

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
28 de junio de 2012 (28.06.2012)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2012/085320 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
G01N 33/543 (2006.01) G01N 21/17 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2011/070893

(22) Fecha de presentación internacional:
22 de diciembre de 2011 (22.12.2011)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201031937
23 de diciembre de 2010 (23.12.2010) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
[ES/ES]; Edificio Emprendia - Campus Vida, E-15782
Santiago de Compostela (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **RIGUERA VEGA, Ricardo** [ES/ES]; Edificio Emprendia - Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela (ES). **MUÑOZ VALENTÍN, Eva María** [ES/ES]; Edificio Emprendia - Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela (ES). **LÓPEZ-RIVADULLA, Manuel** [ES/ES]; Edificio Emprendia - Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela (ES). **QUINTELA JORGE, Óscar** [ES/ES]; Edificio Emprendia - Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela (ES).

(74) Mandatario: **TORRENTE VILASÁNCHEZ, Susana**; Edificio Emprendia - Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: IMMUNOSENSOR SURFACE FOR THE DIRECT DETECTION OF BENZOYLECOGNINE BY MEANS OF SURFACE PLASMON RESONANCE

(54) Título : SUPERFICIE INMUNOSENSORA PARA LA DETECCIÓN DIRECTA DE BENZOILECGONINA MEDIANTE RESONANCIA DE PLASMÓN SUPERFICIAL

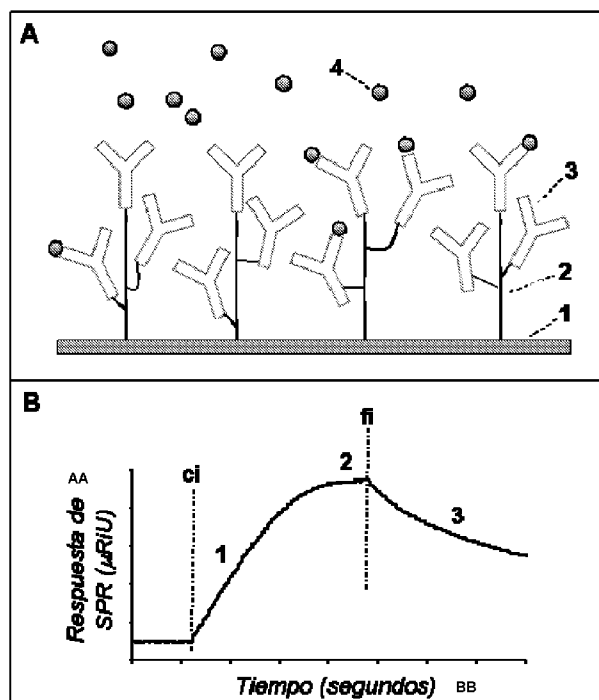


Figura 1

(57) Abstract: The invention relates to an immunosensor surface for the direct detection of benzoylecgonine by means of surface plasmon resonance. The invention is characterized in that it provides a novel immunosensor surface that enables direct real time detection of benzoylecgonine, the main metabolite of cocaine. The detection of benzoylecgonine is carried out by means of surface plasmon resonance. Two alternative methods are provided for analyzing the SPR data collected to determine the concentration of benzoylecgonine.

(57) Resumen: Superficie inmunosensora para la detección directa de benzoilecgonina mediante resonancia de plasmón superficial. En la presente invención se proporciona una nueva superficie inmunosensora que permite la detección directa, en tiempo real de benzoilecgonina, el principal metabolito de cocaína. La detección de benzoilecgonina se realiza mediante resonancia de plasmón superficial. Además, se proporcionan dos métodos alternativos de análisis de los datos de SPR recogidos para determinar la concentración de benzoilecgonina.

AA SPR response
BB Time (seconds)

WO 2012/085320 A1



GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible):*
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW,

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

SUPERFICIE INMUNOSENSORA PARA LA DETECCIÓN DIRECTA DE BENZOILECGONINA MEDIANTE RESONANCIA DE PLASMÓN SUPERFICIAL

Campo técnico de la Invención

La invención se dirige a la detección de benzoilecgonina, el principal metabolito de la cocaína, más en concreto se dirige a la detección directa de benzoilecgonina.

Antecedentes de la invención

La cocaína es un potente estimulante del sistema nervioso central. Su consumo provoca una energía extrema y agitación en un inicio, pasando después a temblores. La cocaína es la droga ilícita de mayor expansión en el mundo y generalmente es autoadministrada por inhalación nasal, inyección intravenosa y fumada.

Esta droga es la causante de un número importante de accidentes de tráfico cada año (Walsh, J.M., de Gier, J.J., Christopherson, A.S., Verstraete, A.G., 2004. Traffic Inj Prev. 5(3), 241-253) poniendo de manifiesto la necesidad del desarrollo de técnicas de identificación rápida para controles de droga en carretera.

En este sentido, el análisis de muestras de fluido oral presenta ventajas frente a otras matrices (como orina o sangre) ya que la recogida de muestra es fácil, rápida y no invasiva. Además, la cocaína y sus metabolitos difunden rápidamente al fluido oral desde el plasma, permitiendo la detección de consumo reciente de la droga.

En la actualidad, el método de análisis más sensible de cocaína/benzoilecgonina emplea la técnica de cromatografía líquida en combinación con la espectrometría de masas (Concheiro, M., de Castro, A., Quintela, O., Cruz, A., Lopez-Rivadulla, M., 2008. Anal Bioanal Chem. 391(6), 2329-2338; Concheiro, M., Gray, T.R., Shakleya, D.M., Huestis, M.A., 2010. Anal Bioanal Chem. 398(2), 915-924). Así, este método permite detectar benzoilecgonina en concentraciones por debajo del límite recomendado por la administración de "Substance Abuse and Mental Health Services Administration" (SAMHSA) y que está en 20 µg/L. Su desventaja radica en que se requiere el traslado de la muestra a un laboratorio haciendo más costoso y largo el proceso de identificación.

Por otro lado, existen sistemas de detección *in situ* de cocaína/benzoilecgonina en el mercado pero muchos carecen de precisión y ofrecen un análisis meramente cualitativo (Crouch, D.J., Walsh, J.M., Cangianelli, L., Quintela, O., 2008. Ther Drug Monit. 30(2), 188-195; Walsh, J.M., Crouch, D.J., Danaceau, J.P., Cangianelli, L., Liddicoat, L., Adkins, R., 2007. J Anal Toxicol. 31(1), 44-54).

Existe un creciente número de trabajos sobre diseño de sensores de cocaína cuyo objetivo es que sean sensibles y de rápida aplicación, sin embargo la mayoría de ellos siguen siendo métodos indirectos de detección. Los métodos indirectos de detección se caracterizan porque no miden directamente la interacción entre el elemento de reconocimiento y la benzoilecgonina de la muestra problema, sino que miden otra interacción u otra etapa relacionada con esta. En general, implican la realización de pasos adicionales de interacción y/o reacción a parte de la asociación entre cocaína/benzoilecgonina de la muestra problema con su elemento de reconocimiento. También implica, en algunos diseños, la necesidad de utilizar moléculas marcadas (por ejemplo, marcaje fluorescente). Estos requerimientos que caracterizan los métodos indirectos se traducen en una serie de inconvenientes: 1) un aumento en el tiempo de medida del sensor; 2) una mayor probabilidad de cometer errores de medida durante las múltiples etapas intermedias. 3) laboriosidad y encarecimiento del método cuando se emplean moléculas marcadas.

Un ejemplo de método indirecto está descrito en He, J.L., Wu, Z.S., Zhou, H., Wang, H.Q., Jiang, J.H., Shen, G.L., Yu, R.Q., 2010. Anal Chem. 82(4), 1358-1364, donde se emplea un aptámero como elemento de reconocimiento de benzoilecgonina y consta de tres etapas: la unión aptámero-benzoilecgonina (etapa 1) inicia la síntesis de una hebra de ADN (etapa 2) que a su vez interacciona con una molécula fluorescente (etapa 3). El detector mide cambios de fluorescencia en la molécula asociados a la su interacción con ADN y que se relacionan a su vez con la presencia de benzoilecgonina. Este dispositivo permite la detección de cocaína en concentración de 0,6 µg/L, pero en un tiempo de medida no menor de 1 hora.

Recientemente, se ha diseñado un sensor electroquímico de detección directa, *in situ*, de cocaína que utiliza un aptámero como elemento de reconocimiento de la droga (Swensen, J.S., Xiao, Y., Ferguson, B.S., Lubin, A.A., Lai, R.Y., Heeger, A.J., Plaxco, K.W., Soh, H.T., 2009. J Am Chem Soc. 131(12), 4262-4266). Sin embargo, con este dispositivo sólo se han detectado concentraciones de cocaína por encima de 2800 µg/L.

Por otro lado, en la última década, los inmunosensores de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) han cobrado gran importancia como dispositivos para la cuantificación de compuestos (Mullett, W.M., Lai, E.P., Yeung, J.M., 2000. Methods. 22(1), 77-91; Shankaran, D.R., Gobi, K.V., Miura, N., 2007. Sens. Actuators, B FIELD Full Journal Title: Sensors and Actuators, B: Chemical. B121(1), 158-177). Este tipo de sensores permite la detección precisa de analitos en matrices complejas, por la alta especificidad antígeno-anticuerpo. Además, son altamente sensibles gracias a la detección óptica basada en el fenómeno de SPR (Homola, J., 2008. Chem Rev. 108(2), 462-493). También tienen el

atractivo de ser dispositivos sencillos, de bajo coste de fabricación, y compatibles con las tecnologías de la microfabricación (Hoa, X.D., Kirk, A.G., Tabrizian, M., 2007. *Biosens Bioelectron.* 23(2), 151-160).

La detección directa por SPR ha estado limitada hasta hace pocos años a compuestos de peso molecular igual o superior a 1000 Dalton y en la actualidad, es posible detectar compuestos de peso molecular de alrededor de 200 Dalton. Sin embargo, para la mayoría de los casos la aplicación de SPR para la detección directa de moléculas pequeñas sigue siendo una metodología laboriosa y de baja sensibilidad (de Mol, N.J., 2010. *Affinity constants for small molecules from SPR competition experiments*. In: Springerlink (Ed.), *Methods Mol Biol: surface plasmon resonance*, pp. 101-111, 1 ed. Humana Press; Mitchell, J.S., Wu, Y., 2010. *Methods Mol Biol.* 627, 113-129). Los sensores de SPR detectan la masa de analito que se asocia a la superficie de un sensor-chip donde se encuentra inmovilizado su elemento de reconocimiento y por lo tanto, la sensibilidad del método es directamente proporcional al peso molecular del analito. Por esta razón las moléculas pequeñas proporcionan una señal de SPR menor, dificultando la realización de una medida precisa.

La escasez de resultados es un buen indicativo de las dificultades para desarrollar métodos directos en SPR para detectar moléculas pequeñas. Y de hecho, los avances científicos para la aplicación de SPR para la detección de drogas de bajo peso molecular siguen apuntando a metodologías indirectas. Por ejemplo, en el caso de Klenkar, G., Liedberg, B., 2008. *Anal Bioanal Chem.* 391(5), 1679-1688, se describe un sensor de detección indirecta de drogas, entre ellas la cocaína, que utiliza un sensor-chip en donde es la droga la que se encuentra inmovilizada en su superficie y a la que se une un anticuerpo como elemento de reconocimiento. El método consta de dos etapas: 1) asociación del anticuerpo a la droga inmovilizada en el chip, que se detecta mediante un incremento en la señal de SPR; 2) el chip se incuba con la muestra que contiene la droga en disolución, y que compete con la droga inmovilizada por su interacción con el anticuerpo. En este paso se produce una disminución de la señal de SPR correspondiente a la cantidad de anticuerpo que se desasoció de la droga inmovilizada para asociarse a la droga en disolución. Esta disminución está relacionada con la concentración de droga presente en la muestra.

Descripción de la invención

La invención proporciona una nueva superficie inmunosensora que permite la detección directa del principal metabolito de cocaína, benzoilecgonina, es decir, se detecta la

interacción entre un elemento de reconocimiento y la benzoilecgonina de la muestra problema. Además, permite que esta detección se realice además, *in situ*, y en tiempo real. Esta nueva superficie inmunosensora está especialmente diseñada para que el método de detección sea cuantitativo, preciso, selectivo y sensible. Una ventaja adicional es que esta superficie inmunosensora se puede utilizar por personal sin conocimientos específicos en la tecnología, la muestra a analizar no necesita ser tratada previamente y se puede reutilizar. De este modo, la invención proporciona una superficie inmunosensora adecuada para realizar controles de cocaína *in situ* con la precisión requerida, por ejemplo, durante controles en carretera.

- 10 Así, en un aspecto la invención se dirige a una superficie inmunosensora que comprende un soporte recubierto por una capa metálica a la que se une un polímero que inmoviliza al menos un anticuerpo anti-benzoilecgonina.

- En otro aspecto, la invención se dirige a una superficie inmunosensora que comprende un soporte recubierto por una capa metálica a la que se une un polímero que inmoviliza dos ó más anticuerpos anti-benzoilecgonina caracterizados por presentar diferente afinidad por benzoilecgonina.

Otro aspecto de la invención se dirige a un inmunosensor que comprende una superficie inmunosensora, como se definió anteriormente, y un transductor basado en el fenómeno óptico de la resonancia de plasmón superficial (SPR).

- 20 Otro aspecto de la invención se dirige a un aparato para la detección y cuantificación directa de benzoilecgonina que comprende un inmunosensor, como se definió anteriormente, y un dispositivo o instrumento para procesar o acondicionar la señal recibida durante la etapa de asociación o de disociación.

- Otro aspecto de la invención se dirige a un kit que comprende una superficie inmunosensora como se definió anteriormente.

Otro aspecto de la invención se dirige a un aparato portátil que comprende una superficie inmunosensora como se definió anteriormente.

Otro aspecto de la invención se dirige a un método de detección de benzoilecgonina y en otro aspecto a dos métodos alternativos para cuantificar benzoilecgonina.

- 30 Un último aspecto de la invención se dirige al uso de una superficie inmunosensora como se definió anteriormente para la detección directa de benzoilecgonina.

Breve descripción de las figuras

Figura 1A: representa de forma esquemática la asociación de benzoilecgonina a una superficie inmunosensora: (1) sensor-chip; (2) polímero; (3) anticuerpo; (4) benzoilecgonina.

- 5 Figura 1B: representa un sensorgrama donde se detallan las etapas de asociación (1) y equilibrio (2) tras el comienzo de inyección de la muestra (ci) y la etapa de disociación (3) una vez ha finalizada la inyección de muestra (fi).

Figura 2A y 2B: muestra los sensorgramas registrados al inyectar muestras con diferente concentración de benzoilecgonina (865, 433, 216, 108, 54, 27, 13.5 y 6.8 nM) sobre las superficies inmunosensoras de los ejemplos 1a y 1b, respectivamente.

10

Figura 3: muestra las curvas de calibrado del ejemplo 4 obtenidas tras el análisis de las etapas de (A) asociación y (B) disociación de los sensorgramas registrados con la superficie inmunosensora del ejemplo 1a.

Figura 4: muestra las curvas de calibrado del ejemplo 4 obtenidas tras el análisis de las etapas de (A) asociación y (B) disociación de los sensorgramas registrados con la superficie inmunosensora del ejemplo 1b.

15

Figura 5: muestra las gráficas de correlación entre valores de concentración de benzoilecgonina obtenidos experimentalmente con la superficie inmunosensora II y valores calculados con las curvas de calibrado del ejemplo 4, obtenidas tras el análisis de las etapas de (A) asociación y (B) disociación.

20

Descripción detallada de la invención

En la presente invención se entiende por superficie inmunosensora, un receptor biológico preparado para detectar específicamente una sustancia debido a la especificidad de la interacción receptor-sustancia. Así, el anticuerpo anti-benzoilecgonina es capaz de reconocer específicamente benzoilecgonina en una muestra problema. La afinidad característica de cada anticuerpo determina el rango de concentración de benzoilecgonina que es posible detectar con dicho anticuerpo. Este viene definido por límites superior e inferior de detección correspondientes a 10 veces y 0,1 veces la constante de disociación de la interacción benzoilecgonina-anticuerpo, respectivamente. Por lo tanto la utilización de diferentes anticuerpos anti-benzoilecgonina en una misma superficie inmunosensora permite detectar benzoilecgonina en diferentes rangos de concentración. Sobre el sensor-chip se pueden definir varios canales independientes donde es posible inmovilizar anticuerpos diferentes que operen en rangos de concentración distintos. En una realización

25

30

particular, la superficie inmunosensora comprende entre dos y seis anticuerpos anti-benzoilecgonina caracterizados por presentar diferente afinidad por benzoilecgonina. En una realización más particular, la superficie inmunosensora comprende entre dos y cuatro anticuerpos anti-benzoilecgonina caracterizados por presentar diferente afinidad por benzoilecgonina. En otra realización particular, la superficie inmunosensora comprende un anticuerpo anti-benzoilecgonina.

En una realización particular, la superficie inmunosensora comprende además un canal adicional blanco. Se entiende por canal blanco o control, aquel canal que no comprende un anticuerpo y así la detección de señal en dicho canal corresponderá al blanco o control con la que se compararán las demás señales de medida. Esto permite descartar las señales de ruido o interferencia que pudiera haber.

En una realización particular, la superficie inmunosensora consiste en un soporte recubierto por una capa metálica a la que se une un polímero que inmoviliza al menos un anticuerpo anti-benzoilecgonina y un canal blanco. En una realización más particular, la superficie inmunosensora consiste en un soporte recubierto por una capa metálica a la que se une un polímero que inmoviliza entre uno y seis anticuerpos anti-benzoilecgonina caracterizados por presentar diferente afinidad por benzoilecgonina y un canal blanco.

En una realización preferida de la invención, los anticuerpos anti-benzoilecgonina se seleccionan entre anticuerpos monoclonales o anticuerpos policlonales. Se entiende por “anticuerpos policlonales” aquellos que son producidos por una variedad de células madre y están constituidos por una mezcla fisiológica natural de anticuerpos estructuralmente distintos, que se unen a distintas partes del antígeno. Se entiende por “anticuerpos monoclonales” aquellos que son producidos por células madre idénticas y están constituidos por anticuerpos idénticos; su homogeneidad estructural se traduce en una mayor especificidad y afinidad por el antígeno. En una realización más preferida de la invención los anticuerpos anti-benzoilecgonina son anticuerpos monoclonales. Ejemplos de anticuerpos monoclonales anti-benzoilecgonina, aunque la invención no se limita a los mismos, son los anticuerpos B1077-01, B1077-08, B1077-09, B1077-10, B1077-12 y B1077-15 (estos anticuerpos están comercializados por USBiological).

En la presente invención se entiende por “inmovilización del anticuerpo” la unión estable y efectiva del anticuerpo al polímero. La unión estable y efectiva conduce a una detección de benzoilecgonina con mayor reproducibilidad y sensibilidad, y de este modo se solucionan los problemas del estado de la técnica para la detección de moléculas pequeñas de forma directa. Se proporciona una superficie inmunosensora capaz de detectar de forma directa y

en tiempo real la benzoilecgonina y cuantificarla. Además permite la reutilización de la superficie sensora. Es posible conseguir una inmovilización estable, por ejemplo, mediante enlaces covalentes entre el polímero y el anticuerpo. Así, en una realización particular, los anticuerpos anti-benzoilecgonina se unen al polímero mediante enlaces covalentes. En una

5 realización más particular, los enlaces covalentes se seleccionan entre enlace amida y enlace tipo carbonilo-hidrazina. El enlace amida se puede formar entre grupos carboxílicos del polímero y grupos amino presentes en amino ácidos lisina del anticuerpo. En una realización preferida de la invención, el enlace covalente entre el polímero y el anticuerpo es un enlace tipo carbonilo-hidrazina. El enlace carbonilo-hidrazina se puede formar entre

10 grupos carboxílicos del polímero modificados mediante transformaciones químicas a grupos hidrazina y grupos hidroxilo del anticuerpo, modificados mediante transformaciones químicas a grupos aldehído. Se entiende por “polímero modificado” aquel polímero intermedio obtenido mediante transformaciones químicas a partir de un polímero carboxilado como las que se recogen en Homola, J., 2008. Chem Rev. 108(2), 462-493. El

15 enlace tipo carbonilo-hidrazina se puede formar entre grupos carboxílicos del polímero y grupos hidroxilo de cis-dioles presentes en carbohidratos del anticuerpo. El enlace tipo carbonilo-hidrazina permite una inmovilización dirigida ya que los cis-dioles se encuentran en una región específica del anticuerpo (región Fc) que no participa en la interacción con benzoilecgonina. De esta manera, todos los anticuerpos se inmovilizan en una orientación

20 adecuada donde se mantiene la actividad de sus centros activos. En una realización particular el polímero se selecciona entre un polímero policarboxilado y un polímero policarboxilado modificado. Estos polímeros pueden estar ramificados y así los grupos carboxílicos o carboxílicos modificados pueden tener diferentes disposiciones en el espacio.

25 El término “inmovilización efectiva” se refiere a la inmovilización de un número suficiente de anticuerpos activos en la superficie; este número debe permitir la obtención de una señal tres veces superior a la sensibilidad del detector (que viene dada por el ruido de fondo) cuando se monitoriza la asociación de benzoilecgonina en una muestra de concentración igual al límite inferior de detección determinado por el anticuerpo. La cantidad de

30 anticuerpo que es posible inmovilizar está relacionada con la capacidad de inmovilización del polímero. En una realización particular, el polímero se selecciona entre polímeros con capacidad de inmovilizar una cantidad de anticuerpos anti-benzoilecgonina comprendida entre 730 pg/mm^2 y 73000 pg/mm^2 . Más preferiblemente la cantidad de anticuerpos anti-benzoilecgonina inmovilizados está comprendida entre 2190 pg/mm^2 y 58400 pg/mm^2 . Aún

35 más preferiblemente la cantidad de anticuerpos anti-benzoilecgonina inmovilizados está

comprendida entre 7300 pg/mm² y 29200 pg/mm². Para determinar la cantidad de anticuerpo anti-benzoilecgonina inmovilizada, se monitoriza en tiempo real la inmovilización del anticuerpo por el polímero seleccionado, midiendo el aumento de la señal de SPR en unidades uRiU (“micro-Refractive index Units”), teniendo en cuenta que 1
5 uRiU equivale a 0,73 pg/mm².

En una realización preferida de la invención, el polímero es antiadherente. En la presente invención se entiende por “polímero antiadherente” aquel polímero que es inerte a interacciones no específicas entre los componentes de la muestra y los sitios activos de unión del polímero. Una ventaja adicional de que sea inerte a interacciones no específicas y
10 se encuentre recubriendo la capa metálica es que protege a dicha capa metálica de la adhesión o interacción con sustancias de la muestra. Así, en una realización preferida, el polímero es un polímero antiadherente. En una realización más preferida, es un polímero antiadherente para muestras de fluidos orales. En una realización particular, el polímero se selecciona entre polímeros policarboxilados antiadherentes con capacidad de inmovilizar
15 entre entre 2190 pg/mm² y 58400 pg/mm². Ejemplos de polímeros policarboxilados antiadherentes, aunque la invención no se limita a éstos, son polímeros de polietilenglicol y cadenas ramificadas policarboxiladas (hidrogeles 3D) empleados en los sensor-chip comerciales HC1000 y HC1500 (Xantec Bioanalytics).

El polímero puede unirse a la capa metálica mediante técnicas conocidas, por ejemplo, mediante la unión entre el oro y átomos de azufre del polímero, estando estos átomos de azufre formando parte por ejemplo de grupos tiol, disulfuros o sulfuros. En una realización particular, la capa metálica se selecciona entre oro, plata, aluminio y cobre; más preferiblemente, entre oro y plata. En una realización preferida, la capa metálica tiene un grosor no superior a 200 nm, más preferiblemente tiene un grosor de entre 1 nm y 100 nm,
20 aún más preferiblemente tiene un grosor de entre 10 nm y 50 nm. En una realización particular, la capa metálica tiene un grosor de 50 nm.

El soporte sobre el que está dicha capa metálica puede ser de diferentes materiales, por ejemplo y sin ser limitativos, puede ser de vidrio o de material plástico. También es posible que ese soporte se presente en diferentes formas por ejemplo y sin limitarse, puede
30 presentar forma plana, cilíndrica, esférica o formar parte de una fibra óptica.

En una realización particular, la invención se dirige a una superficie inmunosensora que comprende un soporte de vidrio recubierto por una capa de oro de 50 nm y el polímero Hidrogel 3D que inmoviliza al menos un anticuerpo monoclonal anti-benzoilecgonina seleccionado entre B1077-08 y B1077-01.

En otro aspecto, la invención se dirige a un inmunosensor que comprende una superficie inmunosensora como se describió anteriormente y un transductor basado en el fenómeno óptico de la SPR. El inmunosensor de la invención permite la detección directa e *in situ* de benzoilecgonina presente en una muestra gracias al reconocimiento específico por un anticuerpo anti-benzoilecgonina inmovilizado sobre la superficie metálica de la superficie inmunosensora, como se describió anteriormente. Por medio del transductor basado en el fenómeno óptico de SPR se monitoriza, en tiempo real, la masa de benzoilecgonina asociada a esta superficie a través de la unión específica antígeno-anticuerpo.

En otro aspecto, la invención se dirige a un aparato para la detección y cuantificación directa de benzoilecgonina que comprende un inmunosensor como se describió anteriormente y un dispositivo o instrumento para procesar o acondicionar la señal recibida durante la etapa de asociación o de disociación. En una realización preferida, este aparato comprende además un dispositivo para realizar un cálculo. El dispositivo o instrumento para procesar o acondicionar la señal recibida permite su utilización en un dispositivo para realizar un cálculo. La lectura de la señal se puede realizar a través de una pantalla, digital o analógica o a través de un ordenador.

El inmunosensor de la invención presenta elevada sensibilidad y especificidad, y permite rapidez de medida y reproducibilidad. Además es reutilizable, como se probó en experimentos realizados recogidos en los ejemplos.

Además, el inmunosensor permite la detección en tiempo real, es factible su miniaturización, posibilitando así la automatización y la realización de ensayos en paralelo, lo cual permite su aplicación en aparatos portátiles. Así, en una realización particular, la invención se refiere a un aparato donde el inmunosensor está miniaturizado y el aparato es portátil.

Las ventajas del inmunosensor de la invención se resumen en los siguientes puntos: (1) es un sistema de detección directa y sin marcaje del analito. Esto elimina pasos intermedios y medidas indirectas que añaden posibles errores y alargan el tiempo de detección; (2) la medición se realiza en tiempo real, con obtención rápida de la respuesta; (3) posee alta especificidad, procedente del uso de un anticuerpo específico de benzoilecgonina como elemento de reconocimiento; (4) posee alta sensibilidad, que viene determinada por la afinidad antígeno-anticuerpo y el número de anticuerpos activos inmovilizados en la superficie inmunosensora; (5) no presenta interacción inespecífica con benzoilecgonina (u otros componentes de la muestra) debido a la presencia de una matriz polimérica antiadherente entre la superficie metálica y el anticuerpo; (6) es factible emplear un

- volumen reducido de muestra, por ejemplo es factible utilizar 100 μ L; (7) se trata de un dispositivo reutilizable ya que la superficie inmunosensora puede regenerarse para el análisis consecutivo de muestras; (8) ofrece ventajas tecnológicas como su fácil miniaturización, posibilidad de automatización y la realización de ensayos en paralelo; (10) versatilidad en el diseño del dispositivo inmunosensor ya que la elección del anticuerpo determina el rango de concentración de benzoilecgonina que puede medir. Así, es posible diseñar una superficie inmunosensora multicanal donde se incorporan anticuerpos con diferente afinidad por la benzoilecgonina y que cubren distintos rangos de concentración, como se describió anteriormente.
- 5 En otro aspecto, la invención se dirige a un método de detección de benzoilecgonina que comprende:
- i. poner en contacto la muestra problema con la superficie inmunosensora como se describió anteriormente,
 - 15 ii. detectar la señal de SPR durante la etapa de asociación y la etapa de disociación.

Para llevar a cabo la detección de benzoilecgonina es posible emplear el inmunosensor de la invención o un aparato que lo incorpore, tal y como se describió anteriormente que comprenden la superficie inmunosensora de la invención. La detección de la interacción antígeno-anticuerpo se realiza mediante un espectrómetro de SPR, y es posible incorporar un dispositivo para la medida de muestras en flujo continuo. De esta manera el anticuerpo puede estar en contacto permanente con una disolución reguladora que asegura la estabilidad del mismo. Esta disolución es sustituida por la muestra problema en el momento de su inyección. Durante la inyección de la muestra, el detector de SPR registra, en función del tiempo, el aumento de la señal de SPR asociado a la masa de benzoilecgonina que se une específicamente al anticuerpo inmovilizado durante el proceso de asociación. Una vez finalizada la inyección de muestra, se monitoriza la disminución de la señal de SPR que ocurre como consecuencia del proceso de disociación.

20 25

Para la cuantificación de benzoilecgonina en una muestra problema, la invención proporciona dos métodos alternativos basados en las etapas de asociación y de disociación.

30 Así, en un aspecto la invención se dirige a un método de cuantificación de benzoilecgonina que comprende:

- iii. detección de benzoilecgonina durante la etapa de asociación, según se describió anteriormente,

- iv. interpolación de la pendiente de la señal (dR/dt) obtenida en la etapa iii) en la recta de calibrado (dR/dt frente a concentración) para obtener el valor de concentración de benzoilecgonina.

La respuesta de SPR (R) varía linealmente con el tiempo (t) y la pendiente (dR/dt) es
5 directamente proporcional a la concentración en benzoilecgonina en la muestra (Figuras 3A y 4A). La curva de calibrado correspondiente relaciona la pendiente frente a la concentración.

En otro aspecto, la invención se dirige a un método alternativo de cuantificación de benzoilecgonina que comprende:

- 10 v. detección de benzoilecgonina durante la etapa de disociación, según se describió anteriormente,
- vi. interpolación de la señal (R) obtenida en la etapa v) en la recta de calibrado (R frente a concentración) para obtener el valor de concentración de benzoilecgonina.

15 La concentración de benzoilecgonina se puede determinar a través de una curva de calibrado donde se representa la repuesta de SPR una vez finalizada la inyección en función de la concentración de analito (Figuras 3B y 4B).

Las curvas de calibrado se obtienen mediante la detección de benzoilecgonina de una serie de muestras patrón de concentración conocida de benzoilecgonina, durante las etapas de
20 asociación y disociación, de forma similar a como se describió la detección para una muestra (Figura 1B).

En una realización preferida de la invención, la detección y cuantificación de benzoilecgonina se realiza en muestras de fluido oral, o en mezclas de fluido oral y una solución reguladora; de forma aún más preferida en muestras de saliva o en mezclas de
25 saliva y una solución reguladora.

En otro aspecto, la invención se dirige al uso de la superficie inmunosensora, como se describió anteriormente, para la detección directa de benzoilecgonina. En una realización preferida, la detección tiene lugar en tiempo real. En una realización aún más preferida, la detección se realiza en disoluciones reguladoras acuosas, en fluido oral o en mezclas de las
30 mismas. Por ejemplo, y sin limitarse, la disolución reguladora puede comprender tampón HEPES (Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacil-(1)] etanosulfónico), tampón fosfato o tampón TRIS (2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol).

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y en ningún caso debe de interpretarse como una limitación de la misma.

Ejemplo de realización de la invención

- 5 Los materiales empleados son los anticuerpos monoclonales B1077-08 y B1077-01 (USBiological), un sensor-chip HC1000 y un sensor-chip HC1500 (Xantec Bioanalytics) que consisten en un soporte de vidrio cubierto por una película de oro de 50 nM, cubierta a su vez por una matriz polimérica antiadherente policarboxilada (descrita por los proveedores como hidrogel 3D), la disolución reguladora HEPES* se preparó en el
- 10 laboratorio en las siguientes condiciones HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4.

La detección de benzoilecgonina se realiza en un espectrómetro de Resonancia de Plasmón Superficial Reichert SR7000DC, operando a una temperatura constante de 25 °C.

- Las muestras problema se prepararon por dilución de una disolución madre de benzoilecgonina de concentración 1mg/ml en metanol (Cerilliant Corporation) con la
- 15 disolución reguladora HEPES* o con fluido oral procedente de individuos sanos.

Ejemplo 1a. Fabricación de la superficie inmunosensora I con dos canales.

- El anticuerpo monoclonal B1077-08 se inmoviliza covalentemente sobre el canal analítico de un sensor-chip HC1000. La inmovilización se lleva a cabo por formación de enlaces tipo
- 20 amida entre los grupos carboxílicos de la superficie y grupos amino primarios del anticuerpo (Johnsson, B., Lofas, S., Lindquist, G., 1991. Anal Biochem. 198(2), 268-277). Durante la inmovilización, un flujo constante de disolución reguladora HEPES* se encuentra circulando sobre la superficie del sensor-chip, a un caudal de 10 µl/min. En primer lugar, el sensor-chip se lava con tres inyecciones consecutivas de 60 segundos cada
- 25 una de una disolución acuosa de NaOH 0,05 M / NaCl 1 M. Luego, la superficie se activa con una inyección de 10 minutos de la mezcla de reactivos N-hidroxisuccinimida (NHS) 0,05 M / N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) 0,2 M. De esta manera los grupos carboxílicos del sensor-chip son transformados en ésteres activos de succinimida. A continuación, se inyecta durante 10 minutos una disolución de anticuerpo B1077-08 (0,1
- 30 mg/ml en una disolución reguladora de acetato sódico 0,01 M, pH 4,0). Durante este paso, grupos amino del anticuerpo reaccionan espontáneamente con los ésteres de succinimida para formar enlaces tipo amida. Por último, la fracción de ésteres de succinimida que no reacciona se desactiva por inyección durante 10 minutos de una disolución de etanolamina

1 M, pH 8,5. La inmovilización del anticuerpo se monitorizó en tiempo real y un aumento de la señal de SPR de 11000 μRiUs confirmó la inmovilización. Teniendo en cuenta que 1 μRiU equivale a 0,73 pg/mm^2 , en este ejemplo concreto se inmovilizaron 8030 pg/mm^2 de anticuerpo.

- 5 El canal control se trata con la mezcla NHS/EDC seguido de etanolamina bajo las mismas condiciones experimentales que el tratamiento del canal analítico, pero sin inmovilizar el anticuerpo.

Ejemplo 1b. Fabricación de la superficie inmunosensora II con dos canales.

- El anticuerpo monoclonal B1077-01 se inmoviliza covalentemente sobre el canal analítico de un sensor-chip HC1500. La inmovilización se lleva a cabo por formación de enlaces tipo amida siguiendo el mismo procedimiento experimental que en el ejemplo 1a. La inmovilización del anticuerpo se monitorizó en tiempo real y un aumento de la señal de SPR de 10829 μRiUs (7905 pg/mm^2) confirmó la inmovilización del anticuerpo.

- El canal control se prepara siguiendo el mismo procedimiento experimental que en el ejemplo 1a.

Ejemplo 2. Detección directa de benzoilecgonina.

- Una disolución reguladora HEPES* circula sobre la superficie inmunosensora I a un flujo constante de 50 $\mu\text{l/min}$. La muestra que se quiere analizar se inyecta durante 2 minutos sobre la superficie inmunosensora al mismo flujo. La asociación de benzoilecgonina al anticuerpo inmovilizado se monitoriza en tiempo real a través del sensorgrama correspondiente. Tras la inyección de muestra, la disolución reguladora HEPES* vuelve a circular sobre la superficie y la etapa de disociación se monitoriza durante 3 minutos.

- La respuesta de SPR registrada en el canal control se resta de la respuesta registrada en el canal analítico. Además, se realiza una inyección “blanco” de disolución reguladora HEPES* sin benzoilecgonina en las mismas condiciones experimentales que la inyección de muestra, cuya respuesta también se resta del sensorgrama obtenido. Este procedimiento descrito en bibliografía como “método de doble referencia” se utiliza para corregir pequeñas desviaciones en el sensorgrama ajenas a la interacción específica antígeno-anticuerpo (Myszka, D.G., 1999. J Mol Recognit. 12(5), 279-284). El procesado de los sensorgramas se realiza mediante el software de SPR Scrubber (BioLogic v1.1g Software). Los sensorgramas registrados se muestran en la figura 2A para disoluciones tampón con distintas concentraciones de benzoilecgonina (865, 433, 216, 108, 54, 27, 13.5 y 6.8 nM).

El mismo experimento se realiza con la superficie inmunosensora II, variando únicamente el tiempo de inyección de muestra que en este caso es de 3 minutos. Los sensorgramas registrados se muestran en la figura 2B para disoluciones tampón con distintas concentraciones de benzoilecgonina (865, 433, 216, 108, 54, 27, 13.5 y 6.8 nM).

5

Ejemplo 3. Regeneración de la superficie inmunosensora.

La superficies inmunosensoras I y II se regeneran con una inyección de 1 minuto de glicina 0,01 M, pH 2,0. Esta disolución elimina por completo la benzoilecgonina que aún queda
10 unida al anticuerpo, sin dañar la superficie y dejándola preparada para la siguiente medida.

Ejemplo 4. Obtención de las curvas de calibrado.

Una serie de muestras de concentración conocida de benzoilecgonina (865, 433, 216, 108, 54, 27, 13,5 y 6,8 nM en HEPES*) se inyectan por duplicado sobre las superficies
15 inmunosensoras I y II de acuerdo con el procedimiento detallado en el ejemplo 2. Los sensorgramas obtenidos se caracterizan por una etapa de asociación donde la respuesta de SPR varía linealmente con el tiempo y la pendiente (dR/dt) es directamente proporcional a la concentración en benzoilecgonina en la muestra (Figura 2). Con estos datos se obtiene una curva de calibrado donde se representa la pendiente en función de la concentración de
20 benzoilecgonina (Figuras 3A y 4A). Con este método de análisis los inmunosensores que comprenden las superficies inmunosensoras I y II fabricadas presentan límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) análogos, de 6,8 nM (2 µg/L) y 13,5 nM (4 µg/L) respectivamente y operan en un rango lineal de concentración de 865 – 6,8 nM (250 – 2 µg/L).

25 Alternativamente, se realiza una segunda curva de calibrado donde se representa la respuesta de SPR tras finalizar la inyección (durante la etapa de disociación) en función de la concentración de benzoilecgonina (Figuras 3B y 4B). En este caso la curva de calibrado sigue un comportamiento lineal en el rango de concentraciones 54 – 6,8 nM (15,6 – 2 µg/L) y se mantienen los valores de LOD y LOQ medidos durante la etapa de asociación en
30 ambos inmunosensores.

A continuación, se describe una serie de ensayos realizados en estos ejemplos que ponen de manifiesto la reproducibilidad y estabilidad de las superficies inmunosensoras así como su utilidad para detectar benzoilecgonina en fluido oral:

- 5 - Se realizan inyecciones de muestras de benzoilecgonina de concentración conocida en fluido oral, siguiendo el procedimiento experimental descrito anteriormente, que se prepararon según la siguiente descripción: 1 ml de fluido oral se diluye en 3 ml de disolución tamponada HEPES*. A continuación, la muestra se filtra en dispositivos Amicon ultra (MWCO 3KDa), centrifugando a 6000 rpm y 25 ° C durante 40 min. En 1 ml
- 10 de la muestra filtrada se añade un volumen de disolución madre de benzoilecgonina (1 mg/ml en metanol) para obtener una concentración final de benzoilecgonina igual a 3,46 μ M. A partir de esta disolución se prepararan otras de menor concentración por dilución con los 3 ml restantes de muestra de fluido oral sin dopar. Bajo estas condiciones experimentales ambos inmunosensores detectan una concentración 13,5 nM (4 μ g/l) de
- 15 benzoilecgonina en la muestra de fluido oral.
- Se realizan ciclos consecutivos de inyección-regeneración sobre las dos superficies inmunosensoras, realizando inyecciones de benzoilecgonina en HEPES* o fluido oral y manteniendo una temperatura constante de 25 °C. Bajo estas condiciones experimentales el
- 20 inmunosensor I que comprende la superficie inmunosensora I mantiene su actividad durante 4 días y un número total de 54 ciclos de inyección-regeneración. El inmunosensor II que comprende la superficie inmunosensora II mantiene su actividad durante 10 días y un número total de 70 ciclos de inyección-regeneración.
- 25 - La reproducibilidad intra-ensayo se verifica mediante el análisis de muestras por duplicado donde el valor promedio de coeficiente de variación calculado entre valores correspondientes a la misma concentración es de 8,4 % y 10,9 % para las superficies inmunosensoras I y II, respectivamente. Estos valores son satisfactorios y se encuentran dentro del rango de valores de coeficiente de variación calculados en la determinación de
- 30 cocaína mediante cromatografía líquida en combinación con espectrometría de masas (Concheiro, M., Gray, T.R., Shakleya, D.M., Huestis, M.A., 2010. Anal Bioanal Chem. 398(2), 915-924).

- La reproducibilidad inter-ensayo del inmunosensor de mayor durabilidad (inmunosensor II), se verifica mediante el análisis de dos sets de muestras de concentración conocida de benzoilecgonina preparadas. El primer set se analiza y se genera la curva de calibrado correspondiente. El segundo set se analiza 8 días después y los valores obtenidos se comparan con los valores teóricos que se obtienen de la recta de calibrado preparada con el primer set de muestras (Figura 5). La excelente correlación entre estos valores ($r^2 \sim 0,99$; pendiente $\sim 1,00$) pone de manifiesto la notable reproducibilidad inter-ensayo.

Reivindicaciones

1. Superficie inmunosensora que comprende un soporte recubierto por una capa metálica a la que se une un polímero que inmoviliza al menos un anticuerpo anti-benzoilecgonina.
2. Superficie inmunosensora, según la reivindicación 1, que comprende entre dos y seis anticuerpos anti-benzoilecgonina caracterizados por presentar diferente afinidad por benzoilecgonina.
3. Superficie inmunosensora, según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde los anticuerpos anti-benzoilecgonina son anticuerpos monoclonales.
4. Superficie inmunosensora, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los anticuerpos se unen al polímero mediante enlaces covalentes tipo amida o tipo carbonilo-hidrazina.
5. Superficie inmunosensora, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el polímero se selecciona entre un polímero policarboxilado y un polímero policarboxilado modificado.
6. Superficie inmunosensora, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el polímero se selecciona entre polímeros con capacidad de inmovilizar una cantidad de anticuerpos anti-benzoilecgonina comprendida entre 730 pg/mm^2 y 73000 pg/mm^2 .
7. Inmunosensor que comprende:
 - a. una superficie inmunosensora como se describió en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 6, y
 - b. un transductor basado en el fenómeno óptico de la resonancia de plasmón superficial (SPR).
8. Aparato para la detección y cuantificación directa de benzoilecgonina que comprende un inmunosensor como se describió en la reivindicación 7 y un dispositivo o instrumento para procesar o acondicionar la señal recibida durante la etapa de asociación o de disociación.
9. Aparato, según la reivindicación 9, donde además comprende un dispositivo para realizar un cálculo.
10. Aparato, según cualquiera de las reivindicaciones de 8 a 9, donde el inmunosensor está miniaturizado y el aparato es portátil.

11. Kit que comprende una superficie inmunosensora como se describió en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 6.
12. Aparato portátil que comprende una superficie inmunosensora como se describió en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 6.
- 5 13. Método de detección de benzoilecgonina que comprende:
 - i. poner en contacto la muestra problema con la superficie inmunosensora como se describió en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 6,
 - ii. detectar la señal de SPR durante la etapa de asociación y la etapa de disociación.
- 10 14. Método de cuantificación de benzoilecgonina que comprende:
 - iii. detección de benzoilecgonina durante la etapa de asociación, según la reivindicación 13,
 - iv. interpolación de la pendiente de la señal (dR/dt) obtenida en la etapa iii) en la recta de calibrado (dR/dt frente a concentración) para obtener el valor de
 - 15 concentración de benzoilecgonina.
15. Método de cuantificación de benzoilecgonina que comprende:
 - v. detección de benzoilecgonina durante la etapa de disociación, según la reivindicación 13,
 - vi. interpolación de la señal (R) obtenida en la etapa v) en la recta de calibrado (R frente a concentración) para obtener el valor de concentración de
 - 20 benzoilecgonina.
16. Uso de una superficie inmunosensora, según se definió en la cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 6, para la detección directa de benzoilecgonina.
17. Uso, según la reivindicación 16, donde la detección tiene lugar en tiempo real.
- 25 18. Uso, según las reivindicaciones 16 y 17, donde la detección se realiza en disoluciones acuosas reguladoras, en fluido oral o en mezclas de las mismas.

1 / 6

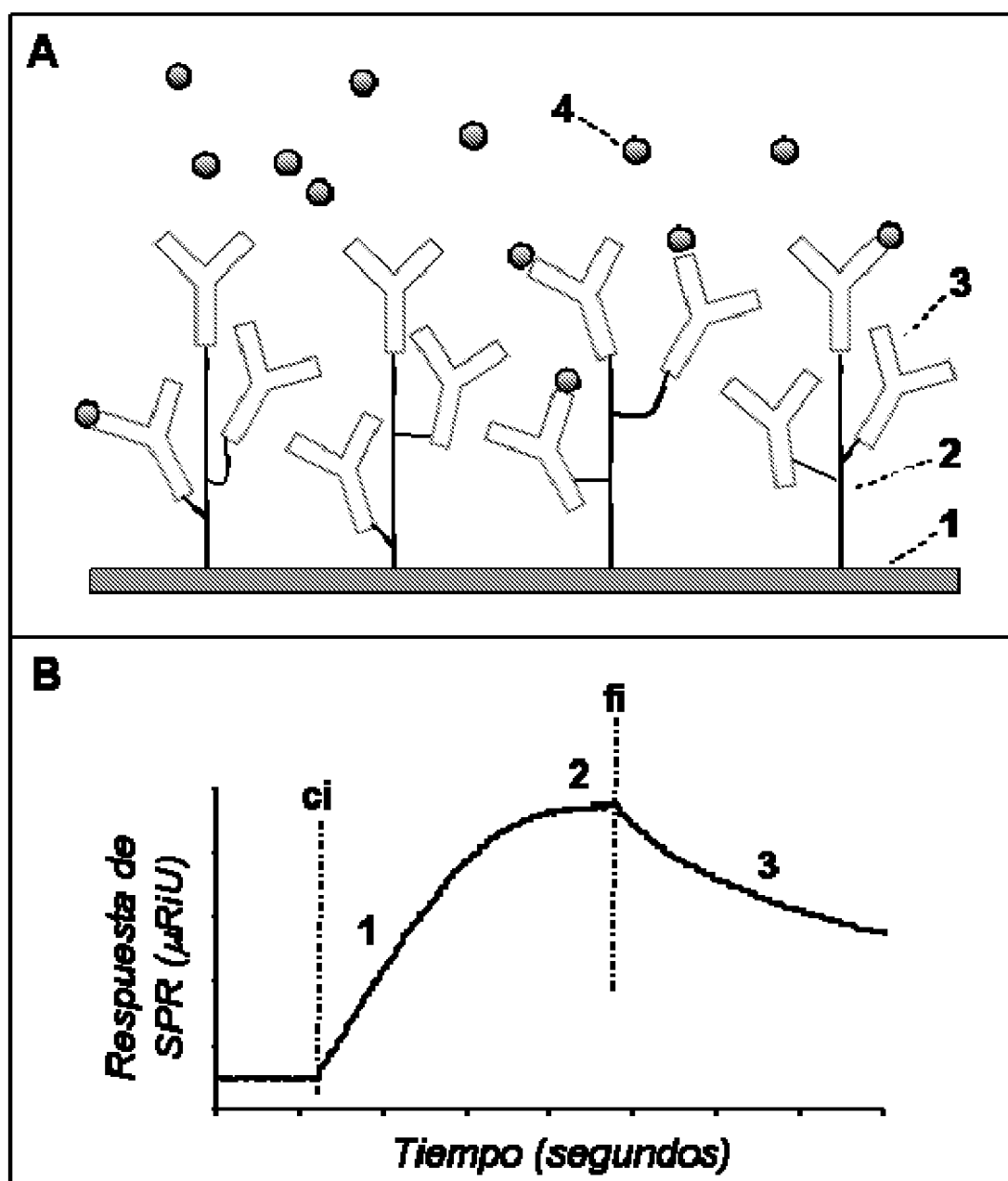
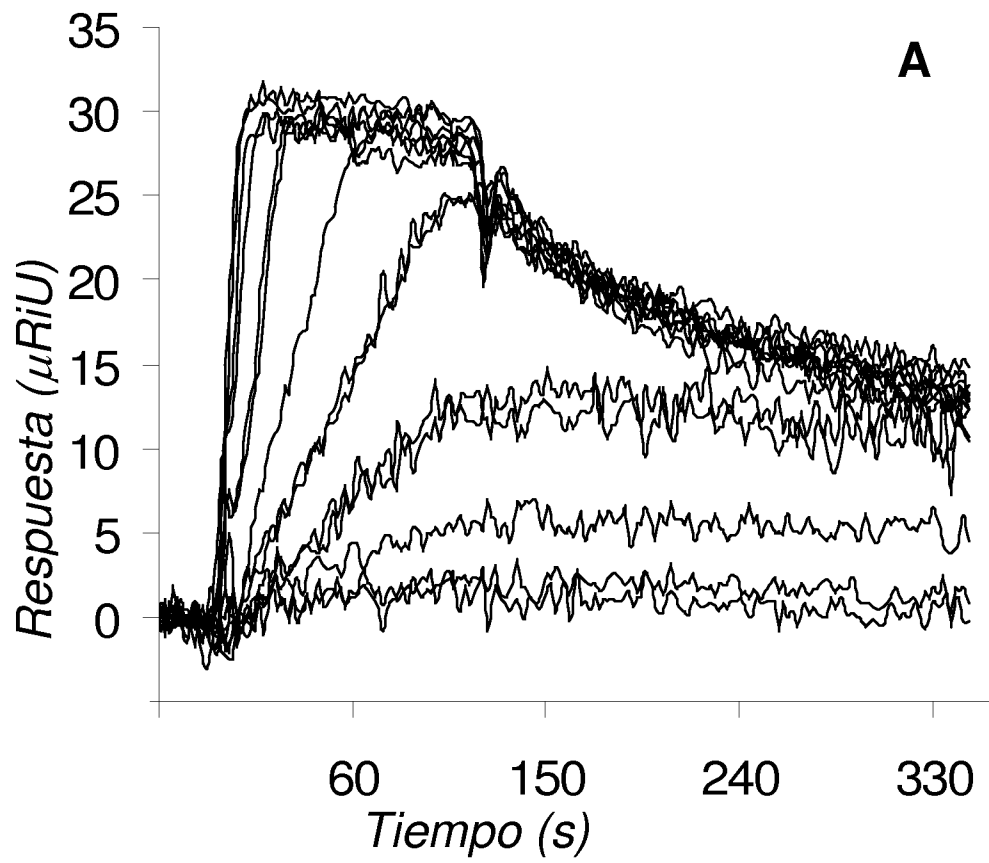
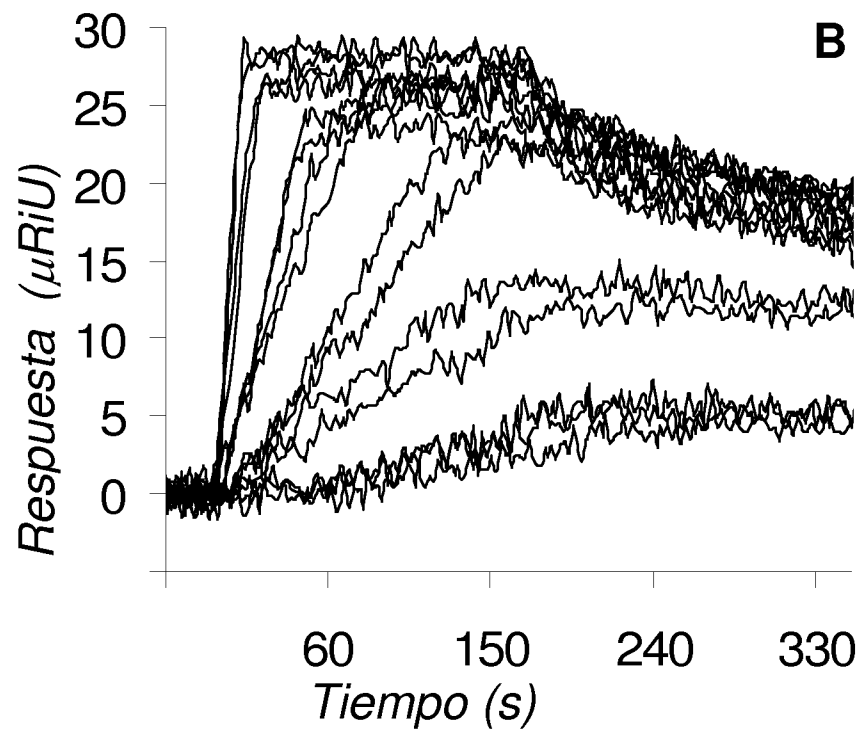


Figura 1

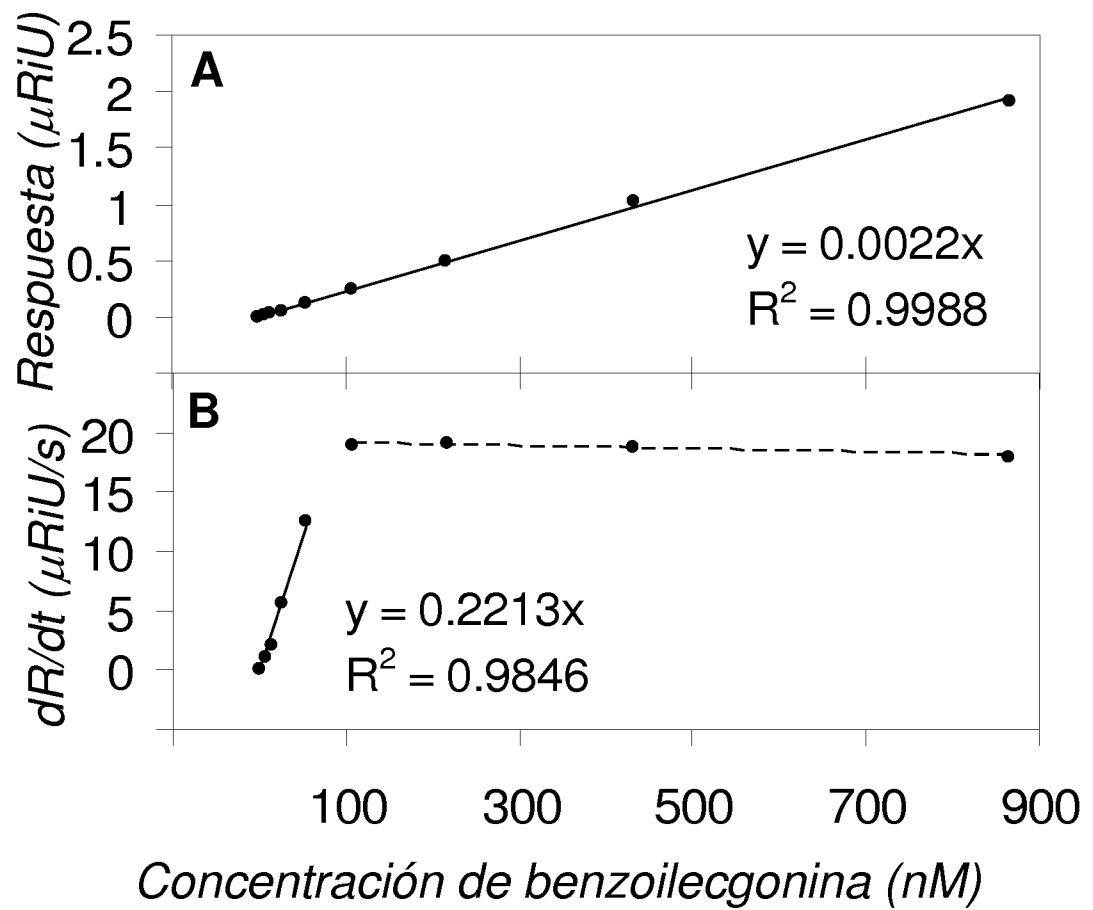
2 / 6

**Figura 2A**

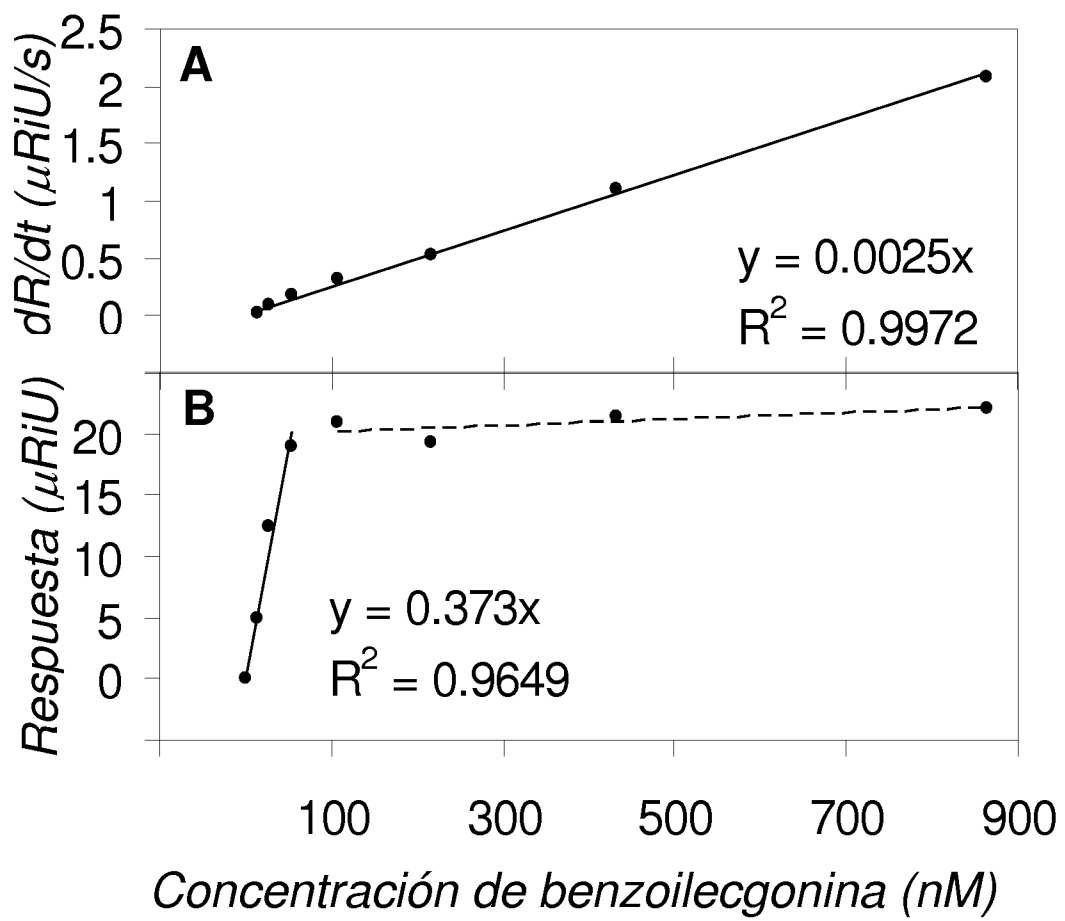
3 / 6

**Figura 2B**

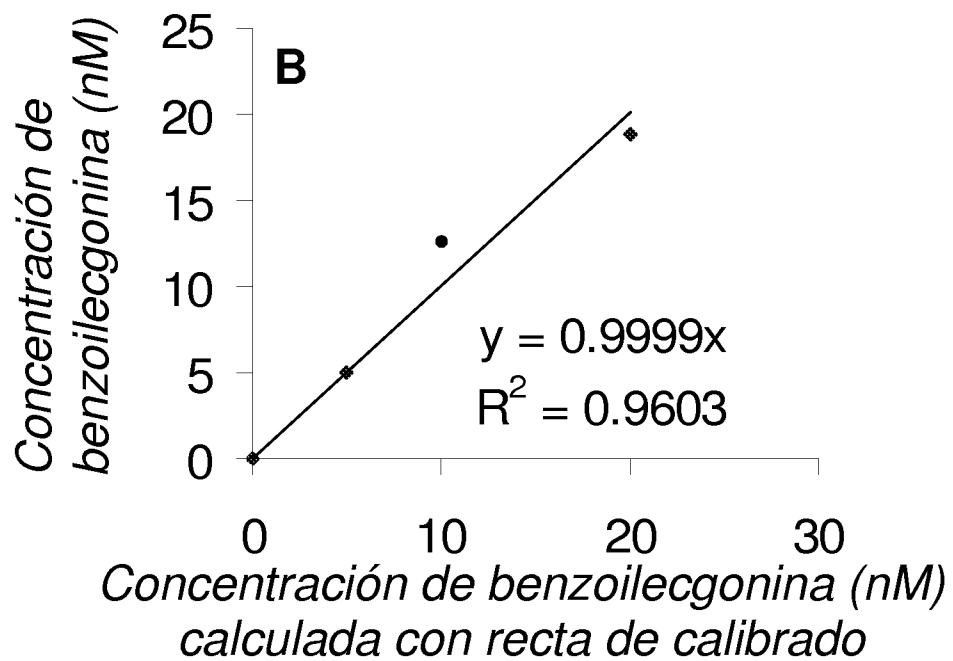
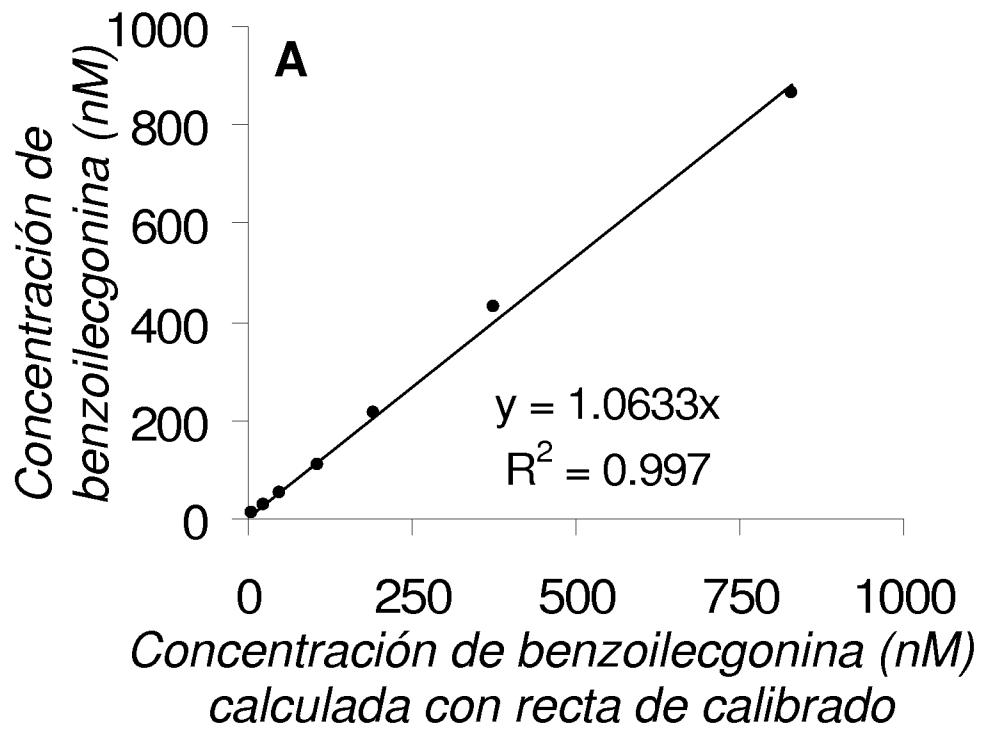
4 / 6

**Figura 3**

5 / 6

**Figura 4**

6 / 6

**Figura 5**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/070893

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/543 (2006.01)

G01N21/17 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, NPL,XPESP,EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GUARDADO-CALVO, P., MUÑOZ, E.M., LLAMAS-SAIZ, L. et al. Crystallographic Structure of Porcine Adenovirus Type 4 Fiber Head and Galectin Domains. Journal of Virology. October 2010. Vol 84, N° 20, pages 10558-10568. ISSN 1098-5514, Specially "Materials and Methods" and pages 10565-10566.	1-18
Y	SANLES-SOBRIDO, M., RODRIGUEZ-LORENZO, L., LORENZO-ABALDE, S. et al. Label-free SERS detection of relevant bioanalytes on silver-coated carbon nanotubes: The case of cocaine. Nanoscale. 13 .08. 2009. Vol 1, N° 1 pages 153-158. ISSN 2040-3372, specially pages 156 and 157.	1-18
A	US2005/0158850 A1 (TOSHIAKI,K., TOSHIHIDE, E.) 21.07.2005	1-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29/02/2012

Date of mailing of the international search report
(10/04/2012)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
A. Barrios de la Fuente

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3496868

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2011/070893

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US2003/0113939 A1 (GAUGLITZ, G., BRECHT, A., PIEHLER, J.) 19.06.2003	1-18
A	JOHNSON, B., LÖFAS, S., LINDQUIST, G. Immobilization of Proteins to a Carboxymethyl-dextran-Modified Gold surface for Biospecific Interaction Analysis in Surface Plasmon Resonance Sensors. Analytical Biochemistry. 1.11.1991, Vol 198, N° 2., pages 268- 277. ISSN 0003-2697, the whole document.	1-18
A	JP2005189062 (FUJI FOTO FILM CO LTD). 14.07.2005, (abstract) DataBase WPI Thomson Scientific, London [on line] Retrieved of: EPOQUE. Accession Number 2005-525097 [54].	1-18
A	SPR sensor chips and disc. Xantec bioanalytics. [on line]. 14.09.2007. [retrieved the 30.06.2007]. Retrieved from internet: URL< http://web.archive.org/web/20070914202516/http://www.xantec.com/new/index.php?content=7&sub=8&haupt=6 , the whole document	1-7
A	MULLETT, W.M., LAI, E.P.C., YEUNG, J.M. Surface Plasmon Resonance-Based Immunoassays. Methods . September 2000. Vol 22, N° 1, pages 77-91. ISSN, the whole document	1-18
A	Indyk, H. E. Optical Biosensors: Making sense of interactions. Chemistry in New Zealand. July 2006. Pages 42-46.	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2011/070893

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US2005158850 A	21.07.2005	JP2005189061 A US7501289 B JP2005283142 A JP4484562B2 B JP2005283143 A JP2005315588 A JP4418705B2 B	14.07.2005 10.03.2009 13.10.2005 16.06.2010 13.10.2005 10.11.2005 24.02.2010
----- US2003113939 A	----- 19.06.2003	----- WO9953317 A DE19816604 A EP1071951 AB EP19990916917	----- 21.10.1999 09.12.1999 31.01.2001 13.04.1999
----- JP2005189062 A -----	----- 14.07.2005 -----	----- NONE -----	----- ----- -----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2011/070893

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N33/543 (2006.01)

G01N21/17 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

G01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, NPL,XPESP,EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
Y	GUARDADO-CALVO, P., MUÑOZ, E.M., LLAMAS-SAIZ, L. et al. Crystallographic Structure of Porcine Adenovirus Type 4 Fiber Head and Galectin Domains. Journal of Virology. Octubre 2010. Vol 84, Nº 20, páginas 10558-10568. ISSN 1098-5514, en especial "Materials and Methods" y páginas10565-10566.	1-18
Y	SANLES-SOBRIDO, M., RODRIGUEZ-LORENZO, L., LORENZO-ABALDE, S. et al. Label-free SERS detection of relevant bioanalytes on silver-coated carbon nanotubes: The case of cocaine. Nanoscale. 13 .08. 2009. Vol 1, Nº 1 páginas 153-158. ISSN 2040-3372, en especial páginas 156 y 157.	1-18
A	US2005/0158850 A1 (TOSHIAKI,K., TOSHIHIDE, E.) 21.07.2005	1-18

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
29/02/2012

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
10 de abril de 2012 (10/04/2012)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
A. Barrios de la Fuente
Nº de teléfono 91 3496868

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2011/070893

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	US2003/0113939 A1 (GAUGLITZ, G., BRECHT, A., PIEHLER, J.) 19.06.2003	1-18
A	JOHNSON, B., LÖFAS, S., LINDQUIST, G. Immobilization of Proteins to a Carboxymethyl-dextran-Modified Gold surface for Biospecific Interaction Analysis in Surface Plasmon Resonance Sensors. Analytical Biochemistry. 1.11.1991, Vol 198, Nº 2, páginas 268- 277. ISSN 0003-2697, todo el documento.	1-18
A	JP2005189062 (FUJI FOTO FILM CO LTD). 14.07.2005, (resumen) Base de datos WPI Thomson Scientific, Londres [en línea] Recuperado de: EPOQUE. Nº de acceso 2005-525097 [54].	1-18
A	SPR sensor chips and disc. Xantec bioanalytics. [en línea]. 14.09.2007. [recuperado el 30.06.2007]. Recuperado de internet: URL< http://web.archive.org/web/20070914202516/http://www.xantec.com/new/index.php?content=7&sub=8&haupt=6 , todo el documento	1-7
A	MULLETT, W.M., LAI, E.P.C., YEUNG, J.M. Surface Plasmon Resonance-Based Immunoassays. Methods . Septiembre 2000. Vol 22, Nº 1, páginas 77-91. ISSN, todo el documento	1-18
A	Indyk, H. E. Optical Biosensors: Making sense of interactions. Chemistry in New Zealand. Julio 2006. Páginas 42-46.	1-18

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2011/070893

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US2005158850 A	21.07.2005	JP2005189061 A US7501289 B JP2005283142 A JP4484562B2 B JP2005283143 A JP2005315588 A JP4418705B2 B	14.07.2005 10.03.2009 13.10.2005 16.06.2010 13.10.2005 10.11.2005 24.02.2010
----- US2003113939 A	----- 19.06.2003	----- WO9953317 A DE19816604 A EP1071951 AB EP19990916917	----- 21.10.1999 09.12.1999 31.01.2001 13.04.1999
----- JP2005189062 A	----- 14.07.2005	----- NINGUNO	-----
-----	-----	-----	-----