanopartículas son ligadas al resto de unión de Fmoc mediante conectores peptídicos que son capaces de ser escindidos por una enzima proteasa para revelar un resto de repulsión.
- 25 **9.** Un agregado de nanopartículas según lo reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una nanopartícula según lo reivindicado en la reivindicación 6 o la reivindicación 7 para su uso en medicina.
- 10.** El uso de un agregado de nanopartículas según lo reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una nanopartícula según lo reivindicado en la reivindicación 6 o la reivindicación 7 en la elaboración de un diagnóstico para diagnosticar una enfermedad o afección asociada con la enzima proteasa.
- 30 **11.** El uso de un agregado de nanopartículas que comprende nanopartículas ligadas a otras nanopartículas indirectamente mediante un resto de unión de fluorenil–metoxi–carbonilo (Fmoc), en el que las nanopartículas están ligadas al resto de unión de Fmoc mediante conectores peptídicos que son capaces de ser escindidos por una enzima proteasa para revelar un resto de repulsión y un fármaco, en el que el fármaco es retenido en el agregado hasta que los conectores peptídicos son escindidos por la enzima proteasa, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con la enzima proteasa.

35

**Figura 1**



**Figura 2**

**Figura 2A: agregado de partículas**

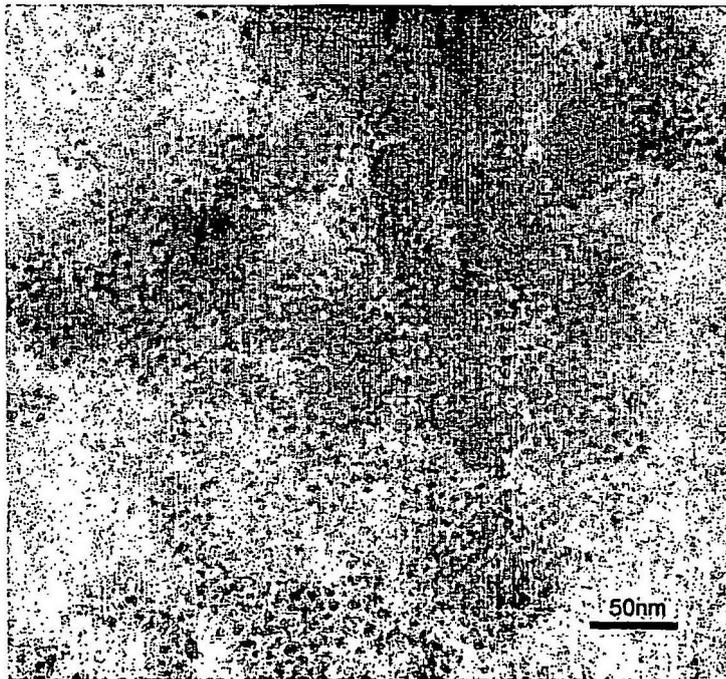


Figura 2B: partículas dispersadas

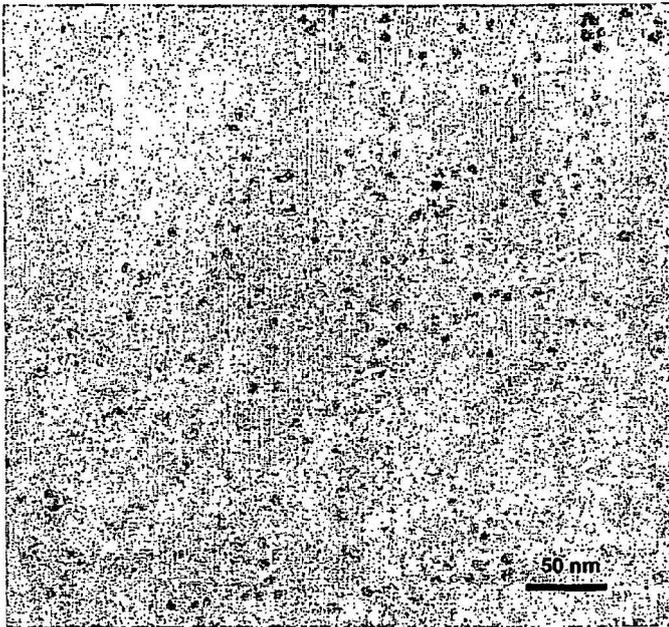
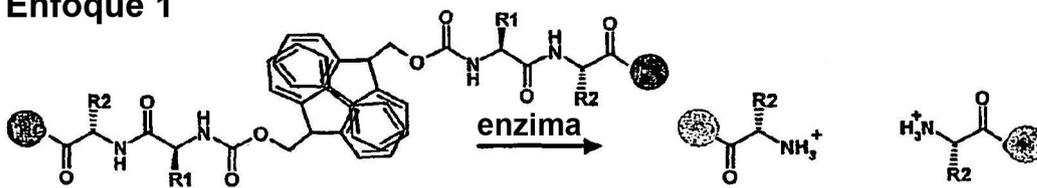


Figura 3

Enfoque 1



Enfoque 2

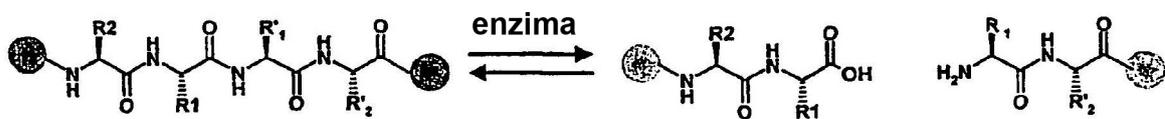


Figura 4

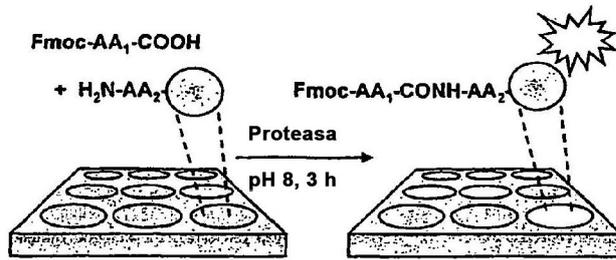


Figura 5

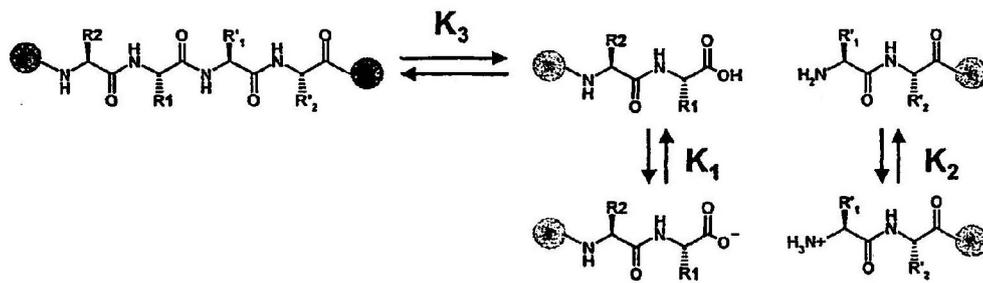


Figura 6: Proteasas implicadas en la cicatrización de heridas y su especificidad por el sustrato

Familias de MMP	Proteasas		Nombre(s) de la enzima		PM (kDa)		Sustrato	Especificidad por el sustrato	pI
	MMP	Otros nombres	latente	activa					
Colagenasas	MMP-1	Colagenasa-1, colagenasa intersticial	52	43	Colágenos (I, II, III, VII, VIII, X, XI); gelatina; agregano; tenascina, L-selectina; IL-1 $\beta$ ; proteoglicanos; entactina; ovostatina; MMP-2; MMP-9	Ac-Pro-Leu-Gly-S-Leu-Gly-OEt Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH <sub>2</sub> Pro-Met-Ala-Leu-Trp-Ala-Thr Leu-Pro-Met-Phe-Ser-Pro Ac-Pro-Leu-Ala-S-Nva-Trp-NH <sub>2</sub> <sup>183</sup> R-W-T-N-F-R-E-Y <sup>181</sup> Pro-Glu-Gly-Ile-Ala-Gly Pro-Glu-Gly-Leu-Leu-Gly	6,47		
	MMP-8	Colagenasa-2, colagenasa neutrofila	75	58	Colágenos (I, II, III, V, VII, VIII y X); gelatina; entactina; agregano; tenascina, fibronectina, ProMMP-1,2	GPQG-IWGG Pro-Leu-Glu/Ala-Tyr-Trp-Ser 2,4-DNP-Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-D-Arg-OH	6,38		
	MMP-13	Colagenasa-3, colagenasa intersticial de rata	52	42	Colágenos (I, II, III, IV, IX, X, XIV); gelatina; entactina, agregano; tenascina, plasminógeno; agregano; perlecano; fibronectina; fibrinógeno/fibrina; osteonectina; MMP-9; ProMMP-9,13	Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH <sub>2</sub> Gly-Pro-Gln-Gly-Leu-Ala-Gly-Gln779 Asp-Val-Gly-Glu-Tyr-Asn-Val-Phe88	5,32		
Gelatinasas	MMP-2	Gelatinasa A, gelatinasa de 72 kDa, colagenasa de tipo IV	71	62	Gelatininas; fibronectina; elastina; colágenos (I, IV, V, VII, X, XI); laminina; agregano; vitronectina; decorina; IGFBP-3/5	GPQG-IFGQ Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-Arg-NH <sub>2</sub> Ac-Pro-Leu-Ala-S-Nva-Trp-NH <sub>2</sub> Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln	5,26		
	MMP-9	Gelatinasa B, gelatinasa de 92 kDa, colagenasa de tipo V	76	67	Colágenos (IV, V, VII, X, XIV, XVII); gelatina; entactina, agregano; elastina, fibronectina; fibrinógeno/fibrina; osteonectina; plasminógeno; MBP; IL-1beta	GPLG-IAGQ Pro-Leu-Gly-Met-Leu-Ser-His	5,69		

Figura 6: continuación

Proteasas	Nombre(s) de la enzima		PM (kDa)		Sustrato	Especificidad por el sustrato	pI
	MMP	Otros nombres	latente	activa			
Familias MMP	MMP-3	Estromelisin-1, Transina, CAP, proteoglicanasa	52	43	Colágenos (III, IV, V y IX); gelatina; agregano; perlecano; decorina; laminina; elastina; caesina; osteonectina; ovostatina; entactina; plasminógeno; MBP; IL-1beta; MMP-2/TIMP-2; MMP-7; MMP-8; MMP-9; MMP-13	Mca-RPKPVE-ZWRK(dnp)-NH <sub>2</sub> Dnp-RPLA-ZWRS, cuando X es igual a: Leu Phe Tyr Trp	5,77
	MMP-10	Estromelisin-2, Transina-2	52	44	Colágenos (II-V); gelatina; caseína, agregano, entactina; elastina; vitronectina; fibrinógeno/fibrina; laminina, MMP-1, MMP-8	Asp-Val-Gly-His-Phe-Ser-Ser-Phe85 Gly-Pro-His-Leu-Leu-Val-Glu-Ala29	5,49
	MMP-11	Estromelisin-3, motivo furina	51	46	Laminina; fibronectina; agregano; IGFBP-1	Ala-Ala-Gly-Ala-Met-Phe-Leu-Glu354 Arg-Val-Gly-Phe-Tyr-Glu-Ser-Asp688 Lys-Ala-Leu-His-Val-Thr-Asn-Ile144 Dns-Pro-Leu-Ala-Cys(OmeBzI)-Trp-Ala-Arg-NH <sub>2</sub>	6,25
Otras MMP	MMP-12	Metaloelastasa de macrófagos, metaloelastasa	52	20	Colágeno IV; gelatina; elastina; caseína; fibronectina; vitronectina; laminina; entactina; MBP; fibrinógeno/fibrina; plasminógeno	Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-CysO <sub>3</sub> H- Gly20 Dnp-Arg-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Arg-Ser-NH <sub>2</sub> Arg-Pro-Phe-Glu-Val-Lys-Asp-Thr203 Gly-Ala-Met-Phe-Leu-Glu-Ala-Ile356	8,75
Serina proteasas	-	-	28,57806		Elastina	MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNa	9,31
	Trombina	Factor II, coagulación			Colágenos	Benzoil-Phe-Val-Arg-pNA,HCl	
	Elastasa	-	25		Elastina		8,0- 8,5

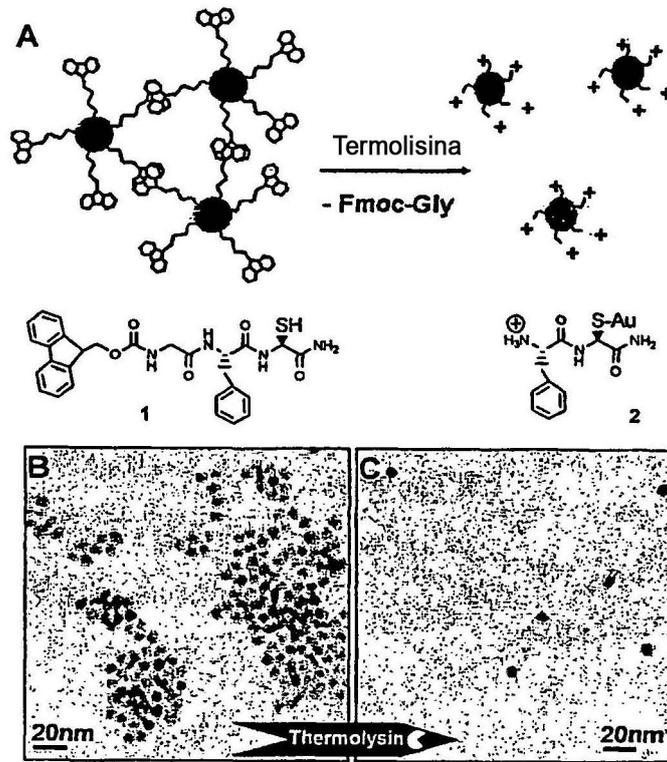


Figura 7

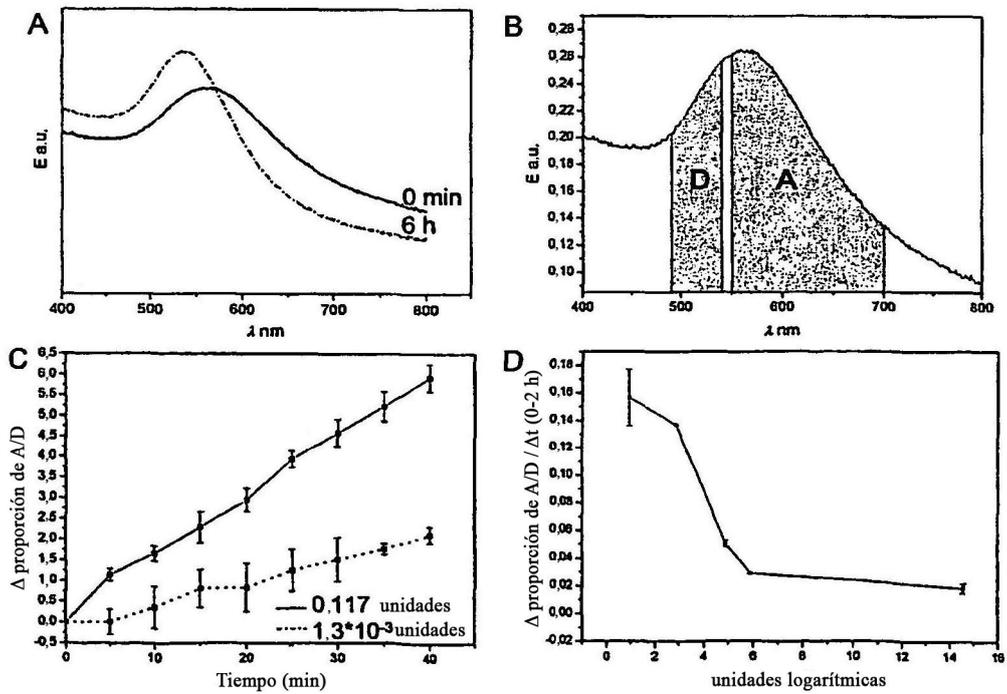


Figura 8

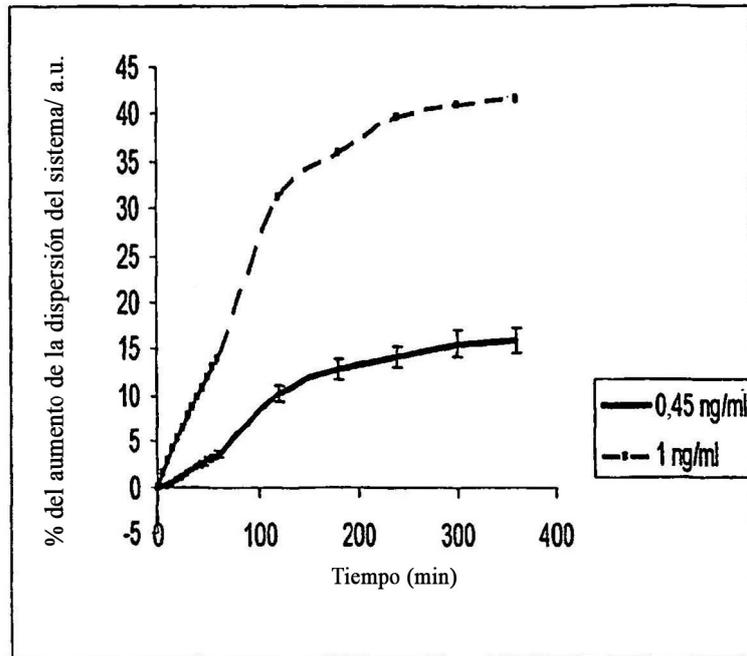


Figura 9