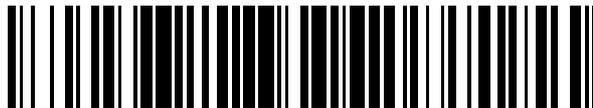


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 909**

21 Número de solicitud: 201130713

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

05.05.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

12.03.2013

Fecha de la concesión:

30.05.2014

45 Fecha de publicación de la concesión:

06.06.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA (50.0%)
CAMPUS PLAZA SAN FRANCISCO. EDIF.
INTERFACULTADES. C/PEDRO CERBUNA, 12
50009 ZARAGOZA (Melilla) ES;
FUNDACIÓN AGENCIA ARAGONESA PARA LA
INVESTIGACIÓN Y EL DESARROLLO (ARAIID)
(9.0%) y
NANOIMMUNOTECH, SRL (41.0%)**

72 Inventor/es:

**DEL PINO GONZÁLEZ DE LA HIGUERA, Pablo
Alfonso;
GRAZÚ BONAÍA, Maria Valeria;
MARTÍNEZ DE LA FUENTE, Jesús;
SANTOS MARTÍNEZ DE LAGUNA, Rubén y
SÁNCHEZ ESPINEL, Christian**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE MATERIALES MULTIFUNCIONALIZADOS**

57 Resumen:

Procedimiento de obtención de materiales multifuncionalizados.

La presente invención describe un procedimiento de obtención de materiales multifuncionales que comprende las etapas de: a) activación química de grupos funcionales presentes en un material base micro o nanoparticulado; b) reacción de sustitución nucleófila entre al menos un grupo amino, carboxilo o tiol terminal de una cadena de PNA o ADN tipo A y al menos un grupo funcional activado del material base obtenido en la etapa (a); c) conjugación a una biomolécula mediante activación química de grupos funcionales de una cadena de PNA/ADN tipo B, complementaria a la cadena PNA/ADN tipo A.; y d) hibridación de las cadenas PNA/ADN tipo A, que están unidas al material base según la etapa b) y las cadenas de PNA/ADN tipo B que tienen unidas biomoléculas, según la etapa c) mediante reconocimiento molecular PNA-PNA o PNA-ADN.

ES 2 397 909 B1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de obtención de materiales multifuncionalizados

5 La presente invención describe un procedimiento de multifuncionalización de materiales micro o nanoestructurados a los que se han anclado hebras de PNA o ADN sobre las que se hibridan mediante reconocimiento molecular, PNA-PNA o PNA-ADN, que a su vez están conjugadas con moléculas activas o bioactivas. La presente invención también se refiere a los materiales multifuncionales obtenidos por este procedimiento y a sus posibles aplicaciones biotecnológicas y biomédicas.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

10 Un área de investigación que puede revolucionar el ámbito de los materiales sintéticos, es el campo de los materiales multifuncionales. Hoy en día, se requieren materiales multifuncionales con unas funciones adaptables y un diseño a la carta; es decir lo que se desea principalmente, es un diseño inteligente de estos materiales. Una de las áreas donde este tipo de materiales tienen un gran potencial, no sólo por el impacto económico que supone, sino además por su impacto social, es el campo de la aplicación de estos materiales multifuncionales en biotecnología y medicina.

15 El desarrollo de nuevos sistemas multifuncionales micro y nanoestructurados está alcanzando un gran interés para su utilización en aplicaciones biotecnológicas (bioprocesos enzimáticos, biorremediación, etc) y biomédicas (diagnóstico, imagen, terapia molecular, etc). Se prevé que todos estos dispositivos tengan una gran utilidad en procesos de identificación temprana de enfermedades, en la ablación de tumores mediante hipertermia, en el transporte y liberación de fármacos o en la regeneración celular dentro de un organismo.

20 Si bien han sido publicadas varias aproximaciones *R. Ojeda, J.L. de Paz, A.G. Barrientos, M. Martín-Lomas, S. Penades, Carb. Res. 342 (2007) 448-459* para la obtención de materiales multifuncionales, ninguno de estos protocolos puede ser aplicado de forma universal a todo tipo de material. La principal limitación para el desarrollo de una estrategia universal de multifuncionalización radica en las grandes diferencias existentes entre la gran variedad actual de materiales micro y nanoestructurados en cuanto a: tamaño, área superficial, densidad de grupos reactivos, forma, estabilidad coloidal, etc. Por ejemplo, en el caso particular de los materiales nanoestructurados, su multifuncionalización es una tarea para nada trivial, dado que por lo general involucra varias etapas, durante las cuales es indispensable que los mismos se mantengan estables en suspensión. Debido a su tamaño nanométrico, la estabilidad coloidal de estos materiales depende de un delicado balance entre fuerzas de atracción (*van der Waals* y/o magnéticas) y de repulsión (electrostáticas y/o estéricas). Es así que pequeños cambios en el pH o la fuerza iónica del medio puede llevar a su rápida agregación, lo cual imposibilita la funcionalización de los mismos de forma escalable y reproducible. Dado que este balance de fuerzas es muy distinto para cada tipo de nanopartícula (magnéticas, metálicas, quantum dots, poliméricas, de sílica, de materiales biomiméticos, etc) o material nanoestructurado (nanotubos de carbono, silicio, etc), no existe hasta el momento un protocolo universal de multifuncionalización. Hoy en día, es por lo tanto necesario optimizar distintas estrategias para cada caso en particular.

35 Otra dificultad añadida que se debe tener en cuenta a la hora de diseñar un protocolo de biofuncionalización de materiales, es que debe conservarse la orientación adecuada de las biomoléculas sobre la superficie de los mismos para que conserven su actividad biológica. Si esto no es así, la sensibilidad de un biosensor o la eficacia del material funcionalizado pueden verse comprometidas. Existen múltiples opciones de biomoléculas a unir para proveer de especificidad y bioactividad el material a funcionalizar: carbohidratos, aptámeros, péptidos, enzimas, receptores proteicos, anticuerpos, etc. Las grandes diferencias estructurales entre ellas hacen que sea imposible contar con una única estrategia que asegure la unión orientada de cualquier tipo de biomolécula. Es así que hoy en día para cada biomolécula, es necesario optimizar un protocolo de unión diferente.

40 Por último, los grupos funcionales del material no utilizados para anclar biomoléculas deben ser enmascarados (inertización de la superficie) para evitar así la adsorción inespecífica de proteínas. Una inertización no adecuada del material puede afectar a los límites de sensibilidad alcanzados en diagnosis. A su vez, si el material va a ser utilizado en terapia, inyectado por vía intravenosa, la adsorción inespecífica de proteínas plasmáticas haría que fuera reconocido por células del sistema fagocítico mononuclear y por lo tanto eliminado del torrente sanguíneo antes que cumpla la función terapéutica para la cual fue diseñado.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

50 La presente invención se refiere a una estrategia de funcionalización la cual permite generar una plataforma para la incorporación en un único paso de diferentes moléculas con diferentes funcionalidades (marcadores tumorales, fármacos, marcadores fluorescentes, enzimas, toxinas, péptidos de internalización celular, anticuerpos, minianticuerpos, aptámeros, carbohidratos, receptores proteicos, etc) sobre un material micro o nanoparticulado.

55 La multifuncionalización comprende la hibridación de secuencias de ácidos nucleicos peptídicos (PNA) o ácido desoxirribonucleico (DNA) de tipo A, unidos previamente mediante enlace covalente a la superficie de un material micro o nanoparticulado, con otras secuencias complementarias de PNA o ADN de tipo B. Las cadenas complementarias están unidas a las biomoléculas de interés. La complementariedad de ambas cadenas (PNA_A o ADN_A con PNA_B o

ADN_B) a través del reconocimiento molecular PNA-PNA o PNA-ADN, origina la conjugación de las moléculas bioactivas a la superficie de las micro o nanopartículas, en un proceso al que se ha denominado NIT-zipper (Figura 1).

Las ventajas del procedimiento de la presente invención para funcionalizar micro o nanopartículas son las siguientes:

- 5 1- La estrategia propuesta permite generar partículas multifuncionales independizándose de las grandes diferencias existentes entre la gran variedad actual de materiales micro y nanoestructurados en cuanto a tamaño, área superficial, densidad de grupos reactivos, forma, estabilidad coloidal, etc.
- 10 2- Además de permitir independizarse de la heterogeneidad en cuanto al material a funcionalizar también permite independizarse de buscar la estrategia más adecuada para unir de forma activa cada una de las biomoléculas de interés. Independientemente del tipo de biomolécula la presente invención asegura la unión de varias biomoléculas de forma activa y en un único paso.
- 15 3- Si bien la estrategia propuesta puede llevarse a cabo utilizando cadenas complementarias de ADN, el hecho de utilizar cadenas de PNA presenta varias ventajas:
- Dada la estructura de su esqueleto peptidomimético artificial, el PNA no es sensible a la acción de enzimas biodegradadoras naturales como DNAsas, RNAsas o proteasas, por lo que su estabilidad biológica es mucho mayor que la del ADN.
 - El esqueleto de la molécula de PNA no contiene grupos fosfato y por lo tanto la unión entre hebras PNA/PNA y PNA/ADN es mucho más fuerte que entre hebras ADN/ADN dado que no existe repulsión electrostática. Esto tiene como consecuencia que para una misma secuencia nucleotídica la T_m sea mucho mayor en el caso de una doble hélice PNA/PNA o PNA/ADN que ADN/ADN. Por lo que secuencias más cortas de PNA permiten tener doble hebras más resistentes a la deshibridación con la temperatura. Finalmente, la insensibilidad del PNA a las variaciones de pH o de fuerza iónica hacen que posea también mucha mayor estabilidad química y permite que la estrategia propuesta pueda ser utilizada para funcionalizar nanopartículas que van a ser usadas en medios con composición compleja (sangre, suero, orina, saliva, lisados celulares, medios con alta salinidad o pHs extremos, etc).
 - Por último la eficiencia de hibridación es mucho mayor cuando se utilizan hebras de PNA que de ADN (*F Xu, A M. Pellino, W Knoll, Thin Solid Films 516 (2008) 8634–8639*). La eficiencia y la cinética de hibridación de dos hebras de ADN en solución no sólo depende de la complementariedad de las secuencias sino también de la fuerza iónica del tampón, la temperatura, el pH, el largo de la secuencia, la relación entre el número de G-C (guaninas-citosina) y A-T (adeninas-timinas), etc. En el caso de que una de las secuencias esté inmovilizada se suman a los factores mencionados efectos superficiales como son: el impedimento estérico, la repulsión electrostática, tasas de difusión de la solución a la interfase solución-superficie del soporte, restricciones por orientación, etc. Al eliminar el efecto de repulsión, la hibridación de cadenas complementarias de PNA es sensiblemente mejor que en el caso de cadenas de ADN.

35 Por lo tanto un primer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de materiales multifuncionales que comprende las siguientes etapas:

- a) activación química de grupos funcionales presentes en un material base micro o nanoestructurado.
- b) reacción de sustitución nucleófila entre al menos un grupo amino o carboxilo terminal de una cadena de PNA tipo A o un grupo amino o tiol de una cadena de ADN tipo A y al menos un grupo funcional activado del material base obtenido en la etapa (a).
- 40 c) conjugación de una cadena de PNA/ADN tipo B, complementaria a la cadena PNA/ADN tipo A, a una biomolécula mediante activación química de grupos funcionales.
- d) hibridación de las cadenas PNA/ADN tipo A, que están unidas al material base según la etapa b) y las cadenas de PNA/ADN tipo B que tienen unidas biomoléculas, según la etapa c) mediante reconocimiento molecular PNA-PNA o PNA-ADN.

45 Según una realización preferida, los grupos funcionales a activar, presentes en el material base micro o nanoestructurado se seleccionan entre grupos hidroxilos, carboxilos, carbonilos, aminos, tioles, azidas o alquinos.

Según otra realización preferida, la activación de los grupos funcionales se lleva a cabo y sin sentido limitativo mediante un reactivo seleccionado entre carbodiimida, glutaraldehído, espaciadores bifuncionales, bromuro de cianógeno, epóxidos, N-hidroxisuccinimida, sulfo-N- hidroxisuccinimida. De manera más preferida, el reactivo se selecciona entre 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), diciclohexilcarbodiimida (DCC), diisopropilcarbodiimida (DIC), N-hidroxisuccinimida (NHS), Sulfo-NHS, EDC, 2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil uronio hexafluorofosfato metanominio (HATU), 1,1-carbonildiimidazol (CDI) o cualquiera de sus combinaciones. De manera aún más preferida el reactivo que se utiliza es una combinación de NHS y EDC.

Según otra realización preferida, el material base es de tipo microparticulado.

- Según otra realización preferida, los materiales base de tipo microparticulado se seleccionan entre: polímeros orgánicos naturales, polímeros orgánicos sintéticos, soportes inorgánicos y palancas de silicio (*cantilevers* de silicio).
- 5 Según una realización preferida, los polímeros orgánicos naturales se seleccionan del grupo formado por polisacáridos (celulosa, almidón, dextranos, agar-agar, agarosa, alginatos, quitina, quitosano, etc) y proteínas fibrosas (colágeno, queratina, etc).
- Según otra realización preferida, los polímeros orgánicos sintéticos se seleccionan del grupo formado por poliolefinas (como el poliestireno), polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos, etc.), polímeros polivinílicos (alcohol polivinílico, etc.), poliamidas, etc.
- 10 Según otra realización preferida, los soportes inorgánicos se seleccionan del grupo formado soportes inorgánicos naturales (arcillas, sílice, etc) o sintéticos (óxidos de metales y vidrio de tamaño de poro controlado, vidrio no poroso, alúmina, cerámicas, gel de sílice, etc).
- Según una realización preferida, el material base microparticulado tiene un tamaño de diámetro medio de entre 0,1 y 700 μm , preferiblemente de entre 0,1 y 100 μm .
- Según otra realización preferida, el material base es de tipo nanoestructurado.
- 15 Según otra realización preferida, los materiales base nanoestructurados se seleccionan entre: nanopartículas de oro, nanopartículas de plata, nanopartículas de carbono, nanopartículas de oro-citrato, nanopartículas de óxidos de metales, nanopartículas magnéticas, nanopartículas de sílica, nanopartículas de silicio, nanopartículas poliméricas (dextrano, polilisina, etc), nanotubos de carbono, nanohilos de silicio, nanopartículas de paladio, dendrímeros, nanopartículas de platino, nanocristales semiconductores, liposomas o cualquiera de sus combinaciones.
- 20 Según una realización preferida, el material base nanoparticulado tiene un tamaño de diámetro medio de entre 2 y 100 nm.
- Según otra realización preferida, cuando el material base nanoestructurado, está recubierto por una cubierta orgánica, seleccionada entre citrato, aminoácidos naturales y no naturales, polietilenglicoles con distintos grupos terminales (amino, tiol hidroxilo, azida,...), polímeros o polisacáridos, sílica .
- 25 Según otra realización preferida, si la cubierta orgánica es un polímero, este es el poli(anhídrido maleico-alt-1-octadeceno)
- Según otra realización preferida, las biomoléculas que se conjugan con las cadenas PNA/ADN tipo B, se seleccionan entre moléculas de reconocimiento biológico, agentes terapéuticos, pro-fármacos, trazadores, péptidos de internalización celular, agentes bloqueantes.
- 30 Según otra realización preferida, las moléculas de reconocimiento biológico se seleccionan entre vitaminas, hormonas o péptidos con actividad biológica, dominios extracelulares de receptores de membrana o moléculas de adhesión celular, toxinas, lectinas, enzimas, anticuerpos, minianticuerpos y aptámeros.
- En el caso de las vitaminas, hormonas o péptidos con actividad biológica, dado que la expresión de muchos receptores de estas moléculas con actividad biológica se encuentra alterada en ciertos tipos de enfermedades, la funcionalización del material con una vitamina, péptido u hormona específica puede ser de gran utilidad para la detección o terapia de esa enfermedad en particular (cáncer, esquizofrenia, arteriosclerosis, etc) (*J Sudimack, R.J. Lee, Advanced Drug Delivery Reviews 2000, 4, 147–162; A Zvara, G Szekeres, Z Janka, JZ Kelemen, C Cimmer, M Sántha, LG Puskás Dis Markers (2005) 21: 61-9. Burtea C, Laurent S, Lancelot E, Ballet S, Murariu O, Rousseaux O, Port M, Elst LV, Corot C, Muller RN, Mol. Pharm. 2009, 6 (6): 1903-1919 Petros RA, DeSimone JM, Nat. Rev. Drug Discov. 2010, 9 (8), 615-627; RB Huang, S Mocherla, MJ Heslinga, P Charopenphol, O Eniola-Adefeso, Molecular Membrane Biology 2010, 27(7), 312-327; Johansson EMV, Dubois J , Darbre, Reymond JL, Bioorg. Med. Chem. 2010, 18 (17), 6589-6597*).
- 35 Dependiendo de la estructura de la hormona, vitamina o péptido de interés, se utiliza un grupo químico lo más alejado posible de la zona de actividad biológica (amino, tiol, carboxilo, hidroxilo, imidazol, etc) para hacerlo reaccionar covalentemente con el grupo amino o carboxilo terminal de la molécula de PNA/ADN, mediante química de activación con carbodiimida.
- 45 Por ejemplo en el caso particular del ácido fólico, la unión covalente se hace entre el grupo γ -carboxílico del glutamato presente en su estructura y el grupo amino terminal de la cadena de PNA o ADN_B, mediante su activación previa con N-hidroxisuccinimida (NHS), sulfo-NHS o carbodimida. Se elige este grupo en particular porque ya ha sido demostrado que su modificación no provoca una pérdida significativa en la afinidad por su receptor (*S Wang, RJ Lee, CJ Mathias, MA Green, PS, Imaging Bioconjugate Chem. 1996, 7, 56-62; P Caliceti, S Salmaso, A Semenzato, T Carofiglio, R Fornasier, M Fermeiglia, Marco Ferrone, Sabrina Pricl, Bioconjugate Chem. 2003, 14, 899-908; Salmaso S, Bersani S, Semenzato A, Caliceti P J. Drug Target. 2007, 15 (6), 379-390 F Canal, MJ. Vicent, G Pasut, O Schiavon, conjugates Journal of Controlled Release 146 (2010) 388–399; BK Biswal, NB Debata, RS Verma, Polymers 2010, 2, 86-101*).
- 50

En el caso de dominios extracelulares de receptores de membrana o moléculas de adhesión celular, la funcionalización de materiales con dominios extracelulares de receptores de membrana es de sumo interés para el desarrollo de biosensores (TL Hoffman, G Canziani, L Jia, J Rucker, RW Doms, PNAS 2000, 97 (21), 11215-11220; Vidic J, Pla-Roca M, Grosclaude J, Persuy MA, Monnerie R, Caballero D, Errachid A, Hou Y, Jaffrezic-Renault N, Salesse R, Pajot-Augy E, Samitier J., Anal Chem. 2007 May 1;79(9):3280-90; Lee SH, Park TH, Biotechnol. Bioprocess Eng. 2010, 15 (1): 22-29). En el caso de moléculas de adhesión celular, es sabido que su expresión cambia en ciertos tipos de enfermedades (cáncer, enfermedades neurodegenerativas, etc) por lo que su uso en la funcionalización tanto de materiales micro como nanoestructurados puede ser de gran utilidad para la detección o terapia (H Peinado, F Portillo, A Cano, Int. J. Dev. Biol. 2004, 48, 365-375; Arikath, J, Reichardt, LF, Trends in Neurosciences, 31(9):487-94; Jeanes et al, Oncogene 2008, 27, 6920-6929; JM. Benjamin, WJ Nelson, Seminars in Cancer Biology 2008, 18, 53-64; Bryan RT, Tselepis C, J. Urol. 2010, 184 (2): 423-431). Dado que los dominios extracelulares tanto en el caso de los receptores de membrana como en las moléculas de adhesión celular se obtienen por técnicas de biología molecular, cuentan con una cola de polihistidina como etiqueta en su extremo amino o carboxilo terminal. Por lo tanto, la unión de la cadena de PNA o ADN_B a través de esta etiqueta asegura la correcta orientación de la biomolécula sobre el material. Esta unión se realiza entre un grupo imidazol de uno de los residuos de histidina con el grupo carboxilo o amino terminal de la molécula de PNA o con el grupo amino o tiol en el caso de las moléculas de ADN, por medio de la química de activación con carbodimida.

En el caso de toxinas, el uso de fragmentos de toxinas, toxinas mutantes o recombinantes no tóxicas en la funcionalización de materiales puede ser de utilidad para una vectorización selectiva en terapia. En literatura se pueden encontrar ejemplos de su uso como biomoléculas vectorizadoras en terapias dirigidas a neuronas del sistema nervioso central, a células infectadas con el virus del VIH, etc (Goldstein H, Pettoello-Mantovani M, Bera TK, Pastan IH, Berger EA, . J Infect Dis. 2000 Mar;181(3):921-6; Pieter J. Gaillarda, Arjen Brinka, Albertus G. de Boerb . International Congress Series Volume 1277, April 2005, Pages 185-198; SA Townsend GD Evrony, FX. Gu, MP Schulze, RH Brown Jr, RS Langer, Biomaterials 2007 ,28(34), 5176-5184; Peng Zhang, Radharaman Ray, Bal Ram Singh, Dan Li, Michael Adler, Prabhati Ray Pharmacology 2009, 9:12), en terapias de tumores (A Bouter, B Delord, E Dransart, C Poirier, L Johannes, D van Effenterre, Biol. Cell 2008, 100, 717-725; Viel T, Dransart E, Nemati F, Henry E, Theze B, Decaudin D, Lewandowski D, Boisgard R, Johannes L, Tavitian B, Mol. Imaging 2008, 7 (6): 239-247; Johannes L, Romer W, Nat. Rev. Microbiol. 2010 8 (2): 105-116). Dependiendo de la estructura del fragmento de toxina o la toxina mutante se utiliza un grupo químico lo más alejado posible de la zona de actividad biológica (amino, tiol, carboxilo, hidroxilo, imidazol, etc) para hacerlo reaccionar covalentemente con el grupo amino o carboxilo terminal en el caso de la molécula de PNA B y amino o tiol en el caso de la molécula de ADN_B, mediante la química más adecuada (activación con carbodimida, epoxidación, bromuro de cianógeno, glutaraldehído, espaciadores bifuncionales, etc). En el caso de tratarse de una toxina recombinante, si cuenta con una cola de polihistidina como etiqueta en su extremo amino o carboxilo terminal, esta unión se realiza a través de uno de los residuos de histidina con el grupo carboxilo o amino terminal de la molécula de PNA y amino o tiol en el caso de la molécula de ADN_B por medio de la química activación con carbodiimida.

En el caso de las lectinas éstas son un grupo de proteínas que se unen de manera selectiva y reversible a distintos sacáridos. Tienen muchas aplicaciones en el ámbito de biosensores desde la detección de analitos glicosilados hasta la detección de alteraciones en la expresión de moléculas glicosiladas presentes en la superficie celular (La Belle et al, Trends Neurosci. 2008 31(9): 487-494; Sakuma et al, Journal of Controlled Release 2009, 134, 2-10; Xiea et al, Biosensors and Bioelectronics 2009, 24, 1311-1317). Dado que presentan al menos dos sitios de unión a carbohidratos, cualquier protocolo de unión permite obtener materiales funcionalizados con actividad biológica. Como no es necesario un protocolo de unión orientada, la unión de la cadena de PNA o ADN_B se realiza a través de grupos amino presentes en la superficie de las lectinas de interés. El motivo de esta elección se basa en que al ser un grupo polar se encuentra usualmente expuesto en la superficie proteica y es uno de los grupos más abundantes en la superficie de las proteínas (Guisán JM, Enzyme Microb. Technol. 10, 375-382). Cuando éstos no se encuentran protonados son muy reactivos como agentes nucleofílicos, por lo que es posible su unión covalente con el grupo carboxilo o amino terminal previamente activado con química adecuada carbodiimida.

En el caso de las enzimas, la funcionalización de materiales con estas moléculas es de sumo interés tanto para su uso en detección como en procesos biotecnológicos (producción de compuestos químicos, biotransformación de alimentos, etc). Dependiendo del tamaño del sustrato a transformar por la enzima es más o menos crítico que zonas cercanas a su sitio activo se vean involucradas en su unión a un soporte. Por lo que dependiendo de la enzima de interés, se tiene que elegir el grupo químico de su superficie más adecuado (tiol, amino, hidroxilo, carboxilo, imidazol, carbohidrato, etc) para introducir la cadena de PNA o ADN_B

En el caso de anticuerpos (Ab). Son muy selectivos y específicos, y actualmente es posible obtener anticuerpos monoclonales de prácticamente cualquier molécula con independencia de su tamaño. Esto hace que sean muy utilizados para introducir al material la especificidad necesaria para su uso en detección o en terapia. La preparación del conjugado Ab-PNA_B o ADN_B se realiza por medio de la oxidación con periodato de las cadenas de carbohidratos del anticuerpo para así poder proceder a la incorporación de la cadena de PNA/ADN a través de su extremo amino terminal (S Puertas, M Moros, R Pacheco Fernández, MR Ibarra, V Grazú, JM de

la Fuente, Journal of Physiscs-D (Applied Physics) 2010, 43(47) Art No 474012; *M. Fuentes, C. Mateo, J.M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, Biosens. Bioelectron. 2005, 20(7), 1380-1387*). Esto asegura la correcta orientación del Ab una vez unido al material ya que las cadenas de azúcares se encuentran localizadas en la zona Fc del anticuerpo, lejos de la zona de reconocimiento del antígeno.

5 En el caso de minianticuerpos, si el material micro o nanoestructurado a funcionalizar se va a utilizar en terapia o diagnóstico in vivo, el hecho de usar anticuerpos para su funcionalización puede llegar a limitar sus aplicaciones por problemas de inmunogenecidad inherente o problemas de difusión a través de las barreras biológicas o hacia el interior de la masa neoplásica de tumores. En estos casos el uso de biomoléculas de menor tamaño, como son los minianticuerpos, es una posible solución. Los minianticuerpos son fragmentos
10 derivados de anticuerpos construidos por tecnología de ADN recombinante, y que, pese a su menor tamaño, conservan la capacidad de unión al antígeno ya que mantienen al menos un dominio variable de inmunoglobulina. Al obtenerse por técnicas de biología molecular, cuentan con una cola de polihistidina como etiqueta en su extremo amino o carboxilo terminal la cual puede usarse para unir la cadena de PNA o en su extremo amino o tiol en el caso de la ADN_B y así asegurar una unión orientada del mismo.

15 Los aptámeros son moléculas que por su tamaño pequeño y su baja inmunogenecidad pueden sustituir a los anticuerpos en ciertas aplicaciones. Los aptámeros son ácidos nucleicos de una sola cadena que tienen formas tridimensionales bien definidas lo cual les permite unirse a la molécula objetivo en una forma similar que los anticuerpos. Los aptámeros combinan las características óptimas de las moléculas pequeñas (inmunogenicidad baja, difusión alta, etc) y de los anticuerpos (alta especificidad y afinidad y estabilidad química) Otra ventaja con respecto a los anticuerpos monoclonales, es que son sintetizados químicamente en lugar de ser expresados biológicamente, lo cual ofrece una ventaja significativa en cuanto a costo y permite introducir en el extremo alejado a la zona de reconocimiento biológico grupos funcionales que permitan la unión de la molécula de PNA o ADN_B. La molécula de PNA o ADN se une covalentemente por medio de la química más adecuada (activación con carbodimida, glutaraldehído, espaciadores bifuncionales, etc), dependiendo del grupo químico terminal introducido en el aptámero (fosfato, carboxilo, amino, tiol, etc).

Según otra realización preferida, los agentes terapéuticos se seleccionan entre fármacos hidrofóbicos, fármacos hidrofílicos, toxinas y radioisótopos.

30 Fármaco hidrofóbico. En el caso de unir una droga hidrofóbica, se conjugará a ciclodextrinas para evitar así modificaciones químicas del fármaco que reduzcan su actividad terapéutica, y mejorar su estabilidad. Las ciclodextrinas se anclan a su vez al material a través de una cadena de PNA o ADN_B.

35 El conjugado ciclodextrina-PNA B o ADN_B se obtiene por medio de la activación de uno de los hidroxilos en posición 6 de la ciclodextrina siguiendo química clásica de ciclodextrinas (*Stephen Hanessian, Aziza Benalil, Craig Laferriere J. Org. Chem., 1995, 60, 4786; Furusaki E.; Ueno Y.; Sakairi N.1; Nishi N.; Tokura S Carbohydr. Polymers, 1996, 29,29; Ning Zhong, Hoe-Sup Byun and Robert Bittman Tetrahedron Lett., 1998, 39, 2919; M. Prabakaran, J.F. Mano Carbohydr. Polymers, 2006, 63, 153*), para proceder a la posterior incorporación del PNA o ADN_B por su extremo amino terminal. Dependiendo del tamaño del fármaco a unir se utiliza la ciclodextrina que forme mejores complejos de inclusión con el fármaco: α -, β - o γ -ciclodextrina. Si fuese necesario es posible mejorar las constantes de unión alcanzada entre el fármaco y los distintos conjugados ciclodextrina-PNA_B o ADN_B, mediante la modificación hidrofóbica de los OH primarios a la vez que se introduce el PNA o ADN_B (*Yamanoi T, Yoshida N, Oda Y, Akaike E, Tsutsumida M, Kobayashi N, Osumi K, Yamamoto K, Fujita K, Takahashi K, Hattori K Bioorg. Med. Chem. Lett., 2005, 15, 1009*).

40 Fármaco hidrofílico. Si el fármaco es demasiado hidrofílico como para no poder ser conjugado en una ciclodextrina, se ancla directamente a la cadena de PNA o ADN_B. Dependiendo de la estructura del fármaco se utiliza o se introduce por modificación química el grupo más adecuado (carboxilo, amino, tiol, imidazol, hidroxilo, etc) para poder realizar la unión a través de la química convencional más apropiada (activación con carbodimida, glutaraldehído, espaciadores bifuncionales, etc).

45 Si fuese necesaria la liberación del fármaco una vez alcanzada la célula diana, se introduce un espaciador con un enlace sensible al pH ácido de los endosomas o lisosomas del citoplasma celular (hidrazina, etc), o con grupos sensibles a enzimas (grupo disulfuro, éster, secuencia peptídica, etc) (*Reum et al, 2010 Polymers 2010, 2, 86-101*).

50 Toxina. Si bien las toxinas no tóxicas o inactivas son utilizadas como biomoléculas vectorizadoras, las toxinas pueden ser utilizadas como fármacos (*Spooner and Watson, Curr. Opin. Drug. Discov. Dev 2010, 13(1), 86-95*). Debido a su alta toxicidad no selectiva su uso está prohibido si no es a través de su vectorización selectiva. Es así que en la literatura se pueden encontrar varios ejemplos de vectorización selectiva de toxinas para el tratamiento de cáncer (*Debinski, Drug Develop Res 2008 69(7), 407-414; S Potala, SK Sahoo, RS Verma, Drug Discovery Today 2008, 13(17/18), 807-815; S Oh, BJ Stish, SM Vickers, DJ Buchsbaum, AK Saluja, DA VAllera, Pancreas 2010, 39(6), 913-922*), inhibición de infecciones virales (*A Fabbri, S Travaglione, L Falzano, C Fiorentini, Curr. Med. Chem.2008, 15 (11), 1116-1125*), tratamiento de infecciones inflamatorias (*PS Low, WA Henne, DD Doorneweerd, Accounts Chem. Res. 2008, 41 (1): 120-129*), etc. Una técnica muy extendida

para dirigir las toxinas de forma específica a la célula enferma es a través de la obtención de inmunotoxinas: moléculas híbridas formadas por la unión de una toxina y un anticuerpo (Kontermann, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2010, 12 (2), 176-183; Mathew and Verma, *Cancer Sci* 2009 100 (8), 1359-1365). Si bien esta es una técnica bastante extendida, tiene el inconveniente de poder generar inmunogenicidad en el paciente. Es así que el uso de nanopartículas como plataformas multifuncionales para lograr la vectorización selectiva de toxinas se presenta como una alternativa muy prometedora (Zhou ZX, Shen YQ, Tang JB, Fan MH, Van Kirk EA, Murdoch WJ, Radosz, M, *Adv. Funct. Mater.* 2009, 19 (22), 3580-3589).

Para obtener nanopartículas funcionalizadas con toxina según la estrategia propuesta es necesario anclar la toxina a la cadena de PNA o ADN_B. La química a utilizar depende de la estructura del fragmento de toxina. Se utiliza un grupo químico lo más alejado posible de la zona de actividad biológica (amino, tiol, carboxilo, hidroxilo, imidazol, etc) para hacerlo reaccionar covalentemente con el grupo amino o carboxilo terminal de la molécula de PNA y amino o tiol en el caso de la molécula de ADN_B, mediante la química más adecuada (activación con carbodimida, epoxidación, bromuro de cianógeno, glutaraldehído, espaciadores bifuncionales, etc).

Radioisótopos. Actualmente pacientes con ciertos tumores están siendo tratados con bajas dosis de radioisótopos (iodo-125, paladio-103, oro-198, ^{99m}Tc, Ga-68, Cu-64, etc). Es sabido que esta estrategia causa síntomas post-tratamiento que van desde efectos secundarios molestos hasta complicaciones clínicas severas. El uso de nanopartículas para liberación sitio específica de estos radioisótopos permitiría poder evitar estos efectos secundarios (Chanda et al, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2010, 6, 201–209).

En la literatura existen varios ejemplos de moléculas orgánicas con capacidad de quelar radioisótopos: EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), DOTA (1,4,7,10-tetraazaciclo dodecane-1,4,7,10-ácido tetraacético), DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético), NOTA (1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-ácido triacético), etc (Chong et al *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007, 17 (22), 6107-6110; Tripathi et al, *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 2009, 5(3), 148-153; Ferreira et al, *Bioconjugate Chem.* 2010, 21, 531–536). Por lo tanto la conjugación de derivados aminados de estos agentes quelantes al carboxilo o amino terminal de la cadena de PNA_B o al grupo amino o tiol en el caso de la molécula de ADN_B permite funcionalizar las nanopartículas con estos radioisótopos empleando química convencional (activación con carbodimida, epoxidación, bromuro de cianógeno, glutaraldehído, espaciadores bifuncionales, etc).

Según otra realización preferida, los trazadores se seleccionan entre marcadores fluorescentes, agentes de contraste de resonancia magnética y radioisótopos.

Las nanopartículas también han irrumpido en el ámbito del diagnóstico para ser utilizadas en el desarrollo de sistemas de análisis y de imagen para la detección de enfermedades en los estadios más tempranos posibles de las mismas, tanto in vivo (Pysz et al, *Clin. Radiol.* 2010, 65 (7), 500-516). Existen muchos ejemplos en literatura de su uso para el diagnóstico precoz de cáncer, arteriosclerosis, enfermedades neurodegenerativas, etc (van Schooneveld et al, *Mol. Imaging* 2010, 5 (4), 231-236; Kim et al, *ACS NANO*, 2010, 4 (7), 3689-3696; Chou et al, *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132 (38), 13270-13278). En el caso de nanopartículas magnéticas sus propiedades superparamagnéticas permiten su uso como agentes de contraste para el marcaje y diagnóstico mediante Resonancia Magnética de Imagen (RMI). Sin embargo, en el caso de nanopartículas que no sean superparamagnéticas es necesario funcionalizarlas con algún trazador (marcador fluorescente, radioisótopos, etc) para usarlas en diagnóstico.

La estrategia planteada permite funcionalizar nanopartículas con un único trazador o múltiples trazadores en una única etapa. Esto permite diseñar agentes de contraste llamados todo-en-uno, que sirven a la vez para varias técnicas médicas: resonancia magnética de imagen (RMI), tomografía fluorescente, tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía de emisión de fotón único (SPECT), tomografía axial computarizada (TAC), etc.

Marcador fluorescente. La molécula de PNA o ADN_B se une covalentemente al marcador fluorescente por medio de la química más adecuada (activación con carbodimida, glutaraldehído, espaciadores bifuncionales, etc), dependiendo del grupo químico presente en el fluoróforo (carboxilo, amino, tiol, hidroxilo, etc).

Agente de contraste de resonancia magnética y radioisótopos. Varios radioisótopos y agentes de contraste de resonancia magnética son quelados por una gran variedad de moléculas orgánicas (EDTA, DOTA, DTPA, NOTA, etc). Por lo tanto la conjugación de derivados aminados de estos agentes quelantes al carboxilo o amino terminal de la cadena de PNA_B o al grupo amino o tiol en el caso de la molécula de ADN_B permite funcionalizar las NPs con estos radioisótopos o agentes de contraste. La obtención del conjugado PNA o ADN_B-quelante se lleva a cabo mediante el uso de química convencional (activación con carbodimida, epoxidación, bromuro de cianógeno, glutaraldehído, espaciadores bifuncionales, etc).

Según otra realización preferida los péptidos de internalización celular se seleccionan entre aquellos que tienen menos de 30 aminoácidos y bien son anfífilicos o con carga neta positiva, por ejemplo y sin sentido limitativo, TAT, penetrina...

En muchas ocasiones es necesario que las nanopartículas una vez alcanzada la célula diana puedan llegar a su citoplasma o núcleo. Para esto es necesario evitar su endocitosis, lo cual puede lograrse mediante la funcionalización de los llamados péptidos de internalización celular (*de la Fuente et al, Bioconjugate Chemistry* 16, 5, 1176-1180). Hoy en día existen numerosos ejemplos de este tipo de péptidos, los cuales por lo general son péptidos de menos de 30 aminoácidos y bien son anfifílicos o tienen una carga neta positiva. Algunos ejemplos conocidos son: TAT, penetratina, etc.

Dependiendo de la estructura del péptido se utiliza un grupo químico lo más alejado posible de la zona de actividad biológica (amino, tiol, carboxilo, hidroxilo, imidazol, etc) para hacerlo reaccionar covalentemente con el grupo amino o carboxilo terminal de la molécula de PNA_B o con el grupo amino o tiol en el caso de la molécula de ADN_B mediante química convencional (activación con carbodimida, epoxidación, bromuro de cianógeno, glutaraldehído, espaciadores bifuncionales, etc).

Según otra realización preferida, los agentes bloqueantes se seleccionan entre polietilenglicoles y azúcares.

Los grupos funcionales de la superficie de las nanopartículas no usados para anclar biomoléculas deben ser enmascarados (inertización de la superficie) para evitar así la adsorción inespecífica de proteínas. Una inertización no adecuada puede afectar a los límites de sensibilidad alcanzados en nanodiagnosis. A su vez, si las nanopartículas van a ser inyectadas de forma intravenosa, la adsorción inespecífica de proteínas plasmáticas haría que las mismas sean reconocidas por células del sistema fagocítico mononuclear y por lo tanto eliminadas del torrente sanguíneo antes que cumplan la función terapéutica para la cual fueron diseñadas.

Los agentes bloqueantes tienen que ser neutros e hidrofílicos, es así que entre los más utilizados se encuentran: polietilenglicoles y azúcares de distinto tamaño (*Moros et al, Nanoscale* 2010, 2(9), 1746-1755; *Liu et al, Curr. Nanosci.* 2010, 6 (4), 347-354 *Petros and DeSimone, Nat. Rev. Drug Discov.* 2010, 9 (8), 615-627; *Romberg et al, Pharm. Res.* 2008, 25(1), 55-71)

Derivados aminados de polietilenglicoles, monosacáridos, disacáridos etc se conjugan covalentemente al grupo amino o carboxilo terminal de la molécula de PNA_B, o con el grupo amino o tiol en el caso de la molécula de ADN_B mediante química convencional (activación con carbodimida, epoxidación, bromuro de cianógeno, glutaraldehído, espaciadores bifuncionales, etc).

El número de biomoléculas a unir depende del número de conjugados **PNA/ADN tipo B-biomolécula** diferentes que estén presentes en la mezcla de unión. La relación de cada una de las biomoléculas sobre la superficie del material dependerá de la proporción de sus PNA/ADN_B-conjugados en la mezcla de unión.

La máxima combinación de biomoléculas que se pueden unir tiene como única limitación el área superficial específica de cada material en particular. A su vez, esta novedosa estrategia de funcionalización permite independizarse de tener que seleccionar el método de unión más adecuado dependiendo de cada biomolécula a unir.

Para poder contar con la máxima libertad de elección a la hora de seleccionar la combinación de biomoléculas más adecuada, es necesario preparar una batería muy amplia de conjugados PNA/ADN_B-biomolécula. A la hora de sintetizar estos conjugados, es clave que al modificar la biomolécula con la molécula de PNA/ADN_B, su sitio activo quede libre para que pueda realizar su función biológica una vez modificada. Debido a las grandes diferencias estructurales entre las distintas biomoléculas de interés, es necesario diseñar una estrategia sintética diferente para cada caso.

Según otra realización preferida, en la etapa d), la hibridación mediada por el reconocimiento moléculas PNA-PNA o PNA-ADN de las cadenas PNA/ADN tipo A, que están unidas al material base y las cadenas de PNA/ADN tipo B que tienen unidas biomoléculas, se lleva a cabo a temperaturas inferiores a la temperatura de fusión (T_m) de dichas cadenas mediante el reconocimiento molecular PNA-PNA o PNA-ADN y así se obtiene un material micro/nanoestructurado multifuncional (Figura 1). De manera preferida la T_m está dentro del intervalo de 25 a 80°C ambos valores inclusive.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere al material funcionalizado obtenible por el procedimiento descrito anteriormente.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere al uso del material funcionalizado para la detección de biomoléculas *in vitro* como por ejemplo un *biochip*, un biosensor de formato en soluble o anclado a una superficie, sistemas de separación basados en partículas magnéticas, sistemas de separación basados en partículas de metales nobles, columnas de purificación, *microarrays*, agentes de contraste basados en nanopartículas magnéticas o radioisótopos. Según una realización preferida las biomoléculas son proteínas, péptidos, vitaminas o ácidos nucleicos.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere al uso del material funcionalizado para la elaboración de un medicamento donde el medicamento es para la liberación dirigida de fármacos. De manera preferida, el fármaco es un radioisótopo, seleccionado entre iodo-125, paladio-103, oro-198, ^{99m}Tc, Ga-68 ó Cu-64 o un citotóxico, preferiblemente la doxorubicina

- 5 Un quinto aspecto de la presente invención se refiere al uso del material funcionalizado para su uso como catalizadores industriales en procesos de química sostenible: química fina y farmacéutica, biocombustibles, química de alimentos, química analítica, etc.

Un sexto aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o veterinaria que comprende el material funcionalizado.

- 10 En la presente invención el término "composición farmacéutica o veterinaria" se refiere a un conjunto de componentes que está formada al menos por el extracto de la invención, que tiene al menos una aplicación en la mejora del bienestar físico o fisiológico o psicológico de un sujeto, que implique una mejora del estado general de su salud, por ejemplo una aplicación cosmética, aunque puede no implicar un efecto fisiológico en el organismo sino una mejora en el bienestar del sujeto relacionada con su psicología. Por tanto, dicha composición farmacéutica puede ser un producto de higiene personal, un producto cosmético o un producto que puede constituir la base para la elaboración de los productos anteriores o la base para la elaboración de un medicamento.
- 15

El "producto de higiene personal" se define como las sustancias o preparados que, sin tener la consideración legal de medicamentos, productos sanitarios, cosméticos o biocidas, están destinados a ser aplicados sobre la piel, dientes o mucosas del cuerpo humano con finalidad de higiene o de estética, o para neutralizar o eliminar ectoparásitos.

- 20 El "producto cosmético" se define como toda sustancia o preparado destinado a ser puesto en contacto con las diversas partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto, y/o corregir los olores corporales, y/o protegerlos o mantenerlos en buen estado.

- 25 El término "medicamento" tiene un significado más limitado que el significado de "composición farmacéutica", tal como se define en la presente invención, ya que el medicamento implica necesariamente un efecto terapéutico es decir, un efecto fisiológico en el metabolismo del sujeto.

- 30 El medicamento al que se refiere la presente invención puede ser de uso humano o veterinario. El "medicamento de uso humano" es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades en seres humanos o que puedan usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico. El "medicamento de uso veterinario" es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas y/o preventivas con respecto a las enfermedades animales o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico veterinario. También se considerarán "medicamentos veterinarios" las "premezclas para piensos medicamentosos" -elaboradas para ser incorporadas a un pienso.
- 35

- 40 El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción del extracto de la invención, estabiliza dicho extracto o ayuda a la preparación del medicamento en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

- 45 La composición de la invención puede comprender además un vehículo farmacológicamente aceptable. Además, el vehículo debe ser farmacéuticamente aceptable. Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluye, pero sin limitarse, sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos. El vehículo puede ser una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de las secuencias de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación del extracto de la invención así como también de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo es el diluyente. El vehículo farmacológicamente aceptable podría ser, pero sin limitarse, una nanopartícula, un liposoma, una micela o una microemulsión.
- 50

- 55 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Muestra un esquema de la estrategia NIT-zipper para el desarrollo de micro y nanopartículas multifuncionales.

EJEMPLOS

5 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad del procedimiento de la presente invención y de los productos obtenidos por dicho procedimiento.

Síntesis de nanopartículas superparamagnéticas

10 Nanopartículas monodispersas de Fe_3O_4 de 8 nm de diámetro medio fueron sintetizadas siguiendo el procedimiento de semilla-crecimiento descrito por Sun et al, (*J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 273–279). Para ello, semillas de 6 nm de Fe_3O_4 fueron sintetizadas mezclando $\text{Fe}(\text{acac})_3$ (2 mmol), 1,2-hexadecanodiol (10 mmol), ácido oléico (6 mmol), oleilamina (6 mmol), y bencil éter (20 mL) bajo un flujo de nitrógeno. La mezcla se calentó a 200 °C durante 2 horas y después se mantuvo a reflujo (300 °C) durante 1 hora. La disolución se enfrió a temperatura ambiente y después se lavó con metanol para eliminar el disolvente y finalmente redispersarlas en hexano. El recrecimiento de las nanopartículas de 6 nm para obtener nanopartículas de 8 nm se realizó como se indicó anteriormente y adicionando 84 mg de nanopartículas de 6 nm dispersas en hexano.

Transferencia de las nanopartículas superparamagnéticas a agua

20 Para que estas nanopartículas puedan ser usadas en aplicaciones biomédicas, es necesario que sean estables en fase acuosa, y esto se puede realizar gracias a la utilización de una cubierta polimérica. Las nanopartículas de 8 nm de Fe_3O_4 se funcionalizaron con el poli(anhidrido maleico-alt-1-octadeceno) (PMAO) tal y como está descrito en Moros et al (*Nanoscale* 2010, 2(9), 1746-1755). Para ello, 280 mg de PMAO son adicionados a un matraz con 200 mL de cloroformo. Una vez que el polímero esté disuelto, 20 mg de nanopartículas son añadidas a la mezcla agitando fuertemente durante 1 h a 25 °C. Después se elimina el disolvente bajo vacío y las nanopartículas se resuspenden en unos pocos mililitros de cloroformo. 20 mL de NaOH 0.05M son adicionados a esta disolución. Después se elimina de nuevo el disolvente bajo vacío. En este punto la disolución se clarifica ya que las nanopartículas han sido completamente transferidas al agua. El exceso de polímero se elimina por centrifugación a 25000 rpm durante 2 h. Las nanopartículas de menor tamaño, así como el exceso de polímero sin unir se quedan en el sobrenadante; las nanopartículas precipitadas se recuperan y redispersan en agua. Este método de funcionalización permite la introducción del polímero deseado, sin modificar la morfología de las nanopartículas.

Funcionalización con PNA_A

30 Para obtener nanopartículas PMAO-NPs funcionalizadas con PNA (PNA-PMAO-NPs), 0.4 mg de PMAO-NPs fueron incubados toda la noche con EDC y NHS, ambas con una concentración final de 20 mM, SDS 0.01% y 93 pmol de PNA- NH_2 en buffer fosfato 10 mM (pH 7), 0.1 M NaCl. Las NPs fueron purificadas del exceso de ligando y reactivos mediante lavados con buffer usando sistemas de filtración por centrifugación.

35 Para demostrar que el procedimiento de funcionalización ha tenido lugar, un ensayo de hibridación se llevó a cabo. Para ello 46.5 pmol de PNA complementario o no complementario se dejó interaccionar con 0.2 mg de PNA-PMAO-NPs en buffer fosfato (pH7), 0.1 M NaCl. Después de 2 h a temperatura ambiente, las muestras se introdujeron en un gel de agarosa donde el PNA no hibridado se separó de PNA-PMAO-NPs. Mediante la intercalación de GelRed en el PNA recogido, es posible cuantificar la cantidad de PNA hibridado mediante medidas de fluorescencia.

Complejo Ácido Fólico-ADN_B.

40 El grupo carboxilo del ácido fólico ha sido activado con NHS y DCC tal y como describió Yoo et al [*Journal of Controlled Release* 100 (2004) 247–256]. Para ello, 0.23 mmol de ácido fólico disueltos en 1 mL de DMSO y 250 μL de trietilamina se pusieron a reaccionar con DCC y NHS, con una relación molar fólico/NHS/DCC 1:2:2 a temperatura ambiente durante 12 h. Después de esto una breve centrifugación permitió eliminar los subproductos no solubles. El ácido fólico activado fue después purificado por gel-filtración en una columna PD-10. El filtrado fue entonces liofilizado y resuspendido en DMSO. Para preparar el complejo fólico-PNA 1.1 nmol de NHS-fólico se dejó reaccionar toda la noche bajo agitación. Con 11 nmol de 3' amino modificado ADN en 0.2M de buffer fosfato (pH 7.5) 0.1 M NaCl. El complejo fólico-ADN fue después purificado mediante centrifugación con sistemas de filtración por centrifugación con un corte de membrana de 30 kDa.

Síntesis de nanopartículas de oro-citrato

50 Las nanopartículas de oro citrato se sintetizaron mediante la reducción del ácido tetracloroaurico (HAuCl_4) con citrato sódico, tal y como ha sido descrito anteriormente (*Lee and Meisel, J Phys Chem* 86: 3391-3398). En este método una mezcla de una sal de oro y citrato sódico son calentados bajo reflujo. La disolución coloreada amarillo pálido pasó a tener un color rojizo característico de las nanopartículas de oro. La suspensión de las nanopartículas fue observada con un microscopio electrónico de transmisión (TEM), observándose tamaños de 14 nm para estas nanopartículas.

Síntesis de nanopartículas de oro PEGiladas

5 Para poder llevar a cabo posteriores reacciones de funcionalización sobre las nanopartículas de oro, se han empleado espaciadores bifuncionales de polietilenglicol (PEG), con un extremo terminado en un grupo tiol para su unión covalentemente sobre las nanopartículas de oro y otro grupo funcional en el otro extremo que permite la incorporación de diversos compuestos. Hemos usado cadenas de polietilenglicol con un grupo tiol en un extremo y un grupo carboxilo en el otro para su posterior funcionalización empleando química clásica de carbodiimida. El espaciador empleado es el SH-EG(7)-CH₂-COOH. Se han preparado nanopartículas saturadas con un 25% de estas cadenas de PEG en orden a permitir la incorporación de otros compuestos tiolados tales como SH-PNA. Para ello, una mezcla de 10 0.5 mg/mL de nanopartículas de oro-citrato, 0.028% SDS y 0.03 mg/mL SH-EG(7)-CH₂-COOH (Iris-Biotech) se dejó reaccionar durante 16h a temperatura ambiente con una disolución 25 mM de NaOH. El exceso de PEG se eliminó por centrifugación a 14000 rpm durante 30 minutos a 4°C.

Nanopartículas de oro funcionalizadas con PNA

15 Se disolvió PNA tiolado en 1 mL de 0.1 M DTT. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, las moléculas de PNA reducidas fueron purificadas empleando una columna NAP-10 (GE Helthcare). 0.035 nmol de este PNA fue incubado con una disolución de Au-PEG (0.45 mg/mL) durante 16 h a 4°C. Después las nanopartículas fueron purificadas por centrifugación a 13000 rpm durante 20 minutos a 4°C y resuspendidas en agua. Este proceso se repitió 3 veces.

Multifuncionalización de las NPs

20 Para la multifuncionalización de las NPs (superparamagnéticas y de oro), se llevó a cabo un ensayo de hibridización donde se adicionó la misma cantidad de complejo-DNA que la cantidad de PNA situada sobre las nanopartículas PNA-NPs, a una disolución de estas NPs en buffer fosfato (pH 7) 0.1 M NaCl. Después de 2 h la muestra se introdujo en un gel de agarosa para separar el PNA no hibridado. Se han empleado dos tipos de complejos-ADN, por un lado el complejo fólico-ADN cuya síntesis ha sido descrita anteriormente, y por otro lado el complejo comercial fluoróforo-ADN.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de materiales multifuncionales que comprende las siguientes etapas:
 - a. activación química de grupos funcionales presentes en un material base micro o nanoestructurado;
 - 5 b. reacción de sustitución nucleófila entre al menos un grupo amino o carboxilo terminal de una cadena de PNA tipo A o un grupo amino o tiol de una cadena de ADN tipo A y al menos un grupo funcional activado del material base obtenido en la etapa (a);
 - c. conjugación de una cadena de PNA/ADN tipo B, complementaria a la cadena PNA/ADN tipo A, a una biomolécula mediante activación química de grupos funcionales; y
 - 10 d. hibridación de las cadenas PNA/ADN tipo A, que están unidas al material base según la etapa b) y las cadenas de PNA/ADN tipo B que tienen unidas biomoléculas, según la etapa c) mediante el reconocimiento molecular PNA-PNA o PNA-ADN.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde los grupos funcionales a activar, presentes en el material base micro o nanoparticulado se seleccionan entre grupos -OH, -COOH, -CHO, -NH₂, -SH, azidas o alquinos.
3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde la activación de los grupos funcionales se lleva a cabo mediante un reactivo seleccionado entre carbodiimida, glutaraldehído, espaciadores bifuncionales, bromuro de cianógeno, epóxidos, N-hidroxisuccinimida, sulfo-N- hidroxisuccinimida.
- 15 4. Procedimiento según la reivindicación 3, donde el reactivo se selecciona entre EDC, DCC, DIC, NHS, Sulfo-NHS, HATU, CDI o cualquiera de sus combinaciones.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, donde el reactivo es una combinación de NHS y EDC.
- 20 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el material base es de tipo microparticulado.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, donde el material base de tipo microparticulado se seleccionan entre polímeros orgánicos naturales, polímeros orgánicos sintéticos, soportes inorgánicos y *palancas* de silicio.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, donde los polímeros orgánicos naturales se seleccionan del grupo formado por polisacáridos y proteínas fibrosas.
- 25 9. Procedimiento según la reivindicación 7, donde los polímeros orgánicos sintéticos se seleccionan del grupo formado por poliolefinas y polímeros acrílicos.
10. Procedimiento según la reivindicación 7, donde los soportes inorgánicos se seleccionan del grupo formado por soportes inorgánicos naturales y sintéticos.
- 30 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, donde el material base de tipo microparticulado tiene un tamaño de diámetro medio de entre 0,1 e 700 µm.
12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, donde el material base de tipo microparticulado tiene un tamaño de diámetro medio de entre 0,1 e 100 µm.
13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el material base es de tipo nanoestructurado.
- 35 14. Procedimiento según la reivindicación 13, donde el material base nanoestructurado se selecciona entre nanopartículas de oro, nanopartículas de plata, nanopartículas de carbono, nanopartículas de oro-citrato, nanopartículas de óxidos de metales, nanopartículas superparamagnéticas, nanopartículas magnéticas, nanopartículas de sílica, nanopartículas de silicio, nanopartículas poliméricas, nanotubos de carbono, nanohilos de silicio y polisacáridos, nanopartículas de paladio, dendrímeros, nanopartículas de platino, nanocristales semiconductores, liposomas o cualquiera de sus combinaciones.
- 40 15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, donde el material base nanoparticulado tiene un tamaño de diámetro medio de entre 2 y 100 nm.
16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, donde el material base nanoestructurado está recubierto por una cubierta orgánica seleccionada entre citrato, aminoácidos naturales y no naturales, polietilenglicoles con grupos terminales amino, tiol hidroxilo o azida, polímeros o polisacáridos y sílica.
- 45 17. Procedimiento según la reivindicación 16, donde la cubierta orgánica es un polímero.
18. Procedimiento según la reivindicación 17, donde el polímero es el poli(anhídrido maleico-alt-1-octadeceno).

19. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, donde las biomoléculas que se conjugan con las cadenas PNA o ADN tipo B, se seleccionan entre moléculas de reconocimiento biológico, agentes terapéuticos, profármacos, trazadores, péptidos de internalización celular y agentes bloqueantes.
- 5 20. Procedimiento según la reivindicación 19, donde las moléculas de reconocimiento biológico se seleccionan entre vitaminas, hormonas o péptidos con actividad biológica, dominios extracelulares de receptores de membrana o moléculas de adhesión celular, toxinas, lectinas, enzimas, anticuerpos, minianticuerpos y aptámeros.
21. Procedimiento según la reivindicación 19, donde los agentes terapéuticos se seleccionan entre fármacos hidrofóbicos, fármacos hidrofílicos, toxinas y radioisótopos.
- 10 22. Procedimiento según la reivindicación 19, donde los trazadores se seleccionan entre marcadores fluorescentes, agentes de contraste de resonancia magnética y radioisótopos.
23. Procedimiento según la reivindicación 19, donde los péptidos de internalización celular se seleccionan entre aquellos que tienen menos de 30 aminoácidos y son anfifílicos o con carga neta positiva.
24. Procedimiento según la reivindicación 19, donde los agentes bloqueantes se seleccionan entre polietilenglicoles y azúcares.
- 15 25. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, donde en la etapa d), la hibridación de las cadenas PNA/ADN tipo A, que están unidas al material base y las cadenas de PNA/ADN tipo B que tienen unidas biomoléculas, se lleva a cabo a temperaturas inferiores a la temperatura de fusión (T_m) de dichas cadenas mediante el reconocimiento molecular PNA-PNA o PNA-ADN.
26. Procedimiento según la reivindicación 25, donde las temperaturas de fusión están dentro del intervalo de 25 a 80°C.
- 20 27. Material funcionalizado obtenible según el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26.
28. Uso del material funcionalizado de la reivindicación 27, para la detección de biomoléculas *in vitro*.
29. Uso según la reivindicación 28, como biochip, biosensor en formato soluble o anclado a una superficie, sistemas de separación basados en partículas magnéticas, sistemas de separación basados en partículas de metales nobles, columnas de purificación, *microarrays* o agentes de contraste basados en nanopartículas magnéticas.
- 25 30. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 28 ó 29, donde las biomoléculas son proteínas, vitaminas, péptidos o ácidos nucleicos.
31. Uso del material funcionalizado de la reivindicación 27, para la elaboración de un medicamento.
32. Uso según la reivindicación 31, donde el medicamento es para la liberación dirigida de fármacos.
- 30 33. Uso según la reivindicación 32, donde el fármaco es un radio isótopo seleccionado entre iodo-125, paladio-103, oro-198, ^{99m}Tc , Ga-68 ó Cu-64 o un citotóxico.
34. Uso según la reivindicación 33, donde el citotóxico es la doxorubicina.
35. Uso del material funcionalizado de la reivindicación 27, como catalizador industrial en procesos de química fina y farmacéutica, biocombustibles, química de alimentos o química analítica.
36. Composición farmacéutica o veterinaria que comprende el material funcionalizado de la reivindicación 27.

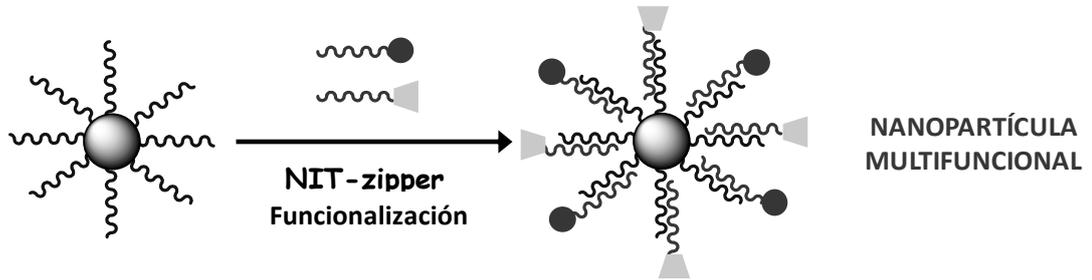


FIG. 1



- ②① N.º solicitud: 201130713
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 05.05.2011
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	NIEMEYER C. M. "Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: biotechnology meets materials science." <i>Angewandte Chemie International Edition</i> (2001) Vol. 40, páginas 4128-4158. Páginas 4129-4134, 4137-4139, 4146, 4149-4150, 4153-4154.	1-4,6,11-16,19-22, 27-36
X	MILANO G., MUSUMECI D., GAGLIONE M. y MESSERE A. "An alternative strategy to synthesize PNA and DNA magnetic conjugates forming nanoparticle assembly based on PNA/DNA duplexes." <i>Molecular BioSystems</i> (2010) Vol. 6, página 553-561. Páginas 553-555 y 559.	1-5,13-16, 19-20,27,31-32,36
X	PITA M, ABAD J. M., VAZ-DOMINGUEZ C., BRIONES C., MATEO-MARTÍ E., MARTÍN-GAGO J. A., MORALES M., FERNÁNDEZ V. "Synthesis of cobalt ferrite core/metallic Shell nanoparticles for the development of a specific PNA/DNA biosensor." <i>Journal of Colloid and Interface Science</i> (2008) Vol. 321, páginas 484-492. Todo el documento.	1-2,13-15, 27-29,31-32,36
A	JAE-HONG KIM et al. "A functionalized gold nanoparticles-assisted universal carrier for antisense DNA." <i>Chemical Communications</i> (2010) Vol. 46, páginas 4151-4153. Todo el documento.	1-36

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:

<p>Fecha de realización del informe 29.01.2013</p>	<p>Examinador M. J. García Bueno</p>	<p>Página 1/5</p>
---	---	------------------------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N15/10 (2006.01)

C12Q1/68 (2006.01)

B82Y5/00 (2011.01)

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

C12N, C12Q, 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, WPI, TXTE, TXTF, XPESP, NPL, MEDLINE, BIOSIS.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.01.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 7-10, 17-18, 23-26	SI
	Reivindicaciones 1-6, 11-16, 19-22, 27-36	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 7-10, 17-18, 23-26	SI
	Reivindicaciones 1-6, 11-16, 19-22, 27-36	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	NIEMEYER C. M. "Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: biotechnology meets materials science." <i>Angewandte Chemie International Edition</i> (2001) Vol. 40, páginas 4128-4158. Páginas 4129-4134, 4137-4139, 4146, 4149-4150, 4153-4154.	2001
D02	MILANO G., MUSUMECI D., GAGLIONE M. y MESSERE A. "An alternative strategy to synthesize PNA and DNA magnetic conjugates forming nanoparticle assembly based on PNA/DNA duplexes." <i>Molecular BioSystems</i> (2010) Vol. 6, páginas 553-561. Páginas 553-555 y 559.	2010
D03	PITA M, ABAD J. M., VAZ-DOMINGUEZ C., BRIONES C., MATEO-MARTÍ E., MARTÍN-GAGO J. A., MORALES M., FERNÁNDEZ, V. "Synthesis of cobalt ferrite core/metallic Shell nanoparticles for the development of a specific PNA/DNA biosensor." <i>Journal of Colloid and Interface Science</i> (2008) Vol. 321, páginas 484-492. Todo el documento.	2008
D04	JAE-HONG KIM et al. "A functionalized gold nanoparticles-assisted universal carrier for antisense DNA." <i>Chemical Communications</i> (2010) Vol. 46, páginas 4151-4153. Todo el documento.	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 de invención consiste en un procedimiento de obtención de materiales multifuncionales (reivindicaciones 1-26), los materiales obtenidos mediante dicho procedimiento (reivindicación 27), sus usos (reivindicaciones 28-35), y la composición farmacéutica que lo comprende (reivindicación 36).

El documento D01 consiste en una revisión de los enfoques actuales relacionados con la investigación de materiales, nanociencia y biotecnología molecular.

El documento D02 consiste en la síntesis de nanoconjugados magnéticos de PNA y DNA.

El documento D03 consiste en la síntesis de nanopartículas magnéticas cubiertas de oro soluble en agua para el desarrollo de biosensores de ADN.

El documento D04 consiste en un estudio sobre nanopartículas de oro funcionalizado con ADN de cadena simple en sistemas de genes (ver todo el documento).

1.- NOVEDAD (Art. 6.1 Ley 11/1986) Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art 8.1 Ley 11/1986).**1.1.- Reivindicaciones 1-6, 11-16, 19-22, 27- 36.**

El documento D01 se considera el más próximo al estado de la técnica al objeto de las reivindicaciones 1-36, y divulga un procedimiento de obtención de materiales multifuncionales que comprende la de activación química de grupos funcionales presentes en el material nanoestructurado, la reacción de sustitución nucleófila entre la cadena de un análogo de nucleótido o DNA y un grupo funcional activado del material base, la conjugación con las cadenas complementarias del análogo y DNA y la hibridación de las cadenas del análogo y DNA. El grupo funcional es el grupo tiol y lo activan reactivos carbodiimidas como NHS. Los materiales base de tipo micro o nanoestructurado son partículas de oro citrato o grupos tiol.

Las biomoléculas que se conjugan con las cadenas de los análogos de nucleótidos o ADN son moléculas de reconocimiento biológico como anticuerpos o enzimas, agentes terapéuticos o marcadores fluorescentes.

El material funcionalizado obtenible con el procedimiento descrito se utiliza como biosensores, en la elaboración de medicamentos, en concreto para la liberación de fármacos, o catalizadores (ver páginas 4129-4134, 4137-4139, 4146, 4149-4150, 4153-4154).

El documento D02 divulga un procedimiento de obtención de materiales multifuncionales que comprende la de activación química de grupos funcionales presentes en el material nanoestructurado, la reacción de sustitución nucleófila entre la cadena de PNA o DNA y un grupo funcional activado del material base, la conjugación con las cadenas complementarias de PNA y DNA y la hibridación de las cadenas de PNA y DNA. El grupo funcional es el grupo carboxilo y lo activan reactivos carbodiimidas como NHS y EDC. Los materiales base de tipo nanoestructurado son nanopartículas magnéticas con una cubierta de dextranos (ver páginas 554-555 y 559).

Las biomoléculas que se conjugan con las cadenas de PNA o ADN son moléculas de reconocimiento biológico como péptidos con actividad biológica o aptámeros.

El material funcionalizado obtenible con el procedimiento descrito se utiliza en la elaboración de medicamentos, en concreto para la liberación de fármacos (ver páginas 553-555 y 559).

El documento D03 divulga un procedimiento de obtención de materiales multifuncionales que comprende la activación química de grupos funcionales presentes en el material nanoestructurado, la reacción de sustitución nucleófila entre la cadena de PNA o DNA y un grupo funcional activado del material base, la conjugación con las cadenas complementarias de PNA y DNA y la hibridación de las cadenas de PNA y DNA. Los grupos funcionales son los grupos amino y tiol y los materiales base nanoestructurados son nanopartículas magnéticas con una cubierta de oro (ver página 484-488).

El material funcionalizado obtenido por dicho procedimiento se utiliza como biosensores y en la elaboración de medicamentos con liberación dirigida de fármacos.

Las características de las reivindicaciones 1-6, 11-16, 19-22, 27-36 ya son conocidas de los documentos D01-D03. Por lo tanto esas reivindicaciones no son nuevas ni implican actividad inventiva en el sentido de los artículos 6.1 y 8.1 Ley 11/1986.

1.2.- Reivindicaciones 7-10, 17-18 y 23-26.

Las reivindicaciones 7-10, 17-18 y 23-26 son nuevas e implican actividad inventiva en el sentido de los artículos 6.1 y 8.1 Ley 11/1986.