



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 335 852**

② Número de solicitud: 200802831

⑤ Int. Cl.:  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61K 9/51** (2006.01)  
**A61P 37/02** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **02.10.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **05.04.2010**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**05.04.2010**

⑰ Solicitante/s: **Universidad de Sevilla  
OTRI-Pabellón de Brasil  
Paseo de las Delicias, s/n  
41013 Sevilla, ES  
Universidad Pablo de Olavide y  
Fundación Reina Mercedes para la Investigación  
Sanitaria**

⑱ Inventor/es: **Pozo Pérez, David;  
Fernández Montesinos, Rafael;  
Herrera Cabello, Juan Luis;  
Mejías Romero, José Antonio;  
Castillo Hernández, Paula Margarita;  
Zaderenko García, Ana Paula;  
García Luna, Pedro Pablo y  
Pereira Cunill, José Luis**

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Utilización de nanopartículas de metales nobles como inmunomoduladores y composición inmunomoduladora.**

㉒ Resumen:

Utilización de nanopartículas de metales nobles como inmunomoduladores y composición inmunomoduladora. La presente invención tiene por objeto la utilización de los efectos inmunomoduladores de nanopartículas metálicas de plata funcionalizadas con tiopronina [*N*-(2-mercapto-propionil)glicina]. Un segundo aspecto objeto de la invención es una composición inmunomoduladora que incluye nanopartículas de plata funcionalizadas con tiopronina.

ES 2 335 852 A1

## DESCRIPCIÓN

Utilización de nanopartículas de metales nobles como inmunomoduladores y composición inmunomoduladora.

5 **Sector y objeto de la invención**

Sector químico, bioquímico, inmunológico. Producto para aplicaciones biomédicas. Inmunoterapia.

10 Un aspecto de la presente invención lo constituye la utilización de los efectos inmunomoduladores de nanopartículas metálicas de plata funcionalizadas con tiopronina [*N*-(2-mercaptopropionil)glicina]. Un segundo aspecto es una composición inmunomoduladora que incluye nanopartículas de plata funcionalizadas con tiopronina.

15 **Estado de la técnica**

Durante los últimos años se ha ido incrementando el interés por la síntesis y caracterización de diferentes tipos de nanopartículas metálicas, en especial aquellas que pueden ser acopladas a biomoléculas. Este interés ha sido potenciado por las expectativas derivadas de estos nano-bioconjugados en un amplio rango de aplicaciones en el diseño de nuevos medicamentos, biomarcadores, construcción de nanodispositivos, o para el empleo como elementos analíticos de especial sensibilidad [Blow, N. Nanotechnology in biology: big collaborations for a small world. *Nat Methods* 5, 569-74 (2008) y Kogan, M.J. *et al.* Peptides and metallic nanoparticles for biomedical applications. *Nanomed* 2, 287-306 (2007)].

25 Entre los diferentes tipos de nanopartículas, aquellas que poseen un núcleo formado por un metal noble son especialmente interesantes, debido, fundamentalmente a sus propiedades plasmónicas, que le permiten actuar como marcadores moleculares [Gong, J.L. *et al.* Ag/SiO<sub>2</sub> core-shell nanoparticle-based surface-enhanced Raman probes for immunoassay of cancer marker using silica-coated magnetic nanoparticles as separation tools. *Biosens Bioelectron* 22, 1501-7 (2007)], junto a sus efectos de amplificación de señales en espectroscopia RAMAN y SEIR. También se usan como elementos de contraste en microscopía electrónica [Murphy, C.J. *et al.* Anisotropic metal nanoparticles: Synthesis, assembly, and optical applications. *J Phys Chem B* 109, 13857-70 (2005)]. Hay por otra parte un creciente interés en su uso como “nanocarriers” de agentes quimioterapéuticos o como nanopartículas desnudas como potenciales agentes citostáticos o anti-angiogénicos [Jain, K.K. Nanomedicine: application of nanobiotechnology in medical practice. *Med Princ Pract* 17, 89-101 (2008)]. Existe también una preocupación debido al desconocimiento sistemático de sus potenciales efectos tóxicos o aquellos relacionados con problemas medioambientales [Linkov, I., Satterstrom, F.K. & Corey, L.M. Nanotoxicology and nanomedicine: making hard decisions. *Nanomedicine* 4, 167-171 (2008)].

40 Recientemente están cobrando un auge importante aquellos trabajos que exploran los efectos biológicos de las nanopartículas, no ya aquellas que han sido funcionalizadas para un propósito concreto, sino de aquellas denominadas “naked” o desnudas. Un ejemplo de funcionalización básica, usada como plataforma de funcionalizaciones más complejas son las nanopartículas de plata funcionalizadas con tiopronina (Figura 1). La funcionalización con tiopronina es una técnica estandarizada ya que la misma sirve de plataforma a futuras funcionalizaciones debido al grupo carboxilo libre y a que solubiliza las nanopartículas de plata que previamente se han reducido de Ag<sup>+</sup> a Ag en presencia de NaBH<sub>4</sub>. La unión de la tiopronina a la plata se produce por su grupo -SH, estando su síntesis y caracterización muy estandarizada [Song, Y., Huang, T. & Murray, R.W. Heterophase ligand exchange and metal transfer between monolayer protected clusters. *J Am Chem Soc* 125, 11694-701 y Huang, L.W. & Murray, R.W. Luminescence of tiopronin monolayer-protected silver clusters changes to that of gold clusters upon galvanic core metal exchange. *J. Phys. Chem. B* 107, 7434-7440 (2003)].

50 En este contexto se plantea el estudio de los efectos de estas nanopartículas funcionalizadas con tiopronina (Ag@) en el sistema inmune. En particular, los efectos de las mismas sobre el principal sistema de detección de patógenos, aquel constituido por los receptores Toll (TLR). Los receptores Toll reconocen lo que se conoce como patrones asociados a patógenos o PAMPs (de *pathogen-associated molecular patterns* [Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801 (2006)]. Estos TLRs forman pues el principal sistema de detección de lo que se conoce como inmunidad innata y en este sentido son fundamentales para reconocer lo propio de lo ajeno en el organismo humano. Por esta razón, la modulación de las respuestas inducidas por la activación de los TLRs se sugiere como una diana terapéutica en enfermedades infecciosas, sepsis, enfermedades inflamatorias y/o autoinmunitarias o en el desarrollo de vacunas [Romagne, F. Current and future drugs targeting one class of innate immunity receptors: the Toll-like receptors. *Drug Discov Today* 12, 80-7 (2007)].

60 En cualquier caso, la caracterización de los efectos sobre respuestas críticas en el sistema inmune es fundamental en materiales que van a formar parte de aplicaciones biomédicas.

65 Dentro de los componentes celulares responsables de la inmunidad innata, el macrófago es un tipo celular fundamental y por ello es el tipo celular de elección en numerosos estudios conducentes a la identificación de nuevas moléculas inmunomoduladoras [Trinchieri, G. & Sher, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 7, 179-90 (2007)].

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se estudiaron los efectos que tienen las Ag@ sobre la señalización mediada por los TLRs en la línea celular macrofágica Raw 264.7 con el objetivo de identificar potenciales actividades inmunomoduladoras. Hasta la fecha, tan sólo hay un estudio previo sobre los efectos de las nanopartículas en la señalización mediada por la estimulación de TLRs [Lucarelli, M. *et al.* Innate defence functions of macrophages can be biased by nano-sized ceramic and metallic particles. *Eur Cytokine Netw* 15, 339-46 (2004)]. Sin embargo estos estudios están realizados con nanopartículas de cerámica (silica, SiO<sub>2</sub>; titanio, TiO<sub>2</sub>; zirconio, ZrO<sub>2</sub>), o nanopartículas de cobalto. El inconveniente que presentan estas nanopartículas metálicas o cerámicas es que producen un incremento en la secreción de citocinas pro-inflamatorias. Por otra parte, estas nanopartículas poseen un tamaño relativamente heterogéneo. En la presente invención se ha tomado especial cuidado en caracterizar los efectos inmunomoduladores con un material de elevada homogeneidad de tamaño (aproximadamente 5 nm).

Como resultado se ha identificado un potencial efecto inmunomodulador de las nanopartículas de Ag@, específico y diferencial sobre determinados TLRs.

## 15 Explicación de la invención

Constituye un primer aspecto de la presente invención la utilización de nanopartículas de metales nobles en la preparación de una composición inmunomoduladora. Dichas nanopartículas tienen un núcleo de plata de tamaño comprendido entre 1 y 100 nm recubierto con una monocapa de tiopronina.

Preferentemente, las nanopartículas tienen un núcleo de plata de tamaño comprendido entre 2 y 10 nm y aún más preferentemente las nanopartículas tienen un núcleo de plata de 5 nm.

La composición inmunomoduladora actúa sobre los receptores TLR2, TLR2/6, TLR3 y TLR9 y se emplea para el tratamiento de patologías inflamatorias producidas por:

- infecciones bacterianas, particularmente la meningitis.
- una sobreproducción de partículas víricas.

La composición inmunomoduladora puede utilizarse *ex vivo* en terapias celulares de carácter inmune donde se produce una transferencia de células y también como coadyuvantes en protocolos de vacunación.

Constituye otro aspecto de la presente invención una composición inmunomoduladora para el tratamiento de patologías mediadas por los receptores TLR2, TLR2/6, TLR3 y TLR9. Dicha composición comprende nanopartículas con núcleo de plata de tamaño comprendido entre 1 y 100 nm recubiertas con una monocapa de tiopronina. Preferentemente, las nanopartículas tienen un núcleo de plata de tamaño comprendido entre 2 y 10 nm y aún más preferentemente las nanopartículas tienen un núcleo de plata de 5 nm.

## 40 Breve descripción de las figuras

Figura 1: A. Imágenes de microscopía electrónica de las nanopartículas Ag@ obtenidas con el microscopio CM200 Philips-FEI. B. Esquema de una molécula de tiopronina adsorbida a una nanopartícula de Ag (no a escala) indicando los átomos de la molécula de tiopronina utilizados en la interpretación de los espectros de NMR.

Figura 2: Efecto de las Ag@ sobre la viabilidad de las Raw 256.7 medida como liberación de LDH (integridad de membrana) o función mitocondrial (reducción de MTT) tras 24 horas de cultivo a las condiciones indicadas. El MG-32 es un inhibidor del proteasoma de elevada toxicidad que utilizamos como control positivo.

Figura 3: Regulación diferencial de la producción de IL-6 estimulada por diferentes ligandos de TLRs en Raw 264.7 en ausencia o en presencia de Ag@. A. Muestra los TLRs de localización en la superficie de la célula. B. Muestra los TLRs localizados en el compartimento endocítico.

Figura 4: La exposición previa de Ag@ modula la respuesta posterior de producción de IL-6 tras estimulación con ligandos de TLRs en Raw 264.7 A. Muestra los TLRs de localización en la superficie de la célula. B. Muestra los TLRs localizados en el compartimento endocítico.

## Descripción detallada y modo de realización de la invención

Los TLRs se pueden dividir en dos grupos de acuerdo a su localización celular: TLRs 1, 2, 4, 5, 6 se localizan principalmente sobre la superficie celular y reconocen primariamente componentes de la pared bacteriana, por el contrario los TLRs 3, 7, 8, y 9 se encuentran en compartimentos endocíticos y reconocen principalmente productos víricos. Hay 13 parálogos identificados hasta la fecha en los genomas de ratón y humanos, sin embargo los ligandos de algunos de ellos no son conocidos por ahora. La unión del ligando a TLR produce una secreción de citocinas pro-inflamatorias como la IL-6 elegida en la presente invención [Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801 (2006)].

## ES 2 335 852 A1

Se han realizado dos tipos de aproximaciones:

- 1) Estudios donde se trata a las células con Ag@ en presencia y/o ausencia de los diferentes ligandos de TLRs, y se monitoriza la secreción de IL-6 mediante ELISA en los sobrenadantes obtenidos tras 24 horas.
- 2) Estudios en los que se tratan las células en presencia o ausencia de Ag@ durante 24 h, se lavan las mismas, y posteriormente se tratan las mismas con diferentes TLRs por otras 24 horas. Al final de este periodo se monitoriza la secreción de IL-6 mediante ELISA en los sobrenadantes obtenidos. Esta aproximación es interesante porque proporciona información acerca del estado de hipo- o hiper- sensibilidad en la que quedarían las células cuando se les somete a una exposición de Ag@ y posteriormente a un estímulo inmunológico.

### *Reactivos*

Nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>, 99.8%, Panreac, Lyon, Francia), *N*-(2-mercaptopropionyl)glycina (tiopronin, >98%) y NaBFL, 98% proceden de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. Agua grado Milli-Q, Millipore, Billerica, MA, USA.

### *Síntesis de Ag@*

Ag@tiopronina (Ag@) se preparan por reducción de AgNO<sub>3</sub> utilizando NaBH<sub>4</sub> como agente reductor, en una disolución acuosa que contiene tiopronina (relación molar tiopronina/Ag de 3:1), de acuerdo a procedimientos descritos anteriormente [Song, Y., Huang, T. & Murray, R.W. Heterophase ligand exchange and metal transfer between monolayer protected clusters. *J Am Chem Soc* 125, 11694-701 (2003) y Huang, L.W. & Murray, R.W. Luminescence of tiopronin monolayer-protected silver clusters changes to that of gold clusters upon galvanic core metal exchange. *J. Phys. Chem. B* 107, 7434-7440 (2003)].

### *Caracterización espectroscópica*

Los espectros de NMR se obtienen a 500 MHz en un espectrómetro Bruker AMX-500 a temperatura ambiente en agua deuterada. Los estudios de HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) se optimizan para un  $J_{HC} = 8$  Hz y los estudios TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) se llevan a cabo con una secuencia DDPFGSE, pulsos selectivos de 50 ms y un tiempo de mezcla de 120 ms.

### *Microscopía electrónica de transmisión (TEM)*

Se utilizó un microscopio de alta resolución CM200 Philips-FEI (Hillsboro, OR, USA).

### *Espectroscopía infrarroja (FTIR)*

Se utilizó un espectrómetro Bruker IFS 66/s con detector DTGS (Billerica, MA, USA). Se adquirieron 150 barridos con una frecuencia de 2.5 Hz y resolución de 1 cm<sup>-1</sup>. Todos los espectros se obtienen en pastillas de KBr con 10 mg de nanopartículas.

### *Espectroscopia UV-visible*

Se utilizó un espectrofotómetro Ocean optics (Dunedin, FL, USA) con detector HR4000.

La caracterización de las Ag@ se resume en las dos tablas siguientes:

TABLA 1

Asignación de posiciones tras los espectros de  $^1\text{H-NMR}$  y comparación entre tiopronina libre y funcionalizada a Ag y a Au [Kohlmann, O., Steinmetz, W.E., Mao, XA *et al.* *NMR Diffusion, Relaxation, and Spectroscopic Studies of Water Soluble, Monolayer-Protected Gold Nanoclusters. J. Phys. Chem. B.* **105**, 8801-8809 (2001).  
La designación de los protones como 1, 2, 3 corresponde a lo mostrado en la Figura 1

Grupo	Tiopronina	Au@	Ag@ (presente patente)
Metilo (1)	1.48	1.6	1.8
Metino (2)	3.65	4.3	4.2
Metileno (3)	4.01	4.0	3.9-3.7

TABLA 2

Comparación de los picos más intensas de FTIR ( $\text{cm}^{-1}$ ) para Ag@ con Au@ [De la Fuente, J.M., Berry, C.C., Riehle, M.O., Curtís, S.G. *Nanoparticle Targeting at Cells. Langmuir.* **22**, 3286-3293 (2006)] demostrando una adsorción similar de la tiopronina

Au@	2925	2852	1722	1644	1531	1384	1199	1014
Ag@	3257		1717	1638	1533			1075
	3067	2900				1389	1212	1009

#### Estimulación de los receptores Toll-like (TLR) en la línea celular Raw 264.7 y cuantificación de IL-6

La línea celular procede de la European Collection (ECACC, Porton Down, Wiltshire, UK). Las condiciones de cultivo son las estándares y utilizadas previamente. Los cultivos se llevan a cabo en placas de 12 pocillos en un volumen final de 2 mL. Los macrófagos se tratan durante 24 horas con los ligandos específicos de TLRs a la concentración previamente optimizada en ausencia o en presencia de 10 ppm de Ag@. La lista de ligandos y concentraciones finales utilizadas se indican a continuación: Lipopolisacárido (1  $\mu\text{g/mL}$  LPS. *E. coli* serotype 0127:B8, Sigma, St. Louis, MO, USA), Oligodeoxinucleótidos con motivos CpG no metilados (1  $\mu\text{g/mL}$  CpG+. CpG-DNA 1668: 5'-TCCAT GACGTTCTGATGCT-3TIB MolBiol, Berlin, Germany), ácido poliinosínico:policidílico (50  $\mu\text{g/mL}$  poly I:C), ácido lipoteicoico (10  $\mu\text{g/mL}$  LTA), lipopéptido sintético bacteriano Pam<sub>3</sub>CSK4 (300 ng/mL), ADN bacteriano (10  $\mu\text{g/mL}$  DNA), lipoproteína sintética de micoplasma (1  $\mu\text{g/mL}$  FSL-1), peptidoglicano (10  $\mu\text{g/mL}$  PGN), imiquimod (10  $\mu\text{g/mL}$  IMQ) y ssRNA40 (0.25  $\mu\text{g/mL}$ ) se obtuvieron de InvivoGen, San Diego, CA, USA. Los sobrenadantes se guardan tras 24 horas de tratamiento y se mide la producción de IL-6 mediante ELISA convencional según las instrucciones del fabricante (OptEIA Mouse IL-6 set, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA).

#### Estudios de citotoxicidad

Se ha usado el sistema de detección de la enzima lactate deshidrogenasa (LDH) denominado Cytotoxicity Detection kit (Roche Basel, Switzerland). La proliferación se mide mediante la cuantificación de la reducción del 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) mediante el sistema provisto por Roche Basel, Suiza.

#### Resultados relativos a los efectos citotóxicos

Se caracterizaron los efectos citotóxicos mediante la cuantificación de la liberación de LDH en el medio y la cuantificación de la capacidad reductora de MTT. Ambos parámetros miden, respectivamente, la integridad de la membrana celular y la capacidad metabólica de las células y se ven comprometidos cuando la viabilidad celular se reduce. La Figura 2 muestra que las Ag@ (1-100 ppm) no tienen efectos citotóxicos sobre las células Raw 264.7, por tanto los efectos observados por las Ag@ no se deben a un compromiso de la viabilidad de las células Raw 264.7, sino a una alteración específica de las mismas en el sistema de señalización de los TLRs.

*Resultados de los estudios de cotratamiento*

Cuando se realizan estudios de co-tratamiento, se observa que las Ag@ no son agentes pro-inflamatorios ya que los niveles basales de producción de IL-6 no se vieron afectados (Figura 3). Es interesantes insistir en que las Ag@ son una mejor opción comparada con otras nanopartículas metálicas o cerámicas que sí producen un incremento en la secreción de citocinas pro-inflamatorias [Lucarelli, M. *et al.* Innate defence functions of macrophages can be biased by nano-sized ceramic and metallic particles. *Eur Cytokine Netw* 15, 339-46 (2004)].

Sin embargo, las Ag@ inhiben de forma diferente la secreción de IL-6 mediada por los TLRs localizados en la superficie celular (Figura 3A) o en los compartimentos endocíticos (Figura 3B). La presencia de Ag@ (10 ppm = 20 µg/106 cells) inhibió significativamente la secreción de IL-6 mediada por TLR2 (peptidoglicano) en un 55% o de TLR2/6 (ácido lipoteicoico) en un 77% si se compara con los valores obtenidos en presencia de los ligandos específicos de TLRs en ausencia de Ag@. El efecto inhibitor es patente en el caso de los TLRs situados en el compartimento endocítico, aunque de una forma menos acentuada (Figura 3B). La inhibición fue de un 22.5% en el caso del ligando de TLR3 (ácido poli[I:C]) o de un 31% en el caso de ligando para TLR9.

*Resultados de los estudios de pretratamiento*

Cuando los macrófagos se exponen, en un caso a Ag@ durante 24 h (10 ppm = 20 µg/106 cells) o en ausencia de las mismas como control, y posteriormente se estimulan con los diferentes ligandos de TLRs, el pretratamiento con Ag@ incrementó la producción de IL-6 en respuesta al ligando Pam3CSK4 (estimulación de TLR2/1) y al ligando FSL-1 (TLR2/6), en un 40% y un 31%, respectivamente (Figura 4A). Es decir, que el pretratamiento con nanopartículas produce un estado de susceptibilidad aumentada ante el mismo estímulo inmunológico. Asimismo, la estimulación con ligandos de TLR2 produce tras el pretratamiento con Ag@ una disminución del 37% en comparación con los controles no tratados (Figura 4A). Es de destacar que los pretratamientos producen una respuesta disminuida en el caso de ligandos de TLR3 o TLR9 (Figura 4B).

REIVINDICACIONES

5 1. Utilización de nanopartículas de metales nobles en la preparación de una composición inmunomoduladora, **caracterizada** porque las nanopartículas tienen un núcleo de plata de tamaño comprendido entre 1 y 100 nm recubierto con una monocapa de tiopronina.

10 2. Utilización de nanopartículas de metales nobles en la preparación de una composición inmunomoduladora según la reivindicación 1, **caracterizada** porque las nanopartículas tienen un núcleo de plata de tamaño comprendido entre 2 y 10 nm.

3. Utilización de nanopartículas de metales nobles en la preparación de una composición inmunomoduladora según la reivindicación 2, **caracterizada** porque las nanopartículas tienen un núcleo de plata de 5 nm.

15 4. Utilización de nanopartículas de metales nobles en la preparación de una composición inmunomoduladora según las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada** porque la composición inmunomoduladora actúa sobre los receptores TLR2, TLR2/6, TLR3 y TLR9.

20 5. Utilización de nanopartículas de metales nobles en la preparación de una composición inmunomoduladora según la reivindicación 4, para el tratamiento de patologías inflamatorias producidas por infecciones bacterianas, particularmente la meningitis.

25 6. Utilización de nanopartículas de metales nobles en la preparación de una composición inmunomoduladora según la reivindicación 4, para el tratamiento de patologías inflamatorias producidas por una sobreproducción de partículas víricas.

7. Utilización de nanopartículas de metales nobles en la preparación de una composición inmunomoduladora según las reivindicaciones 1 a 3 como moduladoras *ex vivo* en terapias celulares de carácter inmune donde se produce una transferencia de células.

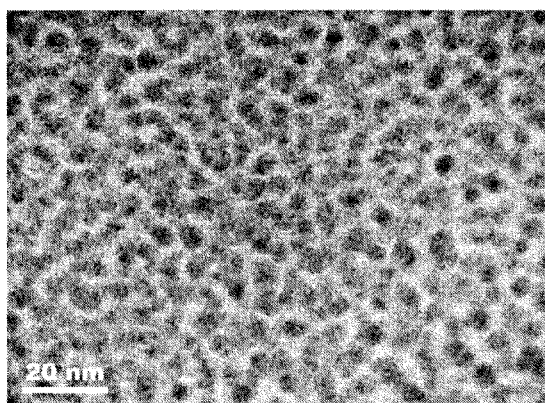
30 8. Utilización de nanopartículas de metales nobles en la preparación de una composición inmunomoduladora según las reivindicaciones 1 a 3 como coadyuvantes en protocolos de vacunación.

35 9. Composición inmunomoduladora para el tratamiento de patologías mediadas por los receptores TLR2, TLR2/6, TLR3 y TLR9, **caracterizado** porque dicha composición comprende nanopartículas con núcleo de plata de tamaño comprendido entre 1 y 100 nm recubiertas con una monocapa de tiopronina.

40 10. Composición inmunomoduladora para el tratamiento de patologías mediadas por los receptores TLR2, TLR2/6, TLR3 y TLR9 según la reivindicación 9, **caracterizado** porque las nanopartículas con núcleo de plata recubiertas con una monocapa de tiopronina tienen un tamaño comprendido entre 2 y 10 nm.

45 11. Composición inmunomoduladora para el tratamiento de patologías mediadas por los receptores TLR2, TLR2/6, TLR3 y TLR9 según la reivindicación 9, **caracterizado** porque las nanopartículas con núcleo de plata recubiertas con una monocapa de tiopronina tienen un tamaño de 5 nm.

A



B

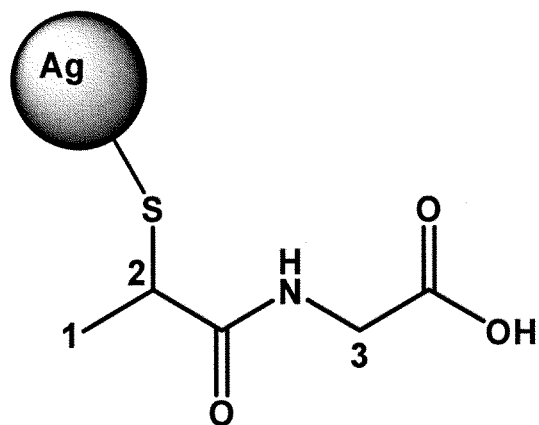


Figura 1



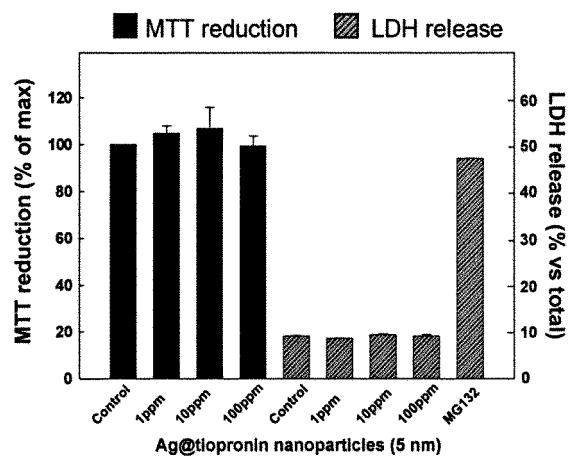
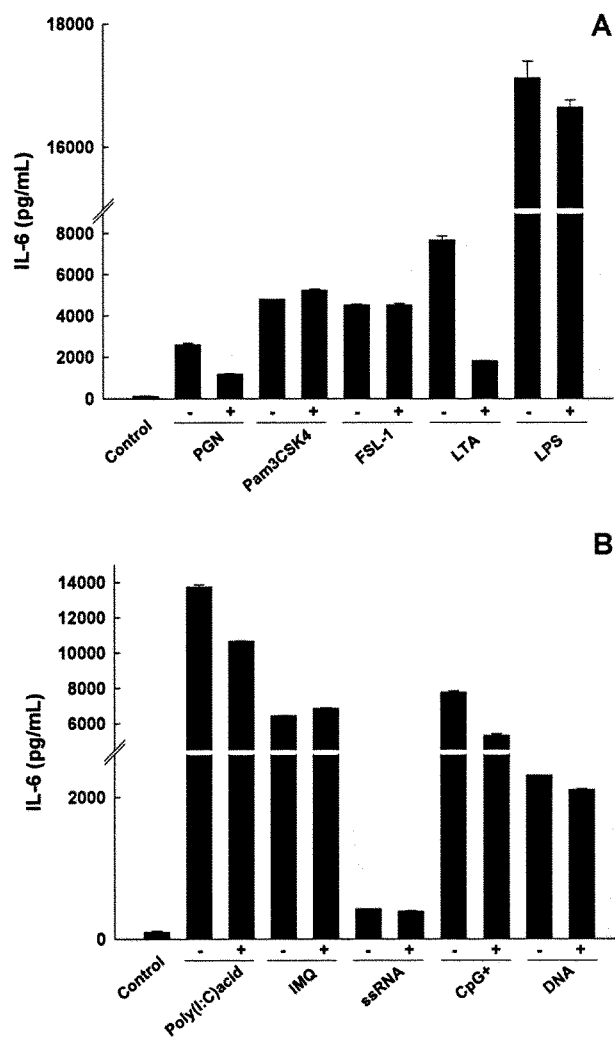


Figura 2



**Figura 3**

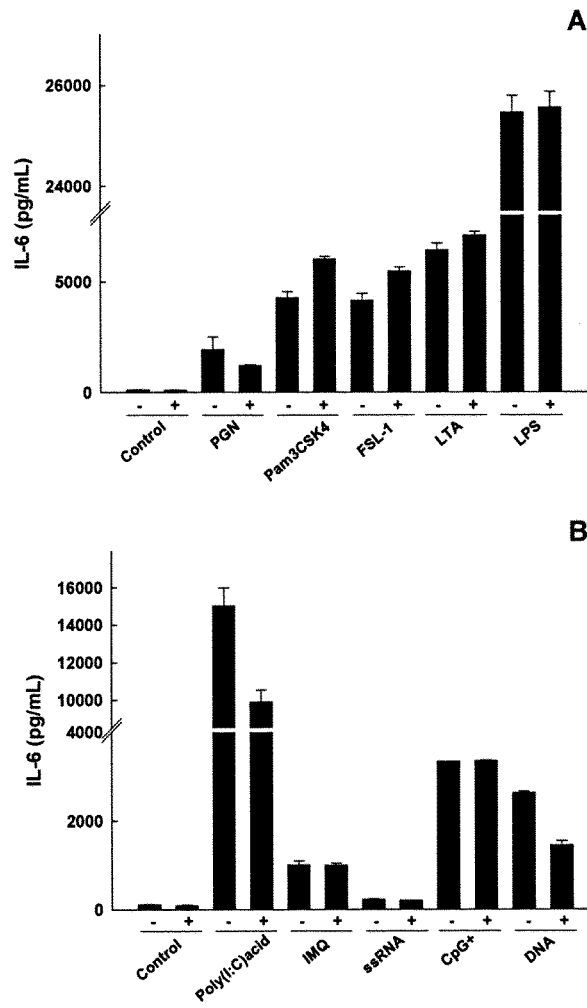


Figura 4



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 335 852

② Nº de solicitud: 200802831

③ Fecha de presentación de la solicitud: 02.10.2008

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 5928958 A (PILGRIMM HERBERT ) 27.07.1999.	1-4
X	WO 2008008483 A2 (UNIV MICHIGAN) 17.01.2008.	1-4.
X	WO 2007025274 A2 (BOSTON SCIENT SCIMED INC) 01.03.2007.	1-4.
X	Zheng M. et al. "Nanoparticles comprising a mixed monolayer for specific bindings with biomolecules". Journal of the American Chemical Society. 29.09.2004. Vol. 126, N°. 38, páginas 12047 - 12054. ISSN 0002-7863 (print)	5-11.

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

09.03.2010

Examinador

J. Manso Tomico

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K 47/48** (2006.01)

**A61K 9/51** (2006.01)

**A61P 37/02** (2006.01)

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

A61K, A61P

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, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, NPL

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 09.03.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	9-11	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	1-4	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones		<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	1-11	<b>NO</b>

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

**Base de la Opinión:**

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

**1. Documentos considerados:**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 5928958 A	27-07-1999
D02	WO 2008008483 A2	17-01-2008
D03	WO 2007025274 A2	01-03-2007
D04	Zheng M. et al. "Nanoparticles comprising a mixed monolayer for specific bindings with biomolecules". Journal of the American Chemical Society. 29.09.2004. Vol. 126, N°. 38, páginas 12047 - 12054. ISSN 0002-7863 (print)	29-09-2004

**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 divulga la utilización de una nanopartícula recubierta con una monocapa de tiopronina para la preparación de una composición inmunomoduladora y la composición en sí.

Las reivindicaciones 1-4 hacen referencia a la utilización de nanopartículas de metales nobles para la preparación de una composición inmunomoduladora que actúe sobre los receptores TLR2, TLR2/6, TLR3 y TLR9 caracterizadas por parámetros estructurales de la partícula. Esta forma de reivindicar carece de claridad y concisión a la hora de considerar la totalidad de la materia reivindicada.

D01 divulga partículas supramagnéticas que pueden ser utilizadas para el tratamiento de tumores, a través de la activación del sistema inmune. Además el mismo documento menciona que uniéndolas a virus, bacterias o células, las partículas supra magnéticas se pueden emplear para la activación del sistema inmune. Por tanto, este documento anteriorizaría las reivindicaciones 1-4, puesto que, dada la falta de claridad y concisión de las mismas, el objeto de la materia reivindicada en las mismas, se limitaría al uso de nanopartículas de metales nobles para la preparación de una composición con capacidad inmunomoduladora. Por tanto, no cumplirían con el requisito de novedad.

D01 no divulga específicamente una composición inmunomoduladora que comprenda una nanopartícula del tamaño definido y recubierta de tiopronina, por lo que las reivindicaciones 9-11 sí serían nuevas.

D04 divulga unas nanopartículas que comprenden un núcleo de oro protegidas por una monocapa de tri(etilen glycol) tiol (EG3-SH) y tiopronina para la unión específica de biomoléculas. La diferencia entre este documento y el objeto de las reivindicaciones 9-11 sería el tamaño de la partícula que forma la composición inmunomoduladora. Sin embargo, esa diferencia no parece ser la responsable del efecto técnico obtenido, es decir la capacidad de inmunomodulación (que sería debida, más bien, al ligando específico que portase la nanopartícula). Así pues, el problema que plantearía la invención sería la provisión de nanopartículas con tiopronina alternativas a las ya existentes, que de por sí no serían inventivas.

Las reivindicaciones 5-8 no están basadas enteramente en la descripción. Por tanto, el objeto de tales reivindicaciones es meramente especulativo y carecería de actividad inventiva, al considerarse como reivindicaciones caracterizadas por el resultado a obtener.