(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 385 241**

(21) Número de solicitud: 201000165

(51) Int. Cl.:

C01G 99/00 (2010.01)
B82Y 40/00 (2011.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN B1

(22) Fecha de presentación:

05.02.2010

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

20.07.2012

Fecha de la concesión:

01.08.2013

(45) Fecha de publicación de la concesión:

13.08.2013

(73) Titular/es:

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
Plaza de Santa Cruz, 8
47002 Valladolid (Valladolid) ES

(72) Inventor/es:

ÁLVAREZ RODRÍGUEZ, Rubén;
RODRÍGUEZ CABELLO, José Carlos;
GIROTTI, Alessandra;
ALONSO RODRIGO, Matilde y
ARIAS VALLEJO, Javier

(54) Título: **NANOPARTICULAS LUMINISCENTES FUNCIONALIZADAS QUE COMPRENDEN UN SISTEMA SOLUBLE EN MEDIO ACUOSO CAPAZ DE AUTO-ENSAMBLARSE DE MANERA REVERSIBLE EN FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA.**

(57) Resumen:

Nanopartículas luminiscentes funcionalizadas que comprenden un sistema soluble en medio acuoso capaz de auto-ensamblarse de manera reversible en función de la temperatura.

La presente invención se refiere a nanopartículas luminiscentes que comprenden un núcleo de material cristalino luminiscente estabilizado por un recubrimiento específico de origen recombinante y a su síntesis. Además se refiere también a nanopartículas luminiscentes que muestran la propiedad de auto-ensamblaje reversible en función de la temperatura del medio. Las nanopartículas pueden ser utilizadas como sensores multi-respuesta para aplicaciones biomédicas ya que son capaces de emitir luz además de detectar variaciones de temperatura dentro de los parámetros utilizados en análisis y estudios biológicos. Las nanopartículas pueden ser utilizadas como unidades discretas de transporte y vehiculización de metales nanométricos mediante la formación de estructuras globulares de escala submicro-métrica para la creación de nano y micro dispositivos inteligentes en aplicaciones tecnológicas, biotecnológicas y biomédicas.

ES 2 385 241 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

NANOPARTÍCULAS LUMINISCENTES FUNCIONALIZADAS QUE COMPRENDEN UN SISTEMA SOLUBLE EN MEDIO ACUOSO CAPAZ DE AUTO-ENSAMBLARSE DE MANERA REVERSIBLE EN FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA

La presente invención se refiere a nanopartículas luminiscentes, en particular a nanopartículas foto-luminiscentes que comprenden un núcleo de material cristalino luminiscente estabilizado por un recubrimiento específico de origen recombinante y a su síntesis. La presente invención también se refiere a nanopartículas luminiscentes que muestran la propiedad de auto-ensamblaje reversible en función de la temperatura del medio. Las nanopartículas pueden ser utilizadas como sensores multi-respuesta para aplicaciones biomédicas ya que son capaces de emitir luz ademas de detectar variaciones de temperatura dentro de los parámetros utilizados en análisis y estudios biológicos. Las nanopartículas pueden ser utilizadas como unidades discretas de transporte y vehiculización de metales nanométricos mediante la formación de estructuras globulares de escala submicro-métrica para la creación de nano y micro dispositivos inteligentes en aplicaciones tecnológicas, biotecnológicas y biomédicas.

Antecedentes de la presente solicitud

Las nanopartículas, es decir las partículas que muestran dimensiones inferiores a un micrómetro han atraído un gran interés tanto en investigación como en industria debido a las propiedades especificas que muestran en relación con su tamaño nanoscópico. La incorporación de nanopartículas en aplicaciones tecnológicas ha permitido el desarrollo y mejora de nuevos productos que abarca desde dispositivos opto-electrónicos hasta sofisticadas sondas inteligentes empleadas en aplicaciones biomédicas [1, 2].

En particular, los nanomateriales luminiscentes poseen cualidades ideales para futuras aplicaciones en señalización y detección. Entre los mas destacados podemos encontrar los derivados de metales semi-conductores conocidos como “quantum dots” (literalmente traducido como “puntos cuanticos”) y los nanocristales de sales de “tierras raras” que contempla según la IUPAC (International Union of Pure Applied Chemistry) los elementos de la serie del lantano incluyendo los elementos del grupo tres (como por ejemplo el Sc, Y, La) [1-6].

Los nanomateriales luminiscentes son excelentes candidatos para aplicaciones biomédicas de señalización y detección ya que pueden ser inyectados de manera intradermal o intravenosa [6]. En particular se prefieren materiales que no produzcan daño a tejidos biológicos circundantes debido a su luminiscencia, que posean una baja auto-fluorescencia y una alta emisión que permita penetrar y atravesar los tejidos, que muestren baja o nula toxicidad. En este aspecto las propiedades de luminiscencia ofrecidas por los nanocristales de sales de lantánidos dopadas (NSLD) son ideales para aplicaciones biomédicas descartando el uso de alternativas basadas en quantum dots que presentan niveles de toxicidad hasta de 1000 veces superior [6].

Desafortunadamente, los NSLD muestran una solubilidad muy baja en medio acuoso lo cual reduce el numero de aplicaciones y limita su uso para fines biomédicos y biológicos. Una gran ventaja contemplaría la síntesis de NSLD solubles en medio acuoso. Existen en la literatura trabajos recientes centrados en la producción de NSLD solubles en agua aunque de manera general este campo se encuentra todavía prácticamente inexplorado [7]. También es interesante el trabajo de Jan W. Stouwdam y Frank C. J. M. van Veggel quienes ya han publicado la preparación de nanopartículas de LaF_3 dopadas con Er^{3+}, Nd^{3+} y Ho^{3+} las cuales muestran excelentes propiedades de luminiscencia para innovadoras aplicaciones ópticas donde el silicio se comportaría como transparente [8]. Sin embargo, la síntesis de nanopartículas luminiscentes basadas en lantánidos todavía esta poco explorada. Diferentes aproximaciones ya han abordado su producción y modificación mediante el uso de recubrimientos con el objetivo de mejorar sus propiedades y aumentar así su versatilidad. En este sentido la preparación de materiales híbridos constituidos por la combinación de lantánidos junto con macromoléculas como polímeros, proteínas y anticuerpos han dado lugar a la producción de nuevos materiales luminiscentes y agentes de contraste para aplicaciones de resonancia magnetica [9-13].

Por otro lado los autores de la presente invención ya han publicado trabajos relacionados con la producción de materiales híbridos basados en la combinación de nanopartículas y biopolímeros que también han facilitado el desarrollo de una patente (P200900418). En particular, el estudio de la interacción entre polímeros derivados de la elastina (PDE) y nanopartículas de oro ha dado lugar al desarrollo de sensores [14]. Los PDE son biopolímeros biocompatibles y biodegradables. Esto supone una ventaja a la hora de su

utilización en aplicaciones biomédicas. Además, los PDE exhiben un comportamiento reversible de agregación-expansión de su estructura molecular en función de la variación de propiedades del medio como temperatura, pH, concentración iónica, entre otras [15, 16]. Los PDE muestran en su fase condensada uno de los factores más relevantes de su naturaleza inteligente: auto-ensamblaje en función de múltiples estímulos. Dicha característica o propiedad has sido ya explotada para el desarrollo y creación de superficies inteligentes [17]. Los PDE son además materiales que muestran una excelente biocompatibilidad tanto en disolución como entrecruzados en forma de hidrogeles [18]. Recientemente han sido publicadas aplicaciones de PDE como vehículos de transporte y liberación controlada de fármacos [19]. De manera paralela, la conceptualización de plataformas de PDE han sido hasta la fecha, una contribución sustanciosa para el avance de la medicina regenerativa a nivel de control del crecimiento y proliferación celular para la creación y reparación de tejidos [20].

Actualmente existen en la literatura un escaso número de biomateriales luminiscentes basados en NSLD a pesar de la gran versatilidad que presenta el uso de biopolímeros (como por ejemplo los PDE) como componentes de sistemas híbridos.

Una gran ventaja contemplaría la síntesis de NSLD solubles en medio acuoso. Además, otra gran ventaja seria la producción de NSLD inteligentes que muestren una solubilidad reversible en medio acuoso con el fin de facilitar su aislamiento, purificación y dosificación en funcion de parámetros como la temperatura del medio.

Resumen de la presente invención

Nanopartículas luminiscentes que comprenden:

a) un núcleo compuesto por una sal metálica luminiscente, opcionalmente dopada, seleccionada entre fluoruros y rodeada por:

b) un revestimiento compuesto de un PDE

así como el procedimiento para la preparación de estas nanopartículas, comprendiendo dicho procedimiento una única etapa de preparación en medio homogéneo acuoso y a temperaturas inferiores a 75 °C.

También la presente invención contempla la naturaleza inteligente mostrada por las nanopartículas las cuales son capaces de auto-ensamblarse en forma de estructuras globulares-circulares y en función de la temperatura.

Figuras

La Figura 1 muestra la secuencia del PDE de origen recombinante utilizado en el modo preferido de realización para funcionalizar las nanopartículas. Su estructura incluye la siguiente secuencia aminoacídica: C-[(VPGVG)$_2$(VPGEG)(VPGVG)$_2$]$_{15}$
Donde las letras C, V, P, G, E corresponde con los aminoácidos cisteína, valina, prolina, glicina y ácido glutámico, respectivamente.

La Figura 2 muestra una disolución incolora de nanopartículas luminiscentes funcionalizadas (derecha) junto a una muestra de referencia que contiene agua (izquierda).

La Figura 3 muestra una disolución turbia que contiene nanopartículas luminiscentes funcionalizadas en una fase condensada formada por el auto-ensamblamiento de las nanopartículas inducido por la temperatura (derecha) junto a una muestra de referencia que contiene agua a la misma temperatura (izquierda).

La Figura 4 muestra un difractograma de rayos X obtenido para las nanopartículas luminiscentes funcionalizadas y que reproduce índices de Miller comparables a aquellos obtenidos para la estructura cristalina de LaF_3.

La Figura 5 muestra una micrografía de electrónica de transmisión de las nanopartículas luminiscentes funcionalizadas. La barra de escala representa 20 nm.

La Figura 6 muestra los espectros de infrarrojos (FT-IR) de las nanopartículas luminiscentes funcionalizadas y del PDE.

La Figura 7 muestra un análisis termogravimétrico (TGA) obtenido para las nanopartículas luminiscentes funcionalizadas llevado a cabo bajo atmósfera de nitrógeno.

La Figura 8 muestra una estructura globular que representa la capacidad de auto-ensamblaje mostrada por nanopartículas luminiscentes funcionalizadas obtenida mediante la técnica Cryo-TEM. La barra de escala corresponde con 200 nm.
La Figura 9 muestra una estructura globular que representa la capacidad de auto-ensamblaje mostrada por nanopartículas luminiscentes funcionalizadas obtenida mediante la técnica Cryo-TEM. La barra de escala corresponde con 200 nm.

La Figura 10 muestra una distribución uniforme de nanopartículas luminiscentes funcionalizadas tomada a baja temperatura (4 °C) y obtenida al descongelar la muestra analizada en la Figura 8 y 9 (tomada a 40 °C) donde no se observan las caracteristicas estructuras globulares observadas a alta temperatura (Figura 8 y 9). La micrografía fue obtenida mediante la técnica Cryo-TEM. La barra de escala corresponde con 200 nm.

La Figura 11 muestra el espectro de excitación obtenido para las nanopartículas luminiscentes funcionalizadas dentro del rango de longitudes de onda entre 300 y 550 nm.

La Figura 12 muestra el espectro de emision obtenido para las nanopartículas luminiscentes funcionalizadas dentro del rango de longitudes de onda entre 500 y 700 nm.

Descripción detallada de la presente invención

Las partículas luminiscentes, en particular, las nanopartículas foto-luminiscentes que son objeto de la presente invención comprenden un núcleo hecho de sal metálica inorgánica luminiscente, opcionalmente dopada, seleccionada entre fluoruros de sales de tierras raras. Las nanopartículas descritas en la invención están caracterizadas por su propiedad de luminiscencia, la cual permite posterior a la absorción de energía (por ejemplo en

forma de electrones, fotones...etc) se produzca un fenómeno de emisión energética en forma de luz de menor intensidad que la radiación absorbida. Se debe de entender que el término "luminiscente" incluye la propiedad mas específica y preferida que se corresponde con foto-luminiscente.

La fotoluminiscencia se entiende como la capacidad la sal metálica inorgánica de absorber unidades discretas de energía de una longitud de onda determinada y emitir energía en forma de luz de longitud de onda mayor y por lo tanto menor energía. El periodo de tiempo de emisión de luz se pude corresponder a tiempos de vida del estado excitado que para las sales de lantánidos puede llegar al orden de milisegundos (por ejemplo 1-20 ms).

El dopante se corresponde con un metal que se encuentra en proporciones relativas respecto a los principales componentes de la nanopartícula metálica. La cantidad de dopante que constituyen las nanopartículas luminiscentes debe de estar dentro de un margen mínimo y máximo. Cuando se excede este límite superior se puede producir un fenómeno de desactivación de la luminiscencia por concentración que esta directamente relacionado con la distancia entre átomos dopantes en la estructura reticular. Preferiblemente este material dopante no debe de suponer una cantidad superior al 20 % en moles de la composición de la nanopartícula.

El tipo de metal dopante a incorporar debe de ser capaz de convertir los fotones absorbidos en radiación luminiscente. Así pues, se pueden usar metales de transición como el Cr, Ag, Cu, Co, Mn, aunque se prefiere el uso de metales lantánidos puesto que la luminiscencia mostrada por los lantánidos es particularmente independiente del entorno reticular donde se ubica. Generalmente se prefiere el uso de metales lantánidos divalentes o trivalentes (estado de oxidación II y III respectivamente) y preferiblemente el estado de oxidación III como por ejemplo el Eu^{3+} ya que emiten luz en forma de bandas relativamente estrechas respecto de los divalentes que muestran una absorción relativamente fuerte pero unas bandas de emisión relativamente mas anchas.

La síntesis de nanopartículas cristalinas funcionalizadas se llevó a cabo basándose en el método utilizado por Wang y *col.* modificado por los autores de la presente invención [4]. La síntesis del PDE utilizado en el modo de realización preferido ya ha sido descrita en la literatura por los autores de la presente invención [15]. La estructura del PDE utilizado en el modo de realización preferido de la invención está incluido en la Figura 1

y corresponde con la siguiente secuencia aminoacídica C-$[(VPGVG)_2(VPGEG)(VPGVG)_2]_{15}$ donde las letras C, V, P, G, y E corresponden con los aminoácidos cisteína, valina, prolina, glicina y ácido glutámico respectivamente. La síntesis de las nanopartículas luminiscentes funcionalizadas objeto de la presente invención se obtuvieron siguiendo los siguientes pasos. Se disolvieron las sales $La(NO_3)_3$ (0.20 g, 4.635 x 10^{-4} M), $EuCl_3$ (8.3 mg, 2.265 x 10^{-5} M) en 2 mL de agua y después se añadió una disolución acuosa de PDE (30.0 mg, 9.4 x 10^{-7} mol en 1 ml de H_2O). La disolución resultante fue agitada a 75 °C unos minutos (por ejemplo 5 minutos). Posteriormente, se añadió 1 mL de una disolución acuosa de NH_4F (62.7 mg, 1.49 x 10^{-3} M) manteniendo la agitación. Los reactivos son solubles en medio acuoso, luego no es necesario el uso de co-disolventes ni de agentes de transferencia de fase para que la reacción y el crecimiento cristalino tengan lugar. La disolución resultante fue agitada durante 2 horas a 75 °C. Posteriormente, la fase acuosa de la reacción fue decantada del resto de los productos de reacción constituidos principalmente por sólidos blancos de aspecto cristalino. La disolución decantada incolora contiene las nanopartículas luminiscentes y fueron purificadas mediante un proceso de centrifugación a baja temperatura para eliminar partículas sólidas no solubles en la fase acuosa. En este aspecto cabe destacar que las disoluciones de las nanopartícula luminiscentes funcionalizadas son incoloras a baja temperatura (como por ejemplo a 4 ° C) como muestra la Figura 2. La centrifugación se llevó a cabo durante 10 minutos a 10.000 rpm y a 4 °C. A continuación se procedió con las siguientes etapas de purificación que comprendieron con tres ciclos de precipitación-centrifugación-redisolución. Un ciclo comienza con la precipitación de las nanopartículas luminiscentes funcionalizadas presentes en la fase acuosa. La precipitación se llevó a cabo a 40 °C y a pH ácido donde el producto forma una fase condensada como la mostrada en la Figura 3. Posteriormente esta disolución condensada fue centrifugada (10 minutos, 10.000 rpm y a temperatura de 40 °C) donde se separaron las nanopartículas luminiscentes funcionalizadas del resto de la fase acuosa que contiene impurezas solubles en el disolvente. Entonces como ultima etapa del ciclo se separaron la parte acuosa que contiene impurezas de la parte sedimentada que contiene las nanopartículas luminiscentes funcionalizadas por decantación. En la ultima etapa del ciclo, el producto final sedimentado por centrifugación fue disuelto en agua fria Después de tres ciclos de precipitación-centrifugación-redisolución, las nanopartículas luminiscentes funcionalizadas fueron

purificadas mediante diálisis frente a agua ultrapura. La diálisis de las nanopartículas luminiscentes funcionalizadas fue llevada a cabo durante 48 horas (tripas de diálisis 12-14000 Dalton). Las nanopartícula luminiscentes funcionalizadas fueron obtenidas como un sólido de aspecto algodonoso de color blanco y con reflejos cristalinos después de la liofilización de la disolución dializada. La estructura y composición de las nanopartículas fue analizada por difracción de rayos X (Figura 4). El difractograma obtenido muestra máximos atribuibles a los índices de Miller o planos de reflexión correspondientes a la red cristalina del LaF_3 [4]. Las micrografías electrónicas de transmisión (TEM) de las nanopartículas luminiscentes funcionalizadas se corresponden con partículas amorfas de un tamaño comprendido entre 5 nm y 20 nm (Figura 5). Las partículas mostradas en la Figura 5 sugieren que el PDE actúa como monocapa estabilizante que impide la formación de agregados de mayor tamaño. El análisis de espectroscopia infrarroja (FT-IR) llevado a cabo para las nanopartículas luminiscentes funcionalizadas muestra las bandas de absorción características del material de partida PDE (Figura 6). La cantidad de PDE inmovilizado sobre la superficie de las nanopartículas fue estimado mediante TGA (análisis termogravimétrico). Mediante TGA se detectó que el contenido de PDE en las nanopartículas luminiscentes era de un 20 % en peso (Figura 7). La capacidad de auto-ensamblaje mostrada por las nanopartículas luminiscentes fue analizada por microscopía electrónica mediante la técnica Cryo-TEM. En la Figura 8 puede observarse que las nanopartículas luminiscentes funcionalizadas se encuentran agregadas en forma de estructuras globulares a temperaturas superiores a 25 grados (como por ejemplo a 40 °C). Las Figuras 8 y 9 muestran micrografías de las nanopartículas tomada a 40 °C donde puede observarse que las nanopartículas luminiscentes se auto-ensamblan en estructuras globulares de sección transversal en la escala submicro-métrica, preferiblemente en estructuras de sección transversal inferior a 700 nm. Las estructuras globulares no se observaron para las mismas muestras una vez descongeladas y analizadas a 4 °C como muestra la Figura 10 debido a que la capacidad de auto-ensamblaje de las nanopartículas es función de la temperatura. Por lo tanto, a baja temperatura las nanopartículas no están auto-ensambladas y se observan distribuidas de manera uniforme. La capacidad de auto-ensamblaje mostrada por las nanopartículas puede atribuirse totalmente al PDE utilizado en el modo preferido de realización. Este fenómeno reviste gran interés como un método de preparación y dosificación de nanopartículas luminiscentes en porciones discretas y en tamaños submicro-métricos.

Por otro lado, la preparación de materiales que muestran geometrías globulares de tamaño nanométrico en la fase condensada (tanto micelas como vesículas) son también interesantes para el desarrollo de nano-vehículos de transporte y descarga en aplicaciones biomédicas. Actualmente existe un numero creciente de materiales poliméricos tanto recombinantes [19], como sintéticos (copolímeros en bloque) [21-23] que presentan una alternativa muy ventajosa con respecto al tradicional uso de liposomas [24] en la conceptualización de nuevas plataformas de transporte biocompatibles que exhiben dimensiones por debajo de la escala submicro-métrica. Es este sentido, la obtención de materiales capaces de actuar como nano-contenedores presenta una gran perspectiva en el desarrollo de terapias basadas en la transferencia de: material genético, fármacos o nano-dispositivos; así como la creación de membranas artificiales, nano-reactores y biosensores [19, 25-28]. Además, las nanopartículas objeto de la presente invención son foto-luminiscentes y muestran excelentes propiedades ópticas tanto de excitación (Figura 11) en el rango de longitudes de onda entre 300 y 550 nm como de emisión (Figura 12) en el rango de longitudes de onda entre 500 y 700 nm. El objetivo de la presente invención se alcanza con una sonda de detección para aplicaciones biológicas y biomédicas la cual está basada en nanopartículas luminiscentes funcionalizadas constituidas por un núcleo inorgánico y un PDE que muestra la siguientes propiedades luminiscencia, solubilidad en agua y capacidad de auto-ensamblarse en función de la temperatura.

DESCRIPCIÓN DE LOS MODOS DE REALIZACIÓN ALTERNATIVOS DE LA INVENCIÓN

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

1-Nanopartícula con núcleo de sales de tierras raras

Las nanopartículas son generalmente partículas de tamaños nanoscópicos y que pueden mostrar geometrías variadas como octaedros, esferas, cilindros..etc. Los autores de la

presente invención han obtenido nanopartículas amorfas. La forma puede cubrir todas las posibilidades indicadas para nanopartículas. Tal y como aquí se utiliza el término, por partícula se entiende las de un tamaño de 500 nm o inferior, preferiblemente entre 1 y 30 nm y mas preferiblemente entre 5 y 20 nm. Se puede utilizar una serie de sales como núcleo de las nanopartículas. El material preferido en la presente invención son sales de elemento de la serie del lantano. De manera alternativa, el metal puede seleccionarse entre otros metales denominados tierras raras y que constituyen el grupo III como por ejemplo el Sc y el Y o los metales de la serie de los lantánidos (como por ejemplo: Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb).

2- El PDE (polímero derivado de elastina)

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

En el modo preferido de realización de la invención se ha seleccionado por grupo X el aminoácido acido glutámico. Sin embargo, no hay que entender que se excluye del marco de la presente invención otros aminoácidos (como por ejemplo los aminoácidos lisina y acido aspártico).

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

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

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

Bibliografía

1. Asryan LV. Theoretical investigation of factors controlling the operating characteristics of quantum dot lasers: a review. Journal of Nanophotonics 2009:3.
2. Mazumder S, Dey R, Mitra MK, Mukherjee S, Das GC. Review: Biofunctionalized Quantum Dots in Biology and Medicine. Journal of Nanomaterials 2009.
3. Ansari AA, Singh N, Singh SP. Optical properties of pyridine funtionalized TbF3 nanoparticles. Journal of Nanoparticle Research 2008:10(4):703-707.
4. Wang F, Zhang Y, Fan XP, Wang MQ. One-pot synthesis of chitosan/LaF3 : Eu3+ nanocrystals for bio-applications. Nanotechnology 2006:17(5):1527-1532.
5. Kramer KW, Biner D, Frei G, Gudel HU, Hehlen MP, Luthi SR. Hexagonal sodium yttrium fluoride based green and blue emitting upconversion phosphors. Chemistry of Materials 2004:16(7):1244-1251.
6. Chatterjee DK, Rufalhah AJ, Zhang Y. Upconversion fluorescence imaging of cells and small animals using lanthanide doped nanocrystals. Biomaterials 2008:29(7):937-943.
7. Wang JS, Bo SH, Song LM, Hu J, Liu XH, Zhen Z. One-step synthesis of highly water-soluble LaF3: Ln(3+) nanocrystals in methanol without using any ligands. Nanotechnology 2007:18(46).
8. Stouwdam JW, van Veggel F. Near-infrared emission of redispersible Er3+, Nd3+, and Ho3+ doped LaF3 nanoparticles. Nano Letters 2002:2(7):733-737.
9. Zech SG, Eldredge HB, Lowe MP, Caravan P. Protein binding to lanthanide(III) complexes can reduce the water exchange rate at the lanthanide. Inorganic Chemistry 2007:46(9):3576-3584.
10. Zhao LM, Yan B. Novel polymer-inorganic hybrid materials fabricated with in situ composition and luminescent properties. Journal of Non-Crystalline Solids 2007:353(52 54):4654-4659.
11. Carlos LD, Ferreira RAS, Bermudez VD, Ribeiro SJL. Lanthanide-Containing Light-Emitting Organic-Inorganic Hybrids: A Bet on the Future. Advanced Materials 2009:21(5):509-534.
12. Wang QM, Yan B. Molecular assembly of red and green nanophosphors from amine-functionalized covalent linking hybrids with emitting centers of Eu3+ and Tb3+ ions. Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry 2006:178(1):70-75.
13. Shu CY, Ma XY, Zhang JF, Corwin FD, Sim JH, Zhang EY, Dorn HC, Gibson HW, Fatouros PP, Wang CR, Fang XH. Conjugation of a water-soluble gadolinium endohedral fulleride with an antibody as a magnetic resonance imaging contrast agent. Bioconjugate Chemistry 2008:19(3):651-655.
14. Nath N, Chilkoti A. A colorimetric gold nanoparticle sensor to interrogate biomolecular interactions in real time on a surface. Analytical Chemistry 2002:74(3):504-509.

15. Girotti A, Reguera J, Arias FJ, Alonso M, Testera AM, Rodríguez-Cabello JC. Influence of the molecular weight on the inverse temperature transition of a model genetically engineered elastin-like pH-responsive polymer. Macromolecules 2004:37(9):3396-3400.
16. Urry DW. Physical Chemistry of Biological Free Energy Transduction As Demonstrated by Elastic Protein-Based Polymers. Journal of Physical Chemistry B 1997:101(51):11007-11028.
17. Reguera J, Fahmi A, Moriarty P, Girotti A, Rodríguez-Cabello JC. Nanopore formation by self-assembly of the model genetically engineered elastin-like polymer [(VPGVG)(2)(VPGEG)(VPGVG)(2)](15). Journal of the American Chemical Society 2004:126(41):13212-13213.
18. Martin L, Alonso M, Moller M, Rodriguez-Cabello JC, Mela P. 3D microstructuring of smart bioactive hydrogels based on recombinant elastin-like polymers. Soft Matter 2009:5(8):1591-1593.
19. Dreher MR, Simnick AJ, Fischer K, Smith RJ, Patel A, Schmidt M, Chilkoti A. Temperature triggered self-assembly of polypeptides into multivalent spherical micelles. Journal of the American Chemical Society 2008:130(2):687-694.
20. Girotti A, Reguera J, Rodríguez-Cabello JC, Arias FJ, Alonso M, Testera AM. Design and bioproduction of a recombinant multi(bio)functional elastin-like protein polymer containing cell adhesion sequences for tissue engineering purposes. Journal of Materials Science-Materials in Medicine 2004:15(4):479-484.
21. Opsteen JA, Cornelissen J, van Hest JCM. Block copolymer vesicles. Pure and Applied Chemistry 2004:76(7-8):1309-1319.
22. Qin SH, Geng Y, Discher DE, Yang S. Temperature-controlled assembly and release from polymer vesicles of poly(ethylene oxide)-block-poly(N-isopropylacrylamide). Advanced Materials 2006:18(21):2905-+.
23. Chen S, Yang B, Guo C, Ma JH, Yang LR, Liang XF, Hua C, Liu HZ. Spontaneous Vesicle Formation of Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)-Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymer. Journal of Physical Chemistry B 2008:112(49):15659-15665.
24. Yan W, Huang L. Recent advances in liposome-based nanoparticles for antigen delivery. Polym Rev 2007:47(3):329-344.
25. Cheng C, Wei H, Zhu JL, Chang C, Cheng H, Li C, Cheng SX, Zhang XZ, Zhuo RX. Functionalized thermoresponsive micelles self-assembled from biotin-PEG-b-P(NIPAAm-co-HMAAm)-b-PMMA for tumor cell target. Bioconjugate Chemistry 2008:19(6):1194-1201.
26. Sallach RE, Wei M, Biswas N, Conticello VP, Lecommandoux S, Dluhy RA, Chaikof EL. Micelle density regulated by a reversible switch of protein secondary structure. Journal of the American Chemical Society 2006:128(36):12014-12019.
27. Smart T, Lomas H, Massignani M, Flores-Merino MV, Perez LR, Battaglia G. Block copolymer nanostructures. Nano Today 2008:3(3-4):38-46.
28. Tokarev I, Minko S. Multiresponsive, Hierarchically Structured Membranes: New, Challenging, Biomimetic Materials for Biosensors, Controlled Release, Biochemical Gates, and Nanoreactors. Advanced Materials 2009:21(2):241-247.

REIVINDICACIONES

1. Nanopartículas luminiscentes que comprenden

(a) un núcleo hecho de una sal metálica luminiscente seleccionada entre fluoruros de tierras raras, entendiendo por tierras raras cualquiera de los elementos del grupo III escandio, itrio y lantano ademas de los elementos que constituyen la serie lantánida ya sea por separado o combinados entre si

(b) un recubrimiento constituido por un biopolímero de origen recombinante (PDE)

2. Nanopartículas luminiscentes según la reivindicación 1 que tienen un diámetro medio en relación a su eje más largo inferior a 20 nanómetros.

3. Nanopartículas luminiscentes según cuales quiera de las reivindicaciones anteriores, en las que el núcleo está hecho de un fluoruro de un metal o varios seleccionado entre sales de tierras raras y un dopante que es al menos uno de los siguientes elementos químicos: Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb.

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

5. Una nanopartícula según las reivindicaciones precedentes donde el agente estabilizador de las nanopartículas (por ejemplo el PDE) promueve la agregación de las nanopartículas de forma reversible en función de la temperatura del medio.

6. Una nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde su recubrimiento se forma por auto-estructuración durante la formación del núcleo.

7. Una nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que contiene varios cationes en la que al menos uno de ellos actúa como dopante.

8. Un método para producir nanopartículas luminiscentes incluye las siguientes etapas:

a) Disolver las sales de tierras raras en agua

b) Agitar

c) Añadir a una disolución acuosa de PDE

d) Agitar

e) Calentar a 75 °C

f) Agitar

g) Decantar

h) Purificar mediante etapas centrifugación-precipitación-redisolución

i) Purificar mediante diálisis

9. Un método para producir el ensamblaje reversible de las nanoparticulas luminiscentes en forma de nano-estructuras globulares discretas, incluye las siguientes etapas:

a) Todas las etapas de la reivindicacion 9

b) Acidificar la disolución a pH ácido

c) Aumentar la temperatura por encima de 25 °C

$C\text{-}[(VPGVG)_2(VPGEG)(VPGVG)_2]_{15}$

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

Figura 1

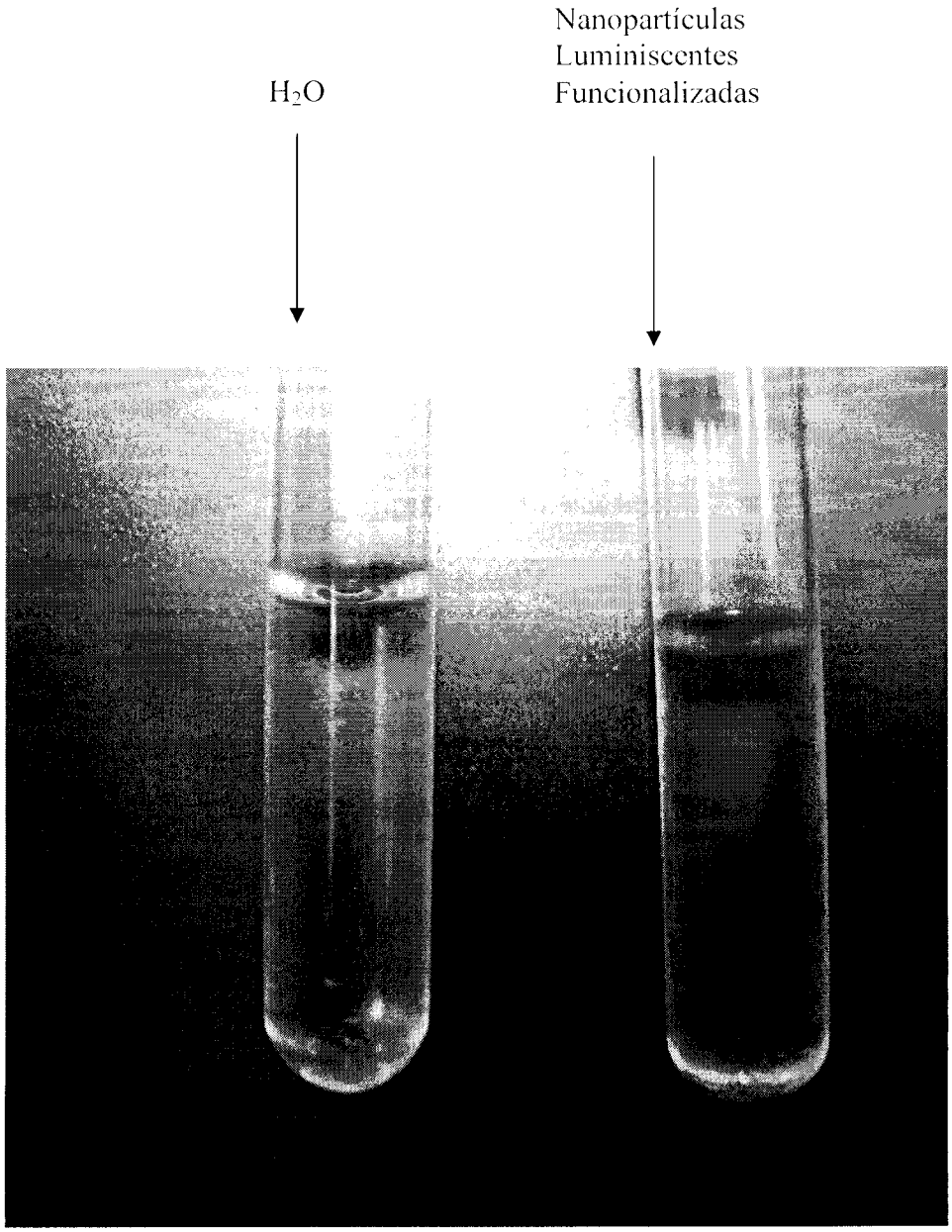


Figura 2

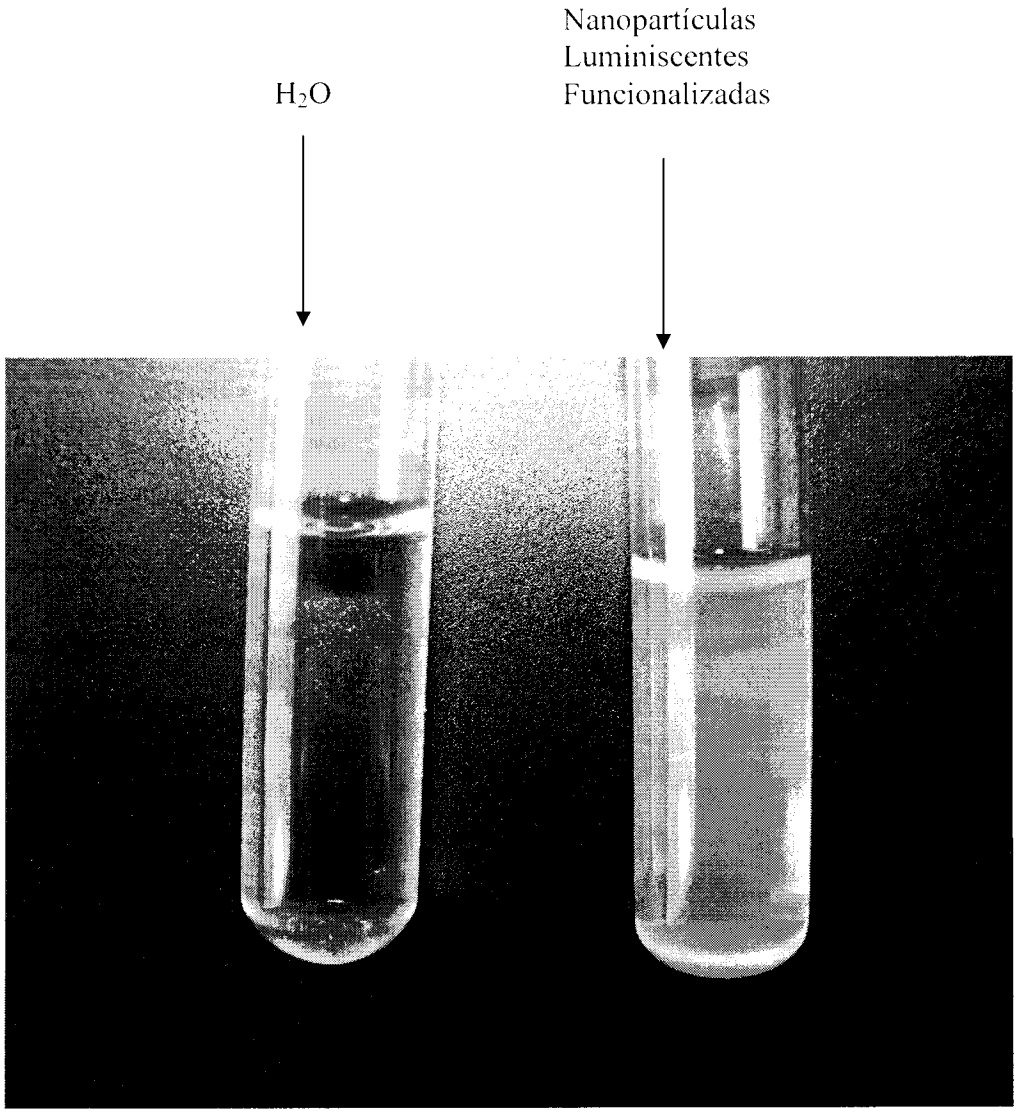


Figura 3

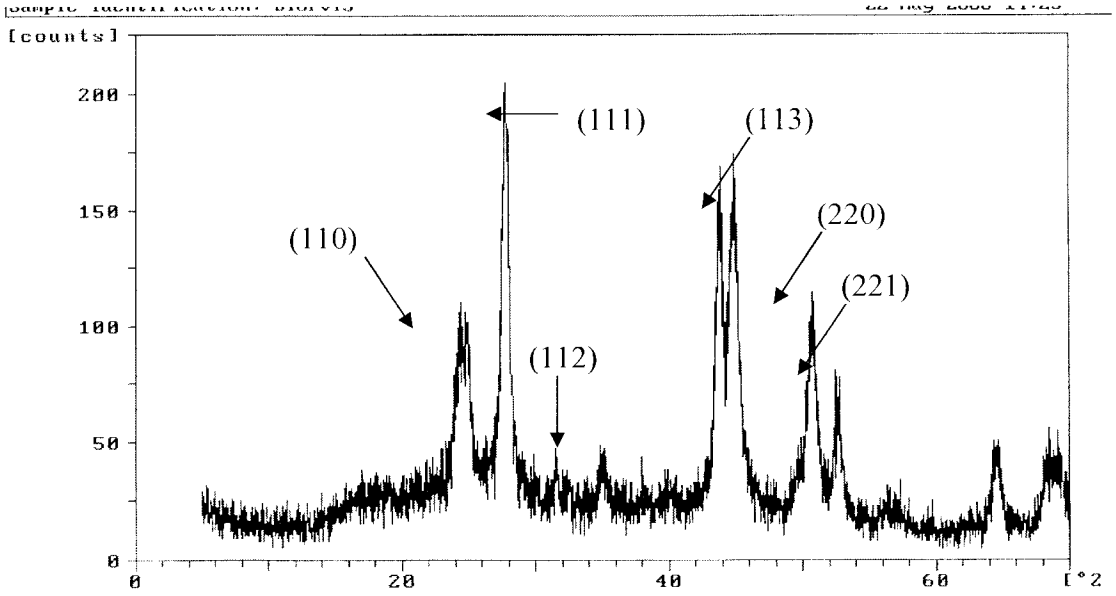


Figura 4

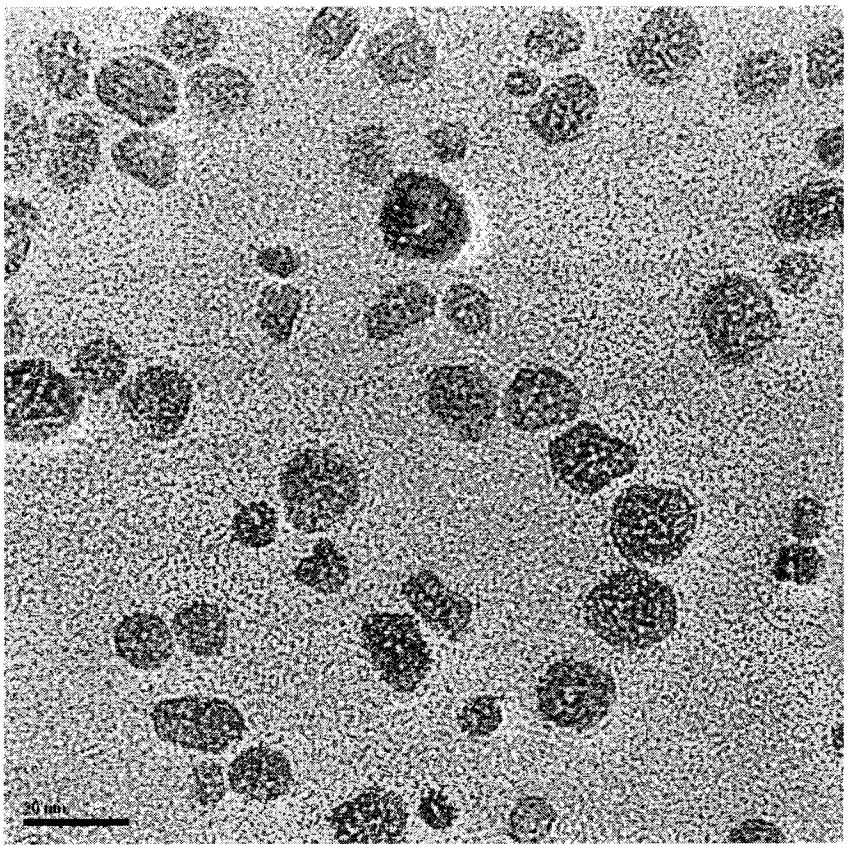


Figura 5

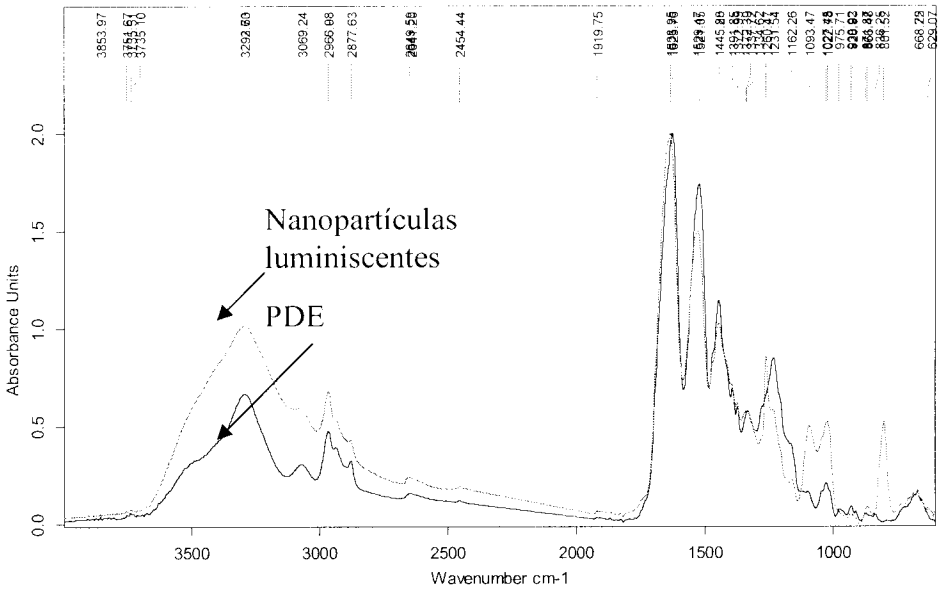
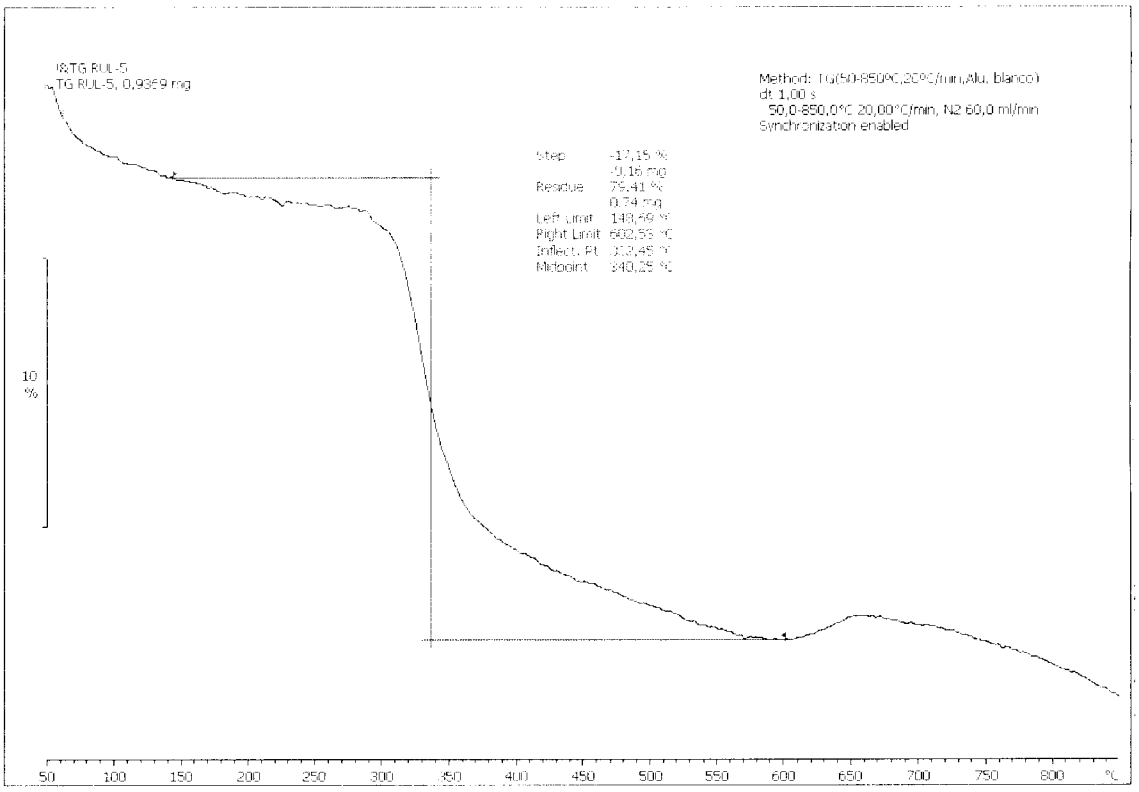

Nanopartículas
luminiscentes
PDE
Absorbance Units
Wavenumber cm-1
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
3500
3000
2500
2000
1500
1000
3853.97
3069.24
2966.08
2877.63
2454.44
1919.75
1445.89
1162.26
1093.47
975.71
668.28

Figura 6



LEICAL (Facultad de Ciencias): METTLER STAR® SW 9.20

Figura 7

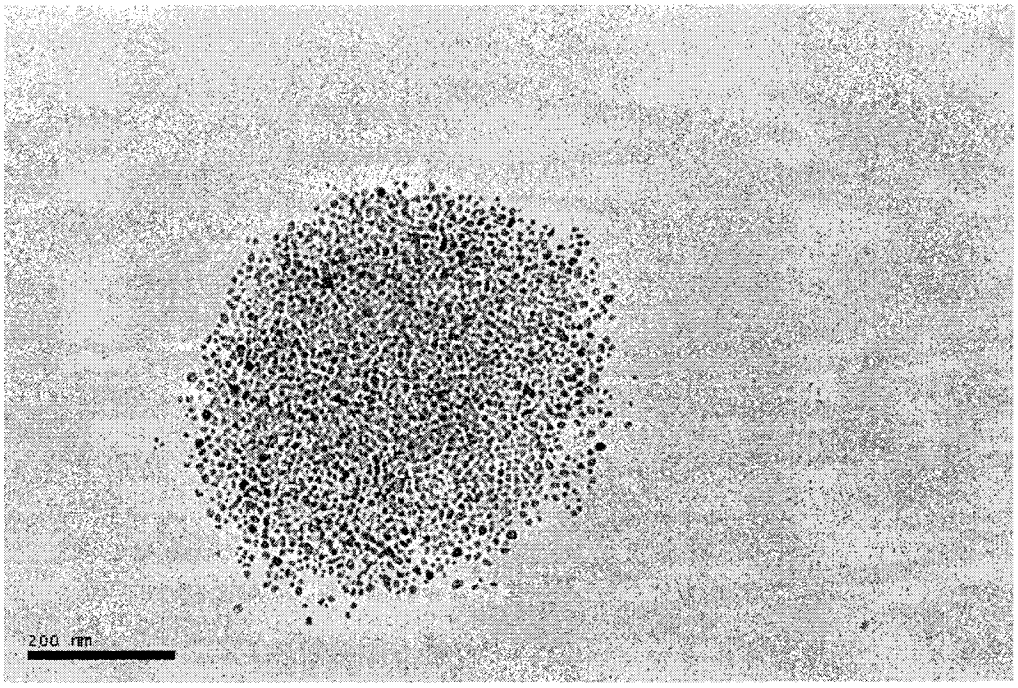


Figura 8

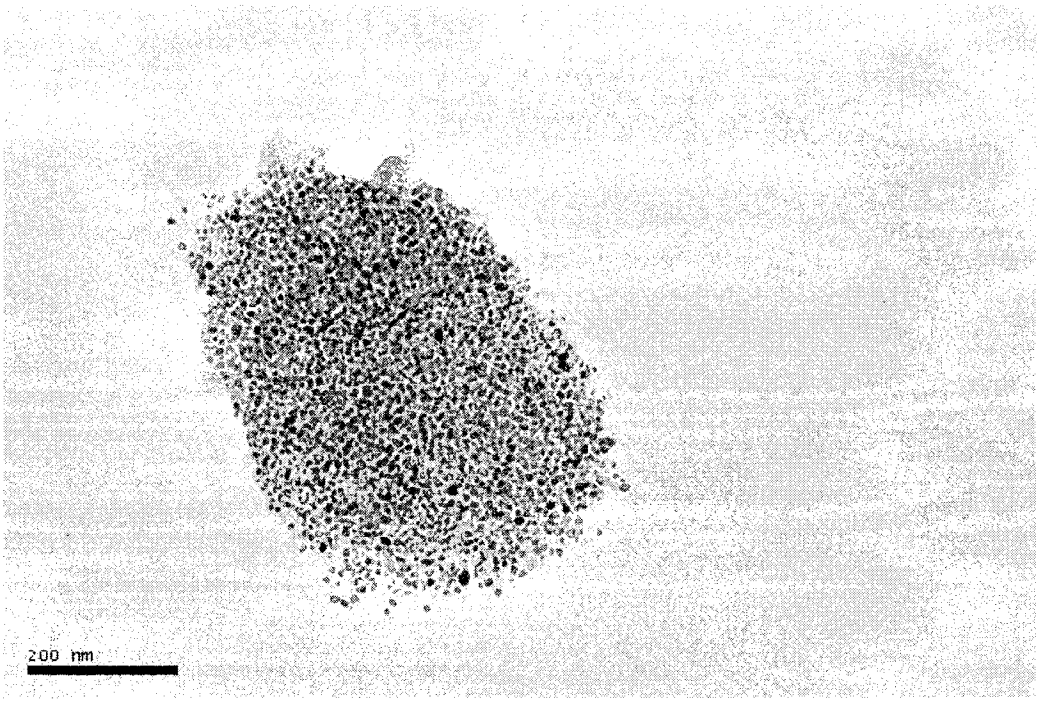


Figura 9

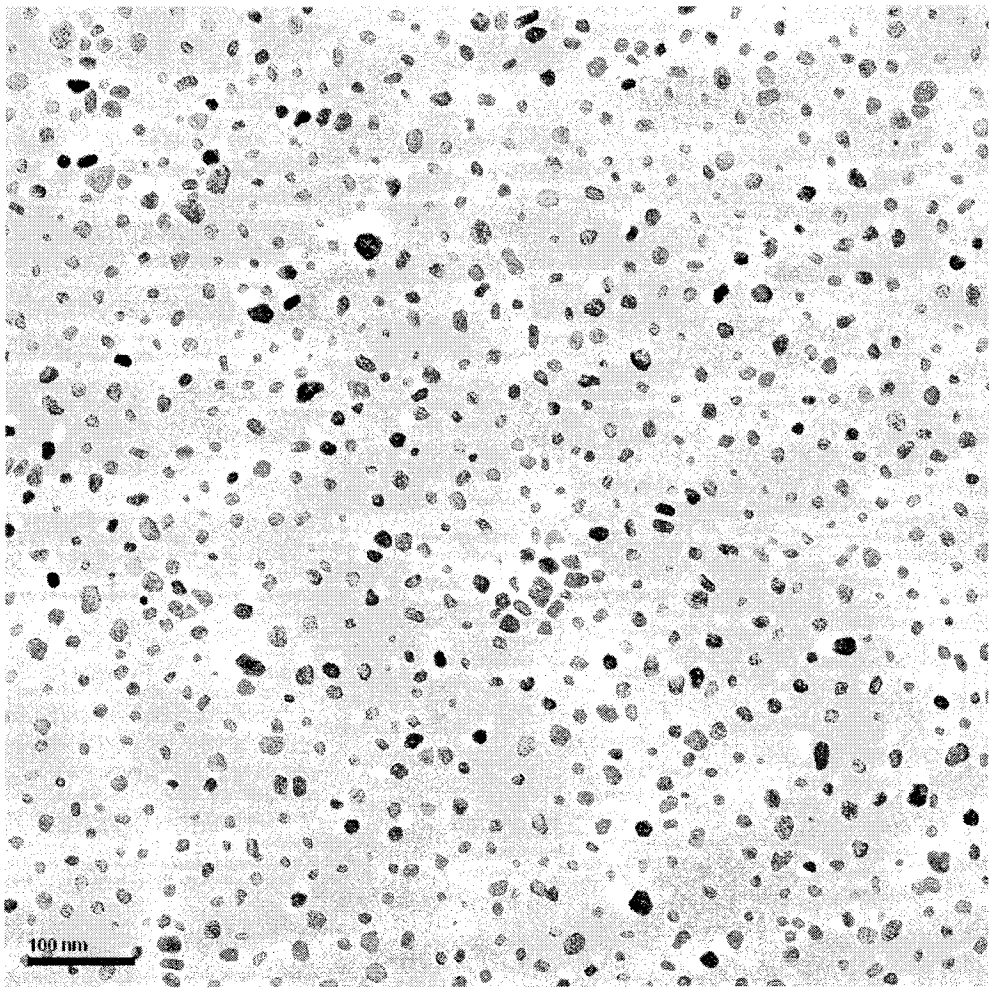


Figura 10

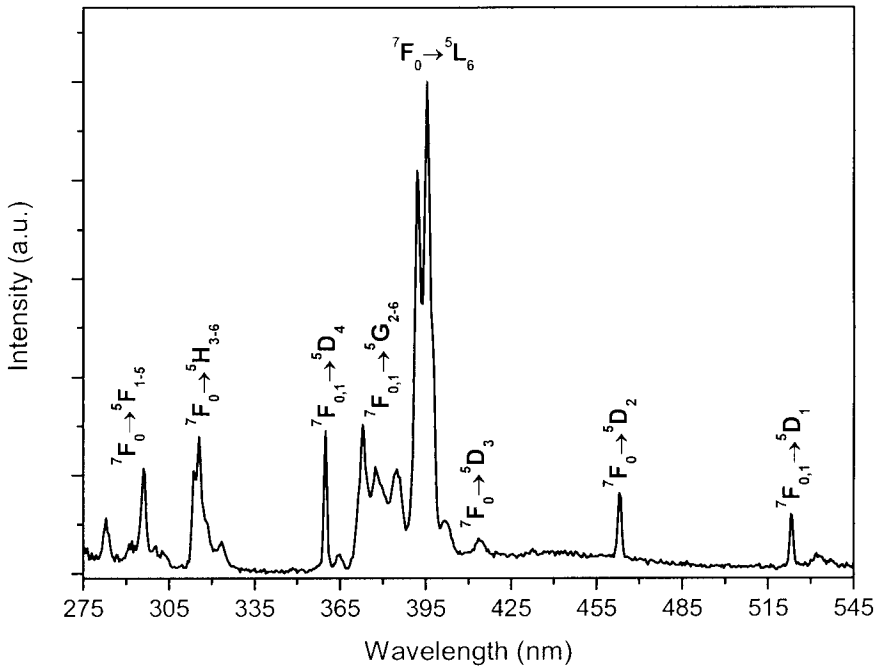

Intensity (a.u.)
Wavelength (nm)
275
305
335
365
395
425
455
485
515
545
$^7F_0 \rightarrow {}^5L_6$
$^7F_0 \rightarrow {}^5F_{1-5}$
$^7F_0 \rightarrow {}^5H_{3-6}$
$^7F_{0,1} \rightarrow {}^5D_4$
$^7F_{0,1} \rightarrow {}^5G_{2-6}$
$^7F_0 \rightarrow {}^5D_3$
$^7F_0 \rightarrow {}^5D_2$
$^7F_{0,1} \rightarrow {}^5D_1$

Figura 11

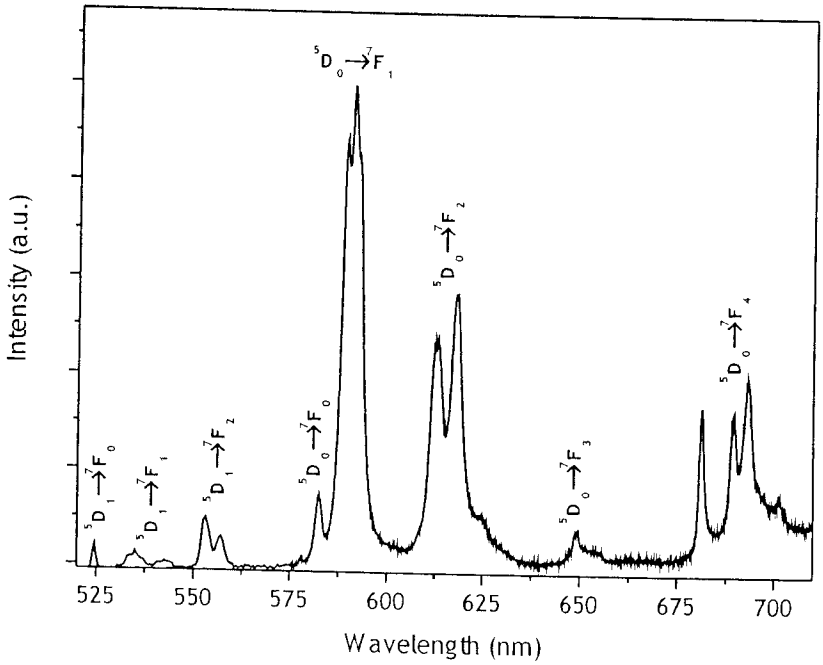

Intensity (a.u.)
Wavelength (nm)
525
550
575
600
625
650
675
700
$^5D_1 \rightarrow {}^7F_0$
$^5D_1 \rightarrow {}^7F_1$
$^5D_1 \rightarrow {}^7F_2$
$^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$
$^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$
$^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$
$^5D_0 \rightarrow {}^7F_3$
$^5D_0 \rightarrow {}^7F_4$

Figura 12

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201000165

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 05.02.2010

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** ***C01G99/00*** (2010.01)
B82Y40/00 (2011.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	WANG, F., ZHANG, Y., FAN, X., et al. One-pot synthesis of chitosan/LaF_3:Eu^3+ nanocrystals for bio-applications. Nanotechnology. 16.02.2006. Vol 17, páginas 1527-1532. ISSN 0957-4484.	1-9
Y	ALVAREZ-RODRIGUEZ, R., ALONSO, M., GIROTTI, A. et al. One-pot synthesis of pH and temperature sensitive gold clusters mediated by a recombinant elastin-like polymer. European Polymer Journal. 18 de Enero de 2010 (publicación online). Vol 46, Nº 4. Páginas 643-650. ISSN 0014-3057.	1-9
A	WANG, L., LI, P. y WANG, L. Luminiscent and hydrophilic LaF_3-polymer nanocomposite for DNA detection. Luminiscence, The Journal of Biological and Chemical Luminiscence. 08.09.2008. Vol 34, Páginas 39-44.	1-9
A	WANG, F., ZHANG, Y., FAN, X., et al. Facile synthesis of water-soluble LaF_3:Ln^{3+} nanocrystals. Journal of Materials Chemistry. 10.02.2006. Vol 16, página 1031.	1-9
A	STOUWDAM, J.W., VAN VEGGEL, F., Near-infrared Emission of Redispersible Er^{3+}, Nd^{3+}, and Ho^{3+} Doped LaF_3 Nanoparticles. 15.05.2002. Nano Letters, Vol 2, No. 7, páginas 733 y 734.	1-9
A	ALVAREZ-RODRÍGUEZ, R., ARIAS, F.J., SANTOS, M. et al. Gold Tailored Photosensitive Elastin-like Polymer: Synthesis of Temperature, pH and UV-vis Sensitive Probes. Macromolecular rapid communications. 22 de Enero de 2010 (publicación online). Vol 31, Nº 6. ISSN 1521-3927.	1-9

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	Examinador	Página
06.07.2012	A. Barrios de la Fuente	1/5

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

C01G, B82Y

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES,EPODOC, TXTE, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP, EMBASE, INSPEC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 06.07.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-9	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones		**SI**
	Reivindicaciones	1-9	**NO**

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WANG, F., ZHANG, Y., FAN, X., et al. One-pot synthesis of chitosan/LaF_3:Eu^{3+} nanocrystals for bio-applications. Nanotechnology. 16.02.2006. Vol 17, páginas 1527-1532. ISSN 0957-4484.	16.02.2006
D02	ALVAREZ-RODRIGUEZ, R., ALONSO, M., GIROTTI, A. et al. One-pot synthesis of pH and temperature sensitive gold clusters mediated by a recombinant elastin-like polymer. European Polymer Journal. 18 de Enero de 2010 (publicación online). Vol 46, Nº 4. Páginas 643-650. ISSN 0014-3057.	18.01.2010
D03	WANG, L., LI, P. y WANG, L. Luminiscent and hydrophilic LaF_3-polymer nanocomposite for DNA detection. Luminiscence, The Journal of Biological and Chemical Luminiscence. 08.09.2008. Vol 34, Páginas 39-44.	08.09.2008
D04	WANG, F., ZHANG, Y., FAN, X., et al. Facile synthesis of water-soluble LaF_3:Ln^{3+} nanocrystals. Journal of Materials Chemistry. 10.02.2006. Vol 16, página 1031.	10.02.2006
D05	STOUWDAM, J.W., VAN VEGGEL, F., Near-infrared Emission of Redispersible Er^{3+}, Nd^{3+}, and Ho^{3+} Doped LaF_3 Nanoparticles. 15.05.2002. Nano Letters, Vol 2, No. 7, páginas 733 y 734.	15.05.2002
D06	ALVAREZ-RODRÍGUEZ, R., ARIAS, F.J., SANTOS, M. et al. Gold Tailored Photosensitive Elastin-like Polymer: Synthesis of Temperature, pH and UV-vis Sensitive Probes. Macromolecular rapid communications. 22 de Enero de 2010 (publicación online). Vol 31, Nº 6. ISSN 1521-3927.	22.01.2010

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

La presente solicitud tiene por objeto una nanopartícula luminiscente que comprende un núcleo hecho de un floruro de una tierra rara y un recubrimiento constituido por un biopolímero recombinante, concretamente un polímero derivado de elastina -PDE- (Reivindicación 1-7). También es objeto de la presente solicitud el método para producir dichas nanopartículas (Reivindicación 8), así como el método para producir el ensamblaje reversible de las nanopartículas luminiscentes (Reivindicación 9).

El documento D01 divulga un método de síntesis de nanopartículas luminiscentes que comprenden un núcleo de Floruro de Lantano (La_3F) dopado con Eu^{3+} y recubierto por un biopolímero, concretamente chitosan.

El documento D02 divulga nanopartículas con núcleo de oro y recubiertas por un biopolímero derivado de elastina, de secuencia VPGXG.

El documento D03 divulga nanopartículas luminiscentes con un núcleo de La_3F dopado con Ce^{3+} y Tb^{3+} y recubierto con un polímero, poli (St-Co-MAA).

El documento D04 divulga un método de síntesis de nanopartículas luminiscentes que comprenden un núcleo de La_3F, dopadas con diferentes lantánidos. Para su síntesis se disuelven las sales de tierras raras en agua, posteriormente se añade floruro de amonio, y se calienta a 75ºC bajo agitación. Posteriormente se procede a varias etapas de centrifugación-precipitación-redisolución (página 1, apartado 2.1)

El documento D05 divulga un método de síntesis de nanopartículas luminiscentes que comprende un núcleo de La_3F y dopadas con Er^{3+}, Nd^{3+} y Ho^{3+}. Para la síntesis se disuelven las sales de tierras raras en agua y esta disolución se añade sobre otra que contiene Floruro de sodio, se calienta a 75ºC con agitación y posteriormente se procede a un proceso de centrifugación y lavado (página 734).

El documento D06 divulga nanopartículas que comprenden un núcleo de oro revestido con un polímero derivado de elastina de secuencia VPGXG que se encuentra conjugado con un derivado de azobenceno.

NOVEDAD (Art. 6.1 de la Ley 11/89)

Se considera que el objeto de las reivindicaciones 1-9 es nuevo en el sentido del artículo 6.1 de la Ley 11/86.

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

D01 se considera el documento del estado de la técnica más próximo al objeto de la presente solicitud. En él se divulgan nanopartículas luminiscentes con un núcleo de La_3F dopadas con Eu^{3+} y recubiertas con un biopolímero, concretamente chitosan. Las nanopartículas tienen un tamaño aproximado de 20 nm. Se divulga el método de síntesis de dichas nanopartículas, que comprende disolver las sales de tierras raras, agitar, añadir el biopolímero, calentar a 75 º C bajo agitación y posteriormente someter a varios ciclos de centrifugación-precipitación-redisolución. (Véase página 1528, sección 2.2)

La diferencia principal entre el objeto de la presente solicitud y D01 radica en que el biopolímero utilizado no es un PDE.

El documento D02 ya divulga el uso de un polímero PDE, para el recubrimiento de nanopartículas, en este caso de oro. El polímero es un PDE de secuencia VPGXG, idéntico al utilizado para la síntesis de las nanopartículas de la presente solicitud.

Teniendo en cuenta que el procedimiento de síntesis de la nanopartícula de la presente solicitud es muy similar al divulgado en D01 y puesto que no se deduce de la descripción que haya sido necesario superar ninguna dificultad técnica para recubrir el núcleo de la nanopartícula luminiscente con el PDE, se considera que la utilización de un PDE como el divulgado en D02, en lugar de un polímero de chitosan para el recubrimiento del núcleo de nanopartículas como las divulgadas en D01, representaría únicamente una mera alternativa.

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones 1-9 no implicaría actividad inventiva para un experto en la materia en el sentido del artículo 8.1 de la Ley de patentes 11/86.