



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 301 296**

② Número de solicitud: 200502269

⑤ Int. Cl.:
G01N 33/552 (2006.01)
G01N 33/553 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **16.09.2005**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2008**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.06.2008

⑦ Solicitante/s:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial**

⑦ Inventor/es: **Fernández López, Víctor Manuel;
Martín Gago, José Ángel;
Pita Martínez, Marcos;
Serna Pereda, José Carlos;
Vaz Domínguez, Cristina;
Briones Llorente, Carlos y
Mateo Martí, Eva**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Nanopartícula biosensora, procedimiento de elaboración y sus aplicaciones.**

⑦ Resumen:

Nanopartícula biosensora, procedimiento de elaboración y sus aplicaciones.

La invención se refiere al campo de los biosensores, en concreto a nanopartículas biosensoras compuestas por un núcleo magnético, una capa de sílice, una o varias capas externas metálicas que puedan ser de distinta naturaleza y depositadas con distinta alternancia e inmovilizadas en su superficie externa, así como una capa de moléculas biosensoras orgánicas o inorgánicas, sintéticas o de origen natural con capacidad de unirse a biomoléculas. La invención también describe el procedimiento de obtención de las nanopartículas biosensoras así como las diversas aplicaciones de éstas.

ES 2 301 296 A1

DESCRIPCIÓN

Nanopartícula biosensora, procedimiento de elaboración y sus aplicaciones.

5 Sector de la técnica

La presente invención se refiere al campo de los biosensores, en concreto a la utilización de sondas de ácidos nucleicos peptídicos (PNAs) inmovilizadas sobre nanopartículas para la detección de la hibridación de ácidos nucleicos naturales (DNA o RNA) de secuencias específicas. En particular, las nanopartículas están compuestas de un núcleo magnético y una capa externa de carácter metálico, sobre la que se inmovilizan las sondas pertinentes con secuencias de bases complementarias a la diana objeto de identificación y detección. Se aprovechan las propiedades magnéticas, eléctricas y ópticas de las nanopartículas para mejorar el método, centrándose en la diferencia de señal magnética, óptica o eléctrica que se obtiene de dichas nanopartículas antes y después de la modificación que supone un ensayo de hibridación positivo. El tipo de ensayos al que se refiere la presente invención pueden ser también llevado a cabo espectroscópicamente sobre superficies metálicas macroscópicas.

Antecedentes de la invención

Desde que en 1953 Watson y Crick publicaran la estructura en doble hélice del DNA, y con ello quedara inaugurada la era de la biología molecular (Watson y Crick, 1953), los avances de la ciencia en materia de genética, genómica y biotecnología han sido espectaculares. Una de las aplicaciones analíticas más extendidas del DNA consiste en la detección de otras moléculas de DNA o RNA con secuencias complementarias concretas, dada la especificidad de unión existente entre nucleótidos a través de sus bases nucleotídicas, lo que se conoce como regla de paridad de Watson-Crick: adenina (A) con timina (T), y guanina (G) con citosina (C). Así, una determinada secuencia formada por un cierto número de nucleótidos llega a ser única dentro del genoma de una o más especies, y de esta forma dicha secuencia es utilizable para detectar y caracterizar la presencia del organismo que la posee. Dado el desarrollo tecnológico actual, es incluso posible detectar la presencia de un organismo, cepa o variante que difiere tan sólo en un nucleótido respecto de otras variantes, lo que permite por ejemplo diferenciar entre dos mutantes de un mismo microorganismo.

En el ámbito de la biotecnología ha supuesto un avance importante el desarrollo de la tecnología de microarrays, también llamados chips o microchips (Southern y col., 1994; revisiones en *Nature Genetics* 21, suplemento, 1999; Harris, 2005), según la cual miles de sondas moleculares, principalmente ácidos nucleicos o proteínas, se pueden fijar covalentemente a un soporte sólido (vidrio, nitrocelulosa, nylon etc.) Mediante microarrays de DNA se pueden realizar experimentos de expresión génica, estudios de polimorfismos de nucleótidos (SNPs), miniselección y tipado de microorganismos. Esta técnica explota la metodología experimental desarrollada por E. Southern (Southern, 1975), según la cual los ácidos nucleicos (tanto cadenas largas como oligonucleótidos cortos) se pueden fijar a un soporte sólido y formar híbridos estables con sus complementarios marcados radiactiva o fluorescentemente. La estabilidad de los híbridos viene determinada por el grado de complementariedad de la secuencia de nucleótidos y por factores externos tales como la fuerza iónica del medio, el pH o la temperatura. (Parinov y col., 1996; Hacia, 1999; Relógio *et al.*, 2002).

En biotecnología también ha resultado relevante el uso de moléculas análogas de los ácidos nucleicos naturales para diversas aplicaciones. Dentro de dichas moléculas, es particularmente interesante el caso de los ácidos nucleicos peptídicos ("Peptide Nucleic Acids", abreviados como PNA) descritos por vez primera por Nielsen y colaboradores en 1991 (Nielsen y col., 1991). El PNA consiste en un polímero cuyo esqueleto es de naturaleza peptídica, a diferencia del esqueleto de azúcares y fosfatos característico de los ácidos nucleicos naturales (DNA y RNA). El esqueleto del PNA está formado por unidades de N-(2-aminoetil)glicina unidas por enlaces peptídicos, es acicual, eléctricamente neutro y carece de átomos de fósforo (Egholm y col., 1992; Egholm y col., 1993). Al esqueleto del PNA están unidas, mediante enlaces metilencarbonilo, las bases nucleotídicas púricas (A y G) y pirimidínicas (C y T), en una conformación tal que puedan interaccionar exactamente con las bases nucleotídicas de los ácidos nucleicos naturales.

El PNA se caracteriza por su capacidad para hibridarse de manera estable y específica con DNA complementario, de acuerdo con las reglas de paridad de bases de Watson-Crick (Egholm y col., 1993). De hecho, los PNAs de cadena sencilla (ssPNA) presentan mayor afinidad por el ssDNA complementario que el propio ssDNA de secuencia igual a la del PNA. Esto se debe principalmente al carácter eléctricamente neutro del PNA, que evita fenómenos de repulsión entre cadenas presentes en la interacción DNA-DNA (Nielsen y col., 1991; Wittung y col., 1994). La alta afinidad del PNA por el DNA permite incluso la hibridación de ssPNA a DNA de cadena doble (dsDNA) mediante un proceso denominado "invasión de hebra" (Demidov y col., 1995; Nielsen, 2001; Demidov y col., 2002) y permite usar sondas de PNA para inducir recombinación y/o bloqueo específico de genes concretos (Rogers y col., 2002). Además, la interacción del PNA al DNA es muy específica, y prácticamente para todos los pares de bases que pueden formarse, la diferencia en estabilidad térmica entre el apareamiento correcto y el incorrecto es mayor en un dúplex PNA-DNA que en el dúplex DNA-DNA (Egholm y col., 1993). Por tanto, la diferencia de temperatura entre aquélla a la que se produce un apareamiento completo y aquélla en la que una de las bases está desapareada es mayor en el caso PNA-DNA que en el DNA-DNA. Con ello, un biosensor basado en sondas inmovilizadas de PNA será potencialmente más eficiente que otro basado en DNA para la detección de mutaciones y SNPs en una molécula de ácido nucleico diana.

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 DNA o RNA. (Nielsen, 1999). Finalmente, la insensibilidad del PNA a las variaciones de pH o de fuerza iónica hacen que posea también mucha mayor estabilidad química y ofrezca mayores posibilidades experimentales para su hibridación a distintas moléculas en diferentes composiciones del medio (Egholm y col., 1993; Kambhampati y col., 2001). Por todo ello, es evidente el interés que posee aprovechar las peculiaridades físico-químicas del PNA para su uso en sistemas de detección y cuantificación de ácidos nucleicos naturales.

Algunos de los cambios físico-químicos asociados a la hibridación PNA/DNA o PNA/RNA son obvios. Uno de ellos es el aumento de masa que conlleva este apareamiento; a este respecto se han desarrollado biosensores de PNA/DNA(RNA) que utilizan la microbalanza de cristal de cuarzo como instrumento muy sensible para la detección de los pequeños cambios de masa que tienen lugar tras la hibridación entre secuencias complementarias (Wang y col., 1997) o bien la espectrometría de masas en la modalidad MALDI-TOF (Griffin y col., 1997; Arlinghaus y col., 2003; Brandt y col., 2003).

Además, se han desarrollado otros sistemas de detección de la hibridación entre una sonda de PNA y la diana de DNA que basan la detección de la hibridación en la aparición de una señal de fósforo, puesto que este elemento no está presente en la cadena de PNA pero sí forma parte del esqueleto de las cadenas del DNA (o RNA) diana. Esta posibilidad se ha puesto de manifiesto Arlinghaus y colaboradores con la técnica SIRIMP (*Sputter-Initiated Resonance Ionization Microprobe Phosphorous Image*) (Arlinghaus y col., 1997). Resultados análogos han sido obtenidos por parte de los inventores de la presente invención utilizando la técnica de Espectroscopia de Fotoemisión de Rayos X (XPS) en sondas de PNA inmovilizadas sobre placas planas con una superficie de oro, antes y después de la hibridación a dianas de DNA complementarias. Mediante XPS se ha observado que con la hibridación (y tras el correspondiente lavado en condiciones controladas para evitar la unión inespecífica de la diana) se produce un incremento de entre 2 y 4 veces en la señal de nitrógeno (pico de fotoemisión correspondiente al N1s, normalizado al pico Au4f del sustrato), y la aparición de una señal de fósforo (pico P2p normalizado a Au4f) que no existía en el PNA (Briones y col., 2004; Briones y col., 2005).

La realización de muchos de estos ensayos en fase homogénea presenta numerosas dificultades debido a lo extremadamente diluidas que habitualmente están las moléculas diana de DNA o RNA en las muestras naturales, por lo que suele realizarse la reacción de hibridación sobre superficies en las que se ha inmovilizado previamente la molécula sonda de PNA. Esto representa una limitación del ensayo ya que la cantidad de sonda se limita a una capa de moléculas de PNA sobre la superficie en cuestión, con la que forzosamente debe ponerse en contacto la muestra a analizar para dar una señal positiva. Con ello, la sensibilidad y el límite de detección de estas técnicas es también limitado.

Llegados a este punto, el uso de nanopartículas, y en particular nanopartículas magnéticas, supone un salto muy significativo, ya que una pequeña cantidad de nanopartículas magnéticas puede ser resuspendida en grandes volúmenes de muestra y ser recuperada posteriormente mediante la aplicación de un campo magnético externo. Así, es posible purificar y/o pre-concentrar cantidades muy minoritarias y diluidas del DNA diana que específicamente se hibrida con el PNA inmovilizado sobre las nanopartículas, con lo que se reduce el límite de detección en gran medida. Este tipo de sistemas permite determinar la presencia de secuencias de DNA concretas de interés en situaciones donde una detección precoz de la misma puede ser crítica, por ejemplo para evitar los efectos perjudiciales que tuviera la existencia de las especies o cepas de organismos que poseen dichas secuencias características. Este hecho posee gran aplicación en biomedicina humana y veterinaria, entre otros en los siguientes aspectos: i) detección de patógenos de tipo viral, bacteriano, fúngico o protozoario; ii) caracterización de mutaciones o polimorfismos genéticos (SNPs) en dichos agentes que pueden hacerlos resistentes a fármacos o facilitar su escape al sistema inmune o a vacunas; iii) caracterización de mutaciones o SNPs en genes humanos o animales, relacionados con enfermedades o con propensión a ellas; iv) detección de marcadores tumorales concretos. Asimismo, este potencial de detección presenta importantes aplicaciones en alimentación y control medioambiental, en aspectos que incluyen los siguientes: i) detección de microorganismos concretos, patógenos o contaminantes; ii) detección de la presencia de organismos manipulados genéticamente (OMG) o transgénicos, pudiendo cuantificarse si su presencia está por encima de los límites permitidos. En todos estos casos se puede conseguir analizar un volumen importante de muestra usando apenas unos microgramos de nanopartículas en suspensión, que posteriormente son concentrados mediante un campo magnético externo. Con ello, es posible aumentar en varios órdenes de magnitud la sensibilidad de la detección.

De particular interés para las aplicaciones analíticas que se contemplan en esta patente de invención son los ferrofluidos, que son suspensiones estables de nanopartículas ferro ó ferrimagnéticas, con una estrecha distribución de tamaños de partícula. Este tipo de nanopartículas se obtenían, en un principio, mediante el molido mecánico de muestras de óxidos de hierro con propiedades magnéticas. Sin embargo este método, además de ser costoso y lento, produce una elevada distribución de tamaño en las partículas obtenidas. La alternativa surgió con los métodos de co-precipitación, en los que se utilizan sales disueltas con los iones apropiados (por ejemplo, Fe^{2+} y Fe^{3+} en relación 1:2) y se llevan a unas condiciones en las que dicha disolución se vuelva inestable y precipite el sólido deseado (en el mismo ejemplo, la precipitación se consigue llevando la disolución a NaOH 1 M a ebullición). Estos métodos producen unas nanopartículas suficientemente pequeñas como para presentar superparamagnetismo. Este fenómeno supone que en una partícula, debido a su minúsculo tamaño, sólo hay un dominio magnético permanente, pero que tiene capacidad de rotar. Consecuentemente, en un ferrofluido cada nanopartícula tiene su momento magnético orientado al azar y se anulan unos a otros, de modo que en ausencia de un campo externo el fluido se comporta como si no se tratase de un sólido magnético. Al someterse a un campo magnético todas estas nanopartículas, bien por rotación en el seno de la

ES 2 301 296 A1

disolución o bien por orientación de su campo magnético, se orientan según el campo externo. Ello produce una fuerte atracción partícula-partícula que se transmite por todo el fluido. Aunque obviamente es interesante la posibilidad de que las partículas sean concentradas a través de la aplicación de un campo magnético externo, no es deseable que las interacciones magnéticas sean tan fuertes como para promover una orientación colectiva, y una posible agregación y coagulación.

Por tanto, para obtener un ferrofluido estable bajo un campo magnético moderadamente fuerte, esto es, que la fuerza de atracción entre partículas sea menor que la energía térmica asociada a las partículas, éstas deben ser muy pequeñas. Para que aparezca el monodominio magnético propio del superparamagnetismo, el límite superior del tamaño de partícula admitido a temperatura ambiente es de unos 3 nm para hierro, y unos 10 nm para Fe_3O_4 (magnetita) y para su forma oxidada $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemita). En el caso de CoFe_2O_4 (ferrita de cobalto), el tamaño de partícula puede llegar hasta 20 nm. Por encima de estos límites, partículas demasiado grandes pueden actuar como núcleos de agregación y crecer desestabilizando la suspensión. De esta forma, queda patente que es necesario un tamaño de partícula pequeño y una distribución estrecha de tamaños dentro de la población de partículas. Con estas características, los ferrofluidos estarán constituidos por fases estables de materiales que pueden ser desplazados o controlados por gradientes magnéticos. Los tres óxidos mencionados, si son sintetizados en un tamaño adecuado y coherente, presentan una alta aplicabilidad para estos fines.

El principal método directo de obtención de nanopartículas magnéticas de magnetita en disolución, con una estrecha distribución de tamaño, es a partir de sales de hierro (Massart, 1981). También se pueden sintetizar nanopartículas magnéticas mediante métodos de vapor como la pirólisis vía láser (Veintenillas y col., 1998), que da lugar a partículas muy dispersas y de muy pequeña saturación magnética, o el método de la llama (Urakawa y col., 1996) que origina partículas polidispersas. También se ha utilizado una red de sílice para obtener nanopartículas magnéticas, pero la distribución de tamaño resulta demasiado amplia (del Monte y col., 1997).

En la actualidad se conocen varios métodos de síntesis para obtener nanopartículas esféricas de magnetita en disolución. Según uno de dichos sistemas, una suspensión de hidróxido férrico es parcialmente oxidada con diferentes agentes oxidantes. Se han obtenido partículas esféricas de magnetita de una estrecha distribución de tamaños para rangos seleccionados entre los límites 30 a 1100 nm, mezclando FeSO_4 con KOH en presencia de ión nitrato y llevando el gel resultante a 90°C durante varias horas (Sugimoto y Matijevic, 1980). Sin embargo la aplicación de éste método es limitada, ya que las nanopartículas de magnetita con diámetros superiores a 30 nm ya no son super-paramagnéticas.

No obstante, como se ha indicado el método principal para obtener nanopartículas esféricas es el de Massart, que consiste en el envejecimiento de una mezcla de disoluciones de hidróxido ferroso y férrico en medio acuoso (Massart y Cabuil, 1987). Con una estequiometría de $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+} = 0.5$ se forman partículas muy homogéneas en tamaño y composición química. Además, se ha observado que, ajustando el pH y la fuerza iónica del medio de precipitación, se puede controlar el tamaño medio de las partículas en un orden de magnitud dentro del rango de los nanómetros (entre 1.6 y 12.5 nm) (Jolivet y col., 1983), de modo que el tamaño de partícula decrece conforme aumenta el pH y la fuerza iónica. Ambos factores determinan el cambio isostático de la superficie de las partículas y en consecuencia la composición química de la superficie.

En una de las descripciones de preparación de este material, las partículas esféricas de magnetita entre 8 y 14 nm se obtuvieron variando la naturaleza de la base usada en la precipitación (NH_4OH , NaOH o KOH) y la temperatura. Para la precipitación de estas partículas se añadieron 50 mL de una disolución acuosa 0.33 M de FeCl_2 y 0.66 M de FeCl_3 a 450 mL de solución básica 1 M bajo fuerte agitación. Un flujo de N_2 gas se pasó previamente a través de la solución básica para asegurar que el precipitado final estuviera constituido solamente por magnetita. Las partículas más pequeñas se obtuvieron añadiendo a la mezcla de sales de hierro una disolución de KOH 1M con un 1% en peso de poli(alcohol vinílico) (PVA) a temperatura ambiente (Lee y col., 1996).

Para sintetizar nanopartículas de CoFe_2O_4 se sigue un método similar al método de Massart, en el que se cambia el Fe^{2+} por Co^{2+} y alguna otra de las condiciones experimentales, como la temperatura de adición de reactivos al medio básico. El proceso es análogo al de la magnetita ya mencionado previamente (Wagner y col., 2002).

Las partículas magnéticas de tamaño adecuado sintetizadas por los métodos anteriores, tienen un punto isoeléctrico cercano a 7 para la magnetita, y de 9 en el caso de la ferrita de cobalto, lo que las hace muy inestables en disolución acuosa a pHs neutros; a valores de $\text{pH} \pm 2$ unidades del punto isoeléctrico se nota ya cierta agregación, y a valores ± 1.5 unidades de pH precipitan. Por este motivo es necesario recubrirlas de un compuesto que estabilice la suspensión en agua a valores de pH cercanos a la neutralidad. Este recubrimiento puede ser de diversa índole: polímeros, sustancias orgánicas, o bien diferentes metales u óxidos. En el caso de recubrir las partículas con una capa de sílice se consigue una gran estabilidad frente a la agregación, reduciéndose en gran medida las atracciones magnéticas e interacciones de Van de Waals que se producen entre dichas nanopartículas. Además, se proporciona una alta resistencia frente a los tratamientos térmicos (Tartaj y col., 2001). Un problema que conlleva el recubrimiento con sílice es la baja resistencia mecánica que presenta dicha capa dentro de un tanque de agitación. Por otra parte, este recubrimiento de sílice podría producirse no sobre nanopartículas individuales sino sobre agregados de unas cinco nanopartículas (Philippe y col., 1994). Por el contrario, la presencia de dicha capa de sílice ofrece varias ventajas además de su estabilización a pH neutro, como por ejemplo la posibilidad de modificar su superficie añadiendo grupos funcionales existentes en moléculas de unión tipo silano. Estas moléculas tienen un grupo trialcóxisilano en uno de sus extremos, y del enlace

libre del silicio sale una cadena corta con el grupo funcional pertinente (amino, mercapto, hidróxido, epóxido, etc) en el extremo de la cadena. De esta forma, en lugar de tener las nanopartículas en capa cerrada de sílice se pueden modificar químicamente para crear la superficie funcionalizada deseada.

5 Así, una modificación con una capa de oro externa se ha llevado a cabo sobre nanopartículas de sílice (Oldenburg y col., 1998). Para ello se silaniza la superficie de sílice con γ -aminopropiltriétoxosilano, de modo que en la superficie se incorporan multitud de grupos amino. Sobre estos grupos se inmovilizan nanopartículas de oro previamente sintetizadas y se hace una etapa posterior de crecimiento reduciendo iones de oro (III) hasta que se desee, cerrándose la capa de oro sobre la sílice.

10 Esta capa externa metálica (preferiblemente oro o plata) añade muchas otras propiedades a las nanopartículas magnéticas recubiertas de sílice entre las que merece destacar en relación con la presente invención el de proporcionar una propiedad óptica singular: el fenómeno del plasmón superficial.

15 Sin embargo, no se conocen nanopartículas que reúnan todas las propiedades anteriormente descritas y la viabilidad de su uso como soporte para la detección de hibridación entre moléculas orgánicas complementarias y su aplicación en el desarrollo de nuevas herramientas o plataformas tecnológicas en nano-biotecnología.

Breve descripción de la invención

20 Un primer aspecto de la invención se refiere a una nanopartícula biosensora que comprende: una nanopartícula magnética, una capa de sílice, una capa o varias capas externas metálicas que pueden ser de distinta naturaleza y depositadas con distinta alternancia e inmovilizada en su superficie externa, y una capa de moléculas biosensoras orgánicas o inorgánicas, sintéticas o de origen natural con capacidad de unirse a biomoléculas. Preferentemente la nanopartícula biosensora de la invención comprende una nanopartícula magnética de un espesor entre 4-30 nm de diámetro, una capa de sílice de un espesor entre 1-20 nm, una capa metálica de un espesor entre 1-200 nm y una capa de moléculas biosensoras orgánicas o inorgánicas, sintéticas o de origen natural con capacidad de unirse a biomoléculas.

30 Un segundo aspecto de la invención se refiere al procedimiento de obtención de la nanopartícula biosensora de la invención comprendiendo las etapas de preparación de un coloide de partículas magnéticas de entre 4-20 nm de tamaño; condicionamiento del coloide para que sea estable a pHs básicos (mayores de pH=7); recubrimiento de las nanopartículas coloidales en medio básico con una capa de sílice de un espesor entre 1-20 nm; funcionalización química de la superficie de las nanopartículas magnéticas recubiertas de sílice de la etapa anterior con una capa metálica y la inmovilización de la molécula biosensora sobre la superficie de la nanopartícula resultante.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a las diversas aplicaciones de las nanopartículas biosensoras de la presente invención.

40 Un cuarto aspecto de la invención se refiere a métodos para la determinación de la hibridación o unión de una molécula biológica a la molécula biosensora orgánica o inorgánica inmovilizada a una nanopartícula biosensora de la invención. Preferentemente dichos métodos son pero no se limitan a: métodos de detección espectroscópica utilizando radiación ultravioleta, visible o infrarroja, o espectroscopia Raman, o XPS, o bien métodos de detección electroquímicos.

45 Otros aspectos de la presente invención resultarán evidentes para un experto en la materia a la vista de la descripción de la invención.

Descripción de las figuras

50 Figura 1.- Esquema de la nanopartícula biosensora, indicando sus diferentes capas.

Figura 2.- Imagen de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) de nanopartículas de ferrita de cobalto/sílice/oro. La imagen posee 120.000 aumentos y la barra blanca representa 50 nm.

55 Figura 3.- Espectros de transmisión en la zona del infrarrojo de nanopartículas magnéticas con capa externa de oro sobre cuya superficie se ha quimisorbido una capa de PNA tiolado de secuencia conocida ("P-G", ver Ejemplo 1), y la misma preparación tras ser incubada en presencia de una molécula complementaria de DNA ("DNA-G", ver Ejemplo 2) y lavada para eliminar las posibles hibridaciones inespecíficas.

60 Figura 4.- Espectros de transmisión en la zona del infrarrojo de nanopartículas magnéticas con capa externa de oro-plata-oro sobre cuya superficie se ha quimisorbido una capa de PNA tiolado de secuencia conocida "P-G" (ver Ejemplo 1). En el espectro superior, esas nanopartículas han sido incubadas con el DNA complementario "DNA MG", que resiste el ciclo de lavado y se mantiene hibridado, mostrando sus bandas características en el IR. En el espectro inferior, las nanopartículas se han incubado con un DNA no específico "DNA L", que no hibrida al PNA y por tanto es eliminado por completo en el ciclo de lavado; de esta forma, las bandas de IR observadas al final del proceso son únicamente las características del PNA (ver Ejemplo 2).

Figura 5.- Voltametrías cíclicas de electrodos de oro (discos de 3 mm de diámetro) recubiertos de una monocapa de PNA tiolado, incubados en una disolución de DNA complementario (a las concentraciones indicadas en la figura), lavados y posteriormente incubados en tionina 10^{-6} M, H_2O_2 10^{-3} M y la enzima peroxidasa 0.1 mg/ml.

5 Descripción detallada de la invención

La presente invención se enfrenta al problema de proporcionar nuevas herramientas para la identificación y caracterización de biomoléculas, y más concretamente nuevos biosensores con capacidad de unirse a ácidos nucleicos con elevada sensibilidad y especificidad.

La invención se basa en que los inventores han observado que es posible identificar la hibridación específica producida entre ácidos nucleicos naturales (DNA o RNA) y moléculas análogas a ellos (más concretamente, PNA) cuando estas sondas de PNA están inmovilizadas sobre la superficie metálica de nanopartículas con núcleo magnético.

En la superficie de estas nanopartículas magnéticas recubiertas con una capa metálica se puede inmovilizar, gracias a las propiedades de dichas superficies, cualquier tipo de molécula orgánica o inorgánica, siempre que incluya grupos funcionales con capacidad de aceptar densidad electrónica, como los grupos amino o los grupos tiol (ver Ejemplo 1). Las moléculas inmovilizadas pueden originar o no, disposiciones en forma de monocapas autoensambladas (SAMs) en cuyo caso se obtiene una densidad de empaquetamiento óptima. La formación de SAMs ocurre, por ejemplo, en el caso de la inmovilización de PNAs tiolados sobre superficies de oro.

De esta forma, pueden aprovecharse las nuevas propiedades magnéticas, eléctricas y ópticas -que se encuentran integradas y se complementan entre si- de las nanopartículas con la molécula orgánica o inorgánica inmovilizada sobre su superficie para desarrollar biosensores específicos. En primer lugar, el núcleo magnético permite que dichas partículas puedan ser capturadas por un campo magnético externo y permite la concentración de la muestra analizada cuando ésta se encuentra a bajas concentraciones. En segundo lugar, es posible analizar (ver Ejemplo 2 y 3) la diferencia de señal óptica que producen dichas nanopartículas con una molécula biosensora inmovilizada en su superficie, antes y después de la hibridación de un ácido nucleico complementario presente en una muestra biológica problema.

Además, el metal utilizado como capa externa proporciona una propiedad óptica singular: el fenómeno del plasmón superficial. Este fenómeno consiste en la vibración colectiva de los electrones de la superficie metálica, provocando una banda de absorción situada en el ultravioleta-visible (característica del metal y del tamaño de las nanopartículas) a la longitud de onda en que se da la condición de resonancia en dichos electrones. El fenómeno del plasmón superficial también tiene consecuencias en la región de energías de vibración de enlaces químicos, siendo el causante de los efectos de *Surface Enhancement Raman Spectroscopy* (SERS) (Vo-Dinh, 1998) y *Surface Enhancement InfraRed Absorption* (SEIRA) (Osawa y col., 1991). Estos efectos provocan un aumento considerable en ciertos modos de vibración de las moléculas situadas sobre las superficies metálicas, que en el caso del SERS puede llegar hasta 10^6 veces, mientras que en el SEIRA se puede alcanzar un aumento de 10^2 veces. Estos efectos ópticos de aumento de señal dependen fundamentalmente del material que las provoca (Au, Ag, Cu), del espesor de la capa y de su rugosidad externa, y también del grosor (en el caso de láminas) o del diámetro de la partícula (en el caso de nanopartículas) y pueden ser medidos por técnicas de espectroscopia.

Finalmente, otra de las propiedades que aporta la superficie metálica es su facilidad para servir de soporte de monocapas autoensambladas, especialmente de grupos tiolados sobre superficies de oro (Madoz y col., 1997; Abad y col., 2002; Briones y col., 2004).

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención lo constituye una nanopartícula biosensora que comprende:

- a) una nanopartícula magnética
- b) una capa de sílice
- c) una (o varias) capa(s) externa(s) metálica(s), que pueden ser de diferente naturaleza y depositadas con distinta alternancia, e inmovilizada en su superficie externa
- d) una capa de moléculas biosensoras orgánicas o inorgánicas, sintéticas o de origen natural con capacidad de unirse a biomoléculas.

El término “nanopartícula biosensora” tal como se utiliza en la presente invención se refiere a partículas de un tamaño comprendido entre 5 y 250 nanómetros (nm), preferentemente entre 50 y 100 nm y más preferentemente de 60 nm que además comprenda todas las características descritas anteriormente.

El tamaño de la nanopartícula puede variar en función del espesor de las distintas capas descritas anteriormente que a, título descriptivo, pueden variar como sigue:

- i) partícula magnética entre 4 y 30 nm y
- ii) capa de sílice de un espesor entre 1 y 20 nm y

iii) capa metálica de un espesor controlado entre 1 y 200 nm

De los numerosos óxidos de hierro que existen (Garcell y col., 1998; Solinas y col., 2001) presentan propiedades magnéticas permanentes la maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) y la magnetita (Fe_3O_4). Por otro lado, se puede usar nanopartículas de ferrita de cobalto (CoFe_2O_4), un compuesto con la misma estructura de espinela inversa característica de la magnetita, en la que el cobalto ha sustituido al hierro de estado de oxidación II. Otro ejemplo de material magnético alternativo a los descritos es el hierro-platino (FePt), aunque no es un óxido.

Por lo tanto, tal y como se utiliza en la presente invención el término “nanopartícula magnética” se refiere a un material magnético, oxidado o no, perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención, respectivamente, a uno de los siguientes grupos o a cualquier combinación de éstos:

i) óxido de hierro, como la magnetita (Fe_3O_4) y su forma oxidada maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) o un óxido de hierro-cobalto como la ferrita de cobalto (CoFe_2O_4) o

ii) materiales magnéticos no óxidos como el hierro-platino (FePt);

Tal como se utiliza en la presente invención el término “capa externa metálica” se refiere a metales que inducen el incremento de la señal espectroscópica pertenecientes, a título ilustrativo y sin que se limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: oro (Au), plata (Ag), cobre (Cu), platino (Pt) o una aleación formada por varios o todos estos metales.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “moléculas biosensoras” se refiere a una molécula biológica o a una molécula análoga a una molécula biológica, de naturaleza orgánica o inorgánica, inmovilizada sobre una nanopartícula que actúa como soporte físico, con capacidad para unirse o hibridarse específicamente a otras moléculas biológicas o análogas de ellas de forma que se pueda realizar un seguimiento del proceso de unión. Dichas moléculas biológicas o análogos de moléculas biológicas además incluyen un grupo funcional con capacidad de aceptar densidad electrónica que conlleve su quimisorción o fisorción perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención, a la siguiente lista: grupos amino, grupos tiol, grupos epoxi, grupos disulfuro, di-alquil sulfuros, así como las aminas y alcoholes en platino. Las moléculas que poseen dichos grupos funcionales, tanto en la propia estructura de la molécula como por efecto de la adición sintética de dicho grupo, pueden seleccionarse, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención, de uno de los siguientes conjuntos:

a) biomoléculas naturales: ácidos nucleicos (DNA o RNA) de cadena sencilla o doble, enzimas, anticuerpos, proteínas de membrana, proteínas de choque térmico, chaperoninas, otras proteínas, monosacáridos, polisacáridos, glucoproteínas, ácidos grasos, terpenos, esteroides, otras moléculas de naturaleza lipídica, lipoproteínas, hormonas, vitaminas, metabolitos, hidrocarburos, moléculas naturales con actividad antibiótica o antiviral, o bien agregados macromoleculares compuestos por proteínas y/o ácidos nucleicos u otras combinaciones de las moléculas citadas anteriormente;

b) biomoléculas naturales obtenidas por procedimientos de selección *in vitro*: aptámeros, ribozimas o aptazimas;

c) biomoléculas artificiales: PNAs, otros análogos de ácidos nucleicos naturales, quimeras de ácidos nucleicos naturales y artificiales, polímeros con capacidad de reconocimiento de forma (“molecular imprinted polymers” o MIPs), anticuerpos artificiales, anticuerpos recombinantes, minianticuerpos, o moléculas sintéticas con actividad antibiótica o antiviral.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “hibridación” se refiere a la interacción entre dos hebras complementarias de ácidos nucleicos naturales o sus análogos artificiales, o bien, genéricamente, a la interacción específica entre dos proteínas, un anticuerpo y el antígeno que reconoce, o una proteína de unión y su ligando.

Las nanopartículas de la presente invención también se pueden utilizar en diferentes formatos de biosensores basados en el reconocimiento molecular entre antígeno-anticuerpo, receptor-ligando, enzima-substrato o enzima-inhibidor, en los que el evento de reconocimiento molecular de lugar a cambios en propiedades ópticas y/o eléctricas del sistema que puedan ser detectadas gracias a la composición y estructura de las nanopartículas objeto de esta invención: espectroscopia ultravioleta, visible o infrarroja; espectroscopia Raman y “Surface Enhanced Raman Spectroscopy” (SERS), microscopía Raman; Infrarrojo de transmisión, incluyendo FTIR y microscopía de infrarrojo; “Surface Enhanced InfraRed Absorption” (SEIRA) y “Attenuated Total Reflection Spectroscopy” (ATR); técnicas basadas en rayos X, XPS, NEXAFS, XANES.

Tal y como se utiliza en la presente invención el término “ácido nucleico” se refiere a una secuencia de ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) o ácido nucleico peptídico (PNA), de longitud igual o superior a 2 nucleótidos (DNA o RNA) o 2 bases nucleotídicas unidas a su correspondiente esqueleto (PNA) (abreviado como nt) que puede ser de cadena sencilla o cadena doble.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “ácido nucleico peptídico (PNA)” se refiere a una molécula análoga estructuralmente al DNA en la que el esqueleto estructural es un polímero de naturaleza peptídica formado por polimerización de N-(2-aminoetil)glicina, al cual las bases nucleicas están unidas mediante enlaces metilencarbonilo.

ES 2 301 296 A1

Tal como se utiliza en la presente invención el término “anticuerpos recombinantes” o “minianticuerpos” se refiere a fragmentos derivados de anticuerpos construidos por tecnología de DNA 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 (Fab) donde residen las zonas de unión a antígenos. Los minianticuerpos pueden pertenecer, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: Fab, F(ab')₂, scFv, y anticuerpos recombinantes monodominio. En el marco de la presente invención, se entiende por anticuerpos recombinantes monodominio y/o dominios tipo inmunoglobulina con capacidad de unión y reconocimiento independiente, tanto a los dominios variables de cadena pesada (VH), a los dominios variables de cadena ligera (VL), a los anticuerpos recombinantes de camélidos (VHH), los anticuerpos recombinantes de camélidos humanizados, los anticuerpos recombinantes de otras especies camelizadas, los anticuerpos monodominio IgNAR de peces cartilaginosos; es decir, se incluyen tanto dominios que de forma natural son monodominio (caso de VHH e IgNAR), como anticuerpos que por ingeniería genética se han alterado para que por sí solos sean capaces de interactuar con el antígeno y mejorar sus propiedades de estabilidad y solubilidad.

Una realización particular de la invención lo constituye la nanopartícula biosensora de la invención en que la nanopartícula magnética esté constituida por ferrita de cobalto, la capa de sílice esté funcionalizada con grupos amino y grupos tiol, la capa metálica sea de oro, y la biomolécula inmovilizada sea un PNA modificado en uno de sus extremos, consistiendo dicha modificación en la inserción de un grupo tiol en dicho extremo (ver Ejemplo 1.1).

Otra realización particular de la presente invención lo constituye la nanopartícula biosensora en que la nanopartícula magnética es de ferrita de cobalto, la capa de sílice esté funcionalizada con grupos amino y grupos tiol, y la capa metálica esté formada por una capa de plata y sucesivamente otra de oro, y la biomolécula inmovilizada sea un PNA modificado en uno de sus extremos, consistiendo dicha modificación en la inserción de un grupo tiol en dicho extremo (ver Ejemplo 1.4).

En otro aspecto particular de la invención la nanopartícula biosensora de la invención puede ser másica, es decir, no poseer núcleo magnético ni capa de sílice y estar formada únicamente por un núcleo metálico.

Un segundo aspecto de la presente invención lo constituye el procedimiento de obtención de las nanopartículas biosensoras de la invención, en adelante procedimiento de la invención, que comprende las etapas de:

- a) preparación de un coloide de partículas magnéticas de entre 4 y 30 nm
- b) condicionamiento del coloide para que sea estable a pHs básicos (mayores de pH = 7),
- c) recubrimiento de las nanopartículas coloidales en medio básico con una capa de sílice de un espesor entre 1 y 20 nm,
- d) funcionalización química de la superficie de las nanopartículas obtenidas en la etapa c) para introducir grupos funcionales,
- e) recubrimiento de las nanopartículas magnéticas funcionalizadas de la etapa d) con una capa metálica que comprende las etapas de:
 - e.i) síntesis de nanopartículas de metal estables en agua, con un diámetro de entre 3 y 20 nm
 - e.ii) quimisorción de las nanopartículas de metal sobre las nanopartículas resultantes de la etapa d) anteriormente mencionada.
 - e.iii) crecimiento sobre el producto obtenido en e.ii) de una capa metálica, formando una capa de un espesor controlado entre 1 y 200 nm
- f) inmovilización de la molécula biosensora sobre la superficie de la nanopartícula resultante de la etapa e).

Un aspecto preferido de la presente invención lo constituye el procedimiento de la invención en el que la partícula magnética está constituida, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, por los siguientes grupos de materiales magnéticos, oxidados o no, respectivamente o por cualquier combinación de los mismos:

- i) óxido de hierro, como la magnetita (Fe₃O₄) y su forma oxidada, la maghemita (γ-Fe₂O₃), o un óxido de hierro-cobalto como la ferrita de cobalto (CoFe₂O₄),
- ii) materiales magnéticos no óxidos como el hierro-platino (FePt).

Preferentemente en dicho procedimiento el óxido de hierro y cobalto es ferrita de cobalto (ver Ejemplo 1), magnetita (Fe₃O₄) o su forma oxidada (γ-Fe₂O₃).

Un aspecto más preferido de la invención lo constituye un procedimiento de la invención en el que el condicionamiento de la etapa b) del procedimiento de la invención se realiza con hidróxido de tetrametilamonio.

ES 2 301 296 A1

Un aspecto aún mas preferido de la presente invención lo constituye un procedimiento de la invención en el que el recubrimiento de sílice de la etapa c) del procedimiento de la invención se realiza por tratamiento con una solución de silicato sódico.

5 Por otro lado, el grosor de la capa de sílice de la etapa c) del procedimiento de la invención puede variar en función del tamaño de las nanopartículas deseadas. Así, otra realización de la presente invención lo constituye un procedimiento de la invención que comprende adicionalmente la siguiente etapa:

10 c2) una extensión de la etapa c) tras el tratamiento con silicato sódico, promoviendo un crecimiento adicional de la capa de sílice con tetraetoxi ortosilicato.

Una realización preferida de la presente invención lo constituye el procedimiento de la invención en el que la funcionalización química de la superficie de la etapa d) del procedimiento de la invención se realiza con un reactivo del tipo trialcóxi silano perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención, al siguiente grupo de compuestos: γ -aminopropil trietoxisilano, γ -mercaptopropil trimetoxi silano o una mezcla de ambos. Preferentemente se pueden introducir en general cualquier molécula del tipo trialcóxi silano o diferentes moléculas con esta estructura simultáneamente, obteniéndose de este modo la funcionalización deseada.

Otra realización particular del procedimiento de la invención lo constituye un procedimiento en el que la capa metálica de e) del procedimiento de la invención se elabora a partir de un metal, perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: oro (Au), plata (Ag), cobre (Cu) o platino (Pt), o una aleación formada por varios o todos estos metales, por ejemplo Au/Ag o Au/Cu.

En otra realización particular del procedimiento de la invención, las nanopartículas metálicas de la etapa e.i) son nanopartículas de oro que se preparan por la reducción de HAuCl_4 disuelto en agua básica con cloruro de tetrakis (hidroxifenil) fosfonio.

En aún otra realización particular del procedimiento de la invención, para producir la quimisorción de la etapa e.ii) se mezclan las nanopartículas de la etapa d) con las de la etapa e), de modo que las nanopartículas de metal estén en exceso.

En otra realización preferente del procedimiento de la invención, el crecimiento de una capa de oro mencionado en la etapa e.iii) del procedimiento de la invención se realiza por la reducción sobre las semillas de nucleación en etapas sucesivas de Au^{3+} con hidrocloreuro de hidroxilamina.

En otra realización particular del procedimiento de la invención, el crecimiento de una capa de oro mencionado en la etapa e.iii) del procedimiento de la invención se realiza por la reducción sobre las semillas de nucleación en etapas sucesivas de Au^{3+} con formaldehído.

En otra realización aún más preferente del procedimiento de la invención, el crecimiento de una capa metálica de la etapa e.iii) del procedimiento de la invención consiste en la generación de una aleación oro/plata que se realiza por la reducción sobre las semillas de nucleación en etapas sucesivas de Ag^+ con formaldehído en presencia de amoníaco (ver ejemplo 1.2).

Otro objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención en el que la molécula biosensora inmovilizada en la etapa f) del procedimiento de la invención pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención, de uno de los siguientes conjuntos:

a) biomoléculas naturales: ácidos nucleicos (DNA o RNA) de cadena sencilla o doble, enzimas, anticuerpos, proteínas de membrana, proteínas de choque térmico, chaperoninas, otras proteínas, monosacáridos, polisacáridos, glucoproteínas, ácidos grasos, terpenos, esteroides, otras moléculas de naturaleza lipídica, lipoproteínas, hormonas, vitaminas, metabolitos, hidrocarburos, tioles, moléculas naturales con actividad antibiótica o antiviral, o bien agregados macromoleculares compuestos por proteínas y/o ácidos nucleicos u otras combinaciones de las moléculas citadas anteriormente;

b) biomoléculas naturales obtenidas por procedimientos de selección *in vitro*: aptámeros, ribozimas, aptazimas;

c) biomoléculas artificiales: PNAs, otros análogos de ácidos nucleicos naturales, quimeras de ácidos nucleicos naturales y artificiales, polímeros con capacidad de reconocimiento de forma ("molecular imprinted polymers" o MIPs), anticuerpos artificiales, anticuerpos recombinantes, minianticuerpos, o moléculas sintéticas con actividad antibiótica o antiviral.

Como se ha comentado anteriormente dicha molécula biosensora incluye un grupo funcional, tanto en la propia estructura de la molécula como por efecto de la adición sintética de dicho grupo, con capacidad de aceptar densidad electrónica perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención, a la siguiente lista: grupos amino, grupos tiol, grupos disulfuro, di-alcil sulfuros, grupos epoxi, así como las aminas y alcoholes en platino.

ES 2 301 296 A1

Otro aspecto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención en el que la biomolécula inmovilizada en la etapa f) del procedimiento de la invención es una molécula de ácido nucleico peptídico (PNA).

5 Dadas las características de estas moléculas biosensoras inmovilizadas es posible conseguir que, en condiciones controladas de hibridación y lavado, las moléculas biosensoras, por ejemplo moléculas de PNA se hibriden únicamente con sus cadenas de DNA perfectamente complementarias. Esta especificidad de detección puede ser tan alta como para discriminar entre dos moléculas de DNA diana que se diferencien en una sola mutación o polimorfismo genético (SNP). Por tanto, tales biomoléculas inmovilizadas pueden detectar la existencia de dichas cadenas de DNA en una muestra empleando métodos adecuados, lo que permite su aplicación en distintos sectores industriales principalmente en biomedicina humana y veterinaria, alimentación y control medioambiental.

Por lo tanto un tercer aspecto de la presente invención lo constituye el uso de las diversas aplicaciones de la nanopartícula biosensora de la invención a título ilustrativo, en al menos uno de los siguientes aspectos:

- 15 i) detección de patógenos de tipo viral, bacteriano, fúngico o protozoario,
- ii) caracterización de mutaciones o polimorfismos genéticos (SNPs) en dichos agentes que pueden hacerlos resistentes a fármacos o facilitar el escape a vacunas,
- 20 iii) caracterización de mutaciones o SNPs en genes humanos o animales, relacionados con enfermedades o con propensión a ellas,
- iv) detección de marcadores tumorales concretos.
- 25 v) detección de microorganismos concretos, patógenos o contaminantes en alimentos,
- vi) detección de la presencia de organismos manipulados genéticamente (OMG) o transgénicos en alimentos, y
- 30 vii) detección de microorganismos o toxinas contaminantes del medio ambiente.

Por otro lado, las nanopartículas biosensoras de la presente invención también pueden utilizarse para la elaboración de un microarray o micromatriz en el que cada punto del microarray pudiera estar constituido por una nanopartícula biosensora de la presente invención dirigida a un determinado elemento biológico (por ejemplo, un ácido nucleico con una secuencia determinada). Con ello sería posible el análisis en paralelo de una batería de distintas hibridaciones producidas sobre otros tantos tipos de nanopartículas biosensoras. Así, otro objeto particular de la presente invención lo constituye un dispositivo biosensor constituido por una serie de nanopartículas biosensoras de la presente invención dispuestas sobre una superficie tipo micromatriz o microarray.

40 Un cuarto aspecto de la presente invención lo constituye un ensayo de determinación de la hibridación, unión o interacción de una molécula biológica a la molécula inmovilizada en una nanopartícula biosensora de la invención, en adelante ensayo de determinación de la hibridación de la invención, que comprende las siguientes etapas:

- 45 i) reacción de la nanopartícula biosensora de la invención con una muestra susceptible de contener la molécula biológica candidata, que puede poseer o no secuencias complementarias a la biomolécula orgánica inmovilizada, en condiciones adecuadas para su hibridación,
- ii) captura de las nanopartículas biosensoras por sedimentación magnética, y
- 50 iii) determinación de la hibridación, o no, ocurrida en la i).
- iv) deducción de la existencia, o no, de la molécula biológica candidata en la muestra susceptible de contenerla y en su caso, deducción de la secuencia de tal molécula biológica candidata en función de su grado de hibridación con la nanopartícula biosensora.
- 55 v) opcionalmente, cuantificación de la concentración de la molécula biológica candidata en la muestra.

Como se ha comentado anteriormente, una realización particular de la invención es una nanopartícula biosensora que posee en su superficie PNAs como molécula biosensora inmovilizada del apartado i) del ensayo de determinación de la hibridación, y donde el objeto de la hibridación es una molécula biológica candidata consistente en un ácido nucleico natural (DNA o RNA). Por ello, otro aspecto particular de la presente invención lo constituye el uso de la nanopartícula biosensora de la invención en el que la determinación de la hibridación o no en la etapa i) del ensayo de determinación de la hibridación consiste en la hibridación entre una molécula de PNA inmovilizada en la nanopartícula biosensora y una molécula de DNA presente en una muestra problema.

65 Otra realización particular de la invención es una nanopartícula biosensora que posee en su superficie anticuerpos naturales, anticuerpos artificiales, anticuerpos recombinantes o minianticuerpos como molécula biosensora inmovilizada del apartado i) del ensayo de determinación de la hibridación, y donde el objeto de la hibridación o unión es

el antígeno que dicho anticuerpo reconoce específicamente. En ese caso, el antígeno ha de poseer en su estructura molecular grupos funcionales diferentes de los de la proteína que actúa como anticuerpo, de forma que sea posible su detección por técnicas espectroscópicas o electroquímicas. Dichos grupos funcionales específicos del antígeno y no presentes en la proteína pueden ser, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención: hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos aromáticos, heterociclos, D-aminoácidos, grupos funcionales que contengan nitrógeno, azufre, fósforo o metales formando enlaces de coordinación.

Otra realización particular de la invención es una nanopartícula biosensora que posee en su superficie, como molécula biosensora inmovilizada del apartado i) del ensayo de determinación de la hibridación, aptámeros, ribozimas, aptazimas u otros ácidos nucleicos a los que mediante procedimientos de selección *in vitro* se les ha dotado de (o enriquecido en) la capacidad para reconocer ligandos concretos y unirse específicamente a ellos. En ese caso, el ligando cuya unión se podrá detectar ha de poseer en su estructura molecular grupos funcionales diferentes de los del ácido nucleico que actúa como molécula biosensora, es decir, cualquier grupo distinto a los siguientes: ribosa, desoxirribosa, fosfato, base nitrogenada púrica o pirimidínica. Dichos grupos funcionales específicos del ligando pueden ser, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención: hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos aromáticos, heterociclos, D-aminoácidos, otros grupos funcionales que contengan nitrógeno, azufre, fósforo o metales formando enlaces de coordinación.

Una realización preferente de la presente invención lo constituye un método de detección de la hibridación de la etapa iii) del ensayo de determinación de la hibridación o unión llevado a cabo mediante detección espectroscópica. Preferentemente, la medida de detección espectroscópica se puede llevar a cabo mediante radiación ultravioleta. Más preferentemente la medida espectroscópica se puede llevar a cabo mediante radiación infrarroja.

En otro aspecto preferido de la invención la detección de la hibridación se realiza mediante espectroscopia Raman.

La técnica de Raman y el infrarrojo (IR) miden en la misma región del espectro de radiación electromagnética, la de energía vibracional de las moléculas, si bien ambas técnicas detectan diferentes fenómenos que suceden con los enlaces químicos. La diferencia es que el IR proporciona la señal de los cambios de polaridad del enlace excitado según una u otra vibración, y el Raman proporciona el cambio de polarizabilidad que sufre el enlace. La medida espectroscópica proveerá una serie de bandas de absorción (en el caso del IR) o de dispersión (en el caso del Raman) en las que se buscan las frecuencias de vibración de las partes no comunes entre la molécula biosensora inmovilizada sobre las nanopartículas y la molécula biológica candidata cuya presencia se desea detectar. En el caso de la detección de DNA o RNA empleando PNA inmovilizado sobre nanopartículas, estas bandas son las que corresponden al esqueleto sobre el que se disponen las bases nucleicas, que como ya se comentó en el caso del PNA es una cadena de naturaleza peptídica, y para los ácidos nucleicos naturales (DNA y RNA) es de tipo azúcar-fosfato (2-desoxirribosa o ribosa, respectivamente, unida por enlaces fosfodiéster).

Así, una realización particular de la invención lo constituye un método de detección espectroscópica del ácido nucleico hibridado sobre la nanopartícula en la región del infrarrojo que se lleva a cabo mediante un método, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención, perteneciente al siguiente grupo:

- a) mediante el uso de un equipo de infrarrojo, midiendo la absorción de las nanopartículas por transmisión
- b) mediante el uso de un equipo de infrarrojo, midiendo la absorción de las nanopartículas por reflexión total atenuada (ATR)
- c) mediante el uso de un equipo de infrarrojo, midiendo la absorción de las nanopartículas en la modalidad de ángulo rasante.

En una realización particular de la invención, el equipo infrarrojo utilizado en el apartado a) anterior es un equipo de sobremesa emplazado en un laboratorio, integrando la técnica de la Transformada de Fourier (FT) para la resolución de espectros, y utilizando ventanas de transmisión de fluoruro de bario, fluoruro de calcio u otro tipo de ventana transparente a la radiación infrarroja, a título de ejemplo y sin limitarse a ellos: el bromuro potásico, cloruro potásico, cloruro sódico o bromuro sódico. En otra realización particular de dicho método, las ventanas transparentes a la radiación infrarroja pueden adoptar una configuración en flujo mediante el cual sucesivas muestras pueden ser analizadas en continuo.

En una realización preferente de la invención, el equipo infrarrojo utilizado en el apartado a) anterior es un equipo portátil para el análisis en muestras de campo, pudiendo ser un equipo de Transformada de Fourier o por el contrario presentar un sistema dispersivo de irradiación continua y detector limitado a las frecuencias de interés.

En una realización aún más preferente de la invención, en el equipo infrarrojo utilizado en el apartado b) anterior, en la modalidad de reflexión total atenuada (ATR) puede adoptarse la configuración en flujo con o sin aplicación de un campo magnético externo que permita mantener posicionadas las nanopartículas magnéticas en la celda. En una realización aún más preferente de la invención, el equipo infrarrojo utilizado en el apartado b) anterior mediante la modalidad de reflexión total atenuada (ATR) en la configuración en flujo puede utilizarse la celda con campo magnético externo y termostataada. De esta forma se puede aplicar una rampa de temperatura y estudiar el efecto de

ES 2 301 296 A1

dicha temperatura en la estabilidad de la hibridación entre la sonda de PNA inmovilizada sobre la nanopartícula y el ácido nucleico diana (DNA o RNA).

5 En otra realización particular de la invención, el equipo infrarrojo utilizado en el apartado b) presenta una ventana de seleniuro de zinc, pudiendo ser sustituida por cualquier otro cristal apropiado para la técnica de ATR (como el germanio, por ejemplo). En otra realización particular el cristal apropiado para técnica de ATR puede estar recubierto por una película delgada de oro o plata.

10 En otra realización particular de dicho método las nanopartículas biosensoras conteniendo sondas de PNA se pueden disponer regularmente en áreas discretas de una superficie y tras la etapa de hibridación ser analizadas mediante microscopía infrarroja individualmente o en disposición de microarray.

15 Por otro lado, la capa metálica externa que presentan las nanopartículas les da otra propiedad: son capaces de conducir la electricidad a lo largo de su superficie. Esto les confiere el carácter de *nanoelectrodos*, pudiendo transmitir señal eléctrica en disolución hasta un electrodo sobre el que se confinan las partículas magnéticas por gravedad o por la influencia de un campo magnético externo. Un ejemplo práctico de esta realización, llevada a cabo sobre electrodos de disco de oro, funcionalizados con una monocapa de PNA tiolado, se muestra en la figura 5. Se han obtenido resultados similares con las nanopartículas magnéticas biosensoras descritas en esta patente.

20 En una realización particular de dicho método, en el apartado i) del ensayo de determinación de la hibridación de la invención, se dejan reaccionar las nanopartículas que contienen sondas de PNA inmovilizadas con la disolución donde presumiblemente se encuentran las moléculas de ácidos nucleicos con secuencias complementarias a dicho PNA. En el paso ii) del ensayo de determinación de la hibridación de la invención, las nanopartículas con el ácido nucleico hibridado se recuperan y se incuban en una disolución que contienen un compuesto redox, es decir, con propiedades diferentes en su estado oxidado y en su estado reducido. Dicho compuesto redox, en su estado oxidado tiene carga neta positiva mientras que en su estado reducido no presenta carga. Estos compuestos, que en lo sucesivo llamaremos mediadores redox, pertenecen, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: el compuesto tionina, el compuesto azul de metileno, el compuesto osmio-bipiridilo o el compuesto bencil viológeno.

30 Uno de los hechos experimentales originales que sustentan la presente invención es que dichos mediadores redox se adsorben electrostáticamente sobre las cadenas de DNA hibridadas sobre cadenas de PNA complementarias. Sin embargo, tal como se ha observado experimentalmente, tras su reducción electroquímica dichos mediadores redox pierden su carga eléctrica y con ello su afinidad electrostática por el DNA, por lo que difunden al medio y pueden ser detectados electroquímicamente. Este fenómeno tiene lugar cuando los heterodúplex PNA/DNA se han formado sobre un electrodo másico, y también cuando se han formado sobre nanopartículas conductoras que depositadas sobre un electrodo colector o atraídas sobre él por un campo magnético externo, se comportan como un array de nanoelectrodos. Se ha determinado experimentalmente que las moléculas de los mediadores redox difundidas al medio pueden ser reducidas por la acción catalítica de un enzima apropiado (a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención, un enzima peroxidasa), con lo que se obtiene un efecto de amplificación (ver Ejemplo 3).

45 Por tanto, una realización particular de la presente invención la constituye un método para la determinación de la hibridación de iii) mediante técnicas electro-analíticas conocidas como dinámicas.

50 En una realización particular de la invención las técnicas dinámicas pertenecen a la categoría de técnicas electroquímicas de potencial controlado, estando comprendidas, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: cronoamperometría y voltametría cíclica y/o lineal. Tal como es aceptado por cualquier experto en el campo, son variables de estas técnicas las modalidades de barrido o de pulso y las de electrodo estacionario o rotatorio.

55 En una realización particular de la invención las técnicas dinámicas pertenecen a la categoría de técnicas electroquímicas de corriente controlada, de pequeña amplitud, o de gran amplitud. Entre ellas están comprendidas, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, la cronopotenciometría y la coulombimetría.

En una realización particular de la invención las técnicas voltamétricas pertenecen a la categoría de "stripping" y sus variantes: de barrido lineal, de pulso diferencial, de barrido lineal diferencial de onda cuadrada.

60 En una realización preferente de la presente invención, las variantes de las técnicas electroanalíticas pueden realizarse, en lugar de con nanopartículas metálicas, con electrodos metálicos como soporte de las sondas de PNA. Estos electrodos pueden tener forma, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, de: discos, hilos, anillos, esferas o esferoides.

65 A continuación, los ejemplos describen en mayor detalle ciertas realizaciones de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 *Síntesis de las nanopartículas magnéticas metalizadas biosensoras de la invención*

Ejemplo 1.1

10 *Nanopartículas biosensoras de oro*

10

El objeto inicial de este ejemplo de realización es preparar una suspensión magnética compuesta por nanopartículas de ferrita de cobalto (CoFe_2O_4) de tamaño uniforme, recubiertas con una capa delgada de sílice funcionalizada con grupos amino, más un recubrimiento final con una capa de oro (tal como se esquematiza en la figura 1) sobre la cual se quimisorberán las moléculas de PNA tiolado como ejemplo de molécula biosensora. El recubrimiento de sílice tiene lugar sobre las nanopartículas magnéticas de forma individual, pudiendo también obtenerse el recubrimiento de varios núcleos magnéticos simultáneamente. Las nanopartículas así preparadas cumplen las propiedades buscadas: que sean estables en suspensión durante un largo período de tiempo, pero que en presencia de un campo magnético sedimenten. Además, retirando dicho campo magnético las nanopartículas deben redispersarse al aplicar una agitación suave.

15

20

En un ejemplo particular se ha empleado ferrita de cobalto con una estructura de espinela inversa, sintetizada a un tamaño de 17 ± 3 nm, con unas propiedades magnéticas adecuadas ($M_s = 73$ emu/g). Estas nanopartículas se sintetizan por coprecipitación de Fe^{3+} y Co^{2+} en solución alcalina a ebullición por el método de Wagner (Wagner y col., 2002). Las nanopartículas así obtenidas tienen un punto isoeléctrico aproximado a 8.5, lo que las hace bastante inestables en disoluciones acuosas con pH comprendido entre 7 y 10. El siguiente paso consiste en recubrir este ferrofluido con una capa de sílice, con lo que se consigue bajar hasta 3 el punto isoeléctrico de las nanopartículas haciéndolas estables en disolución a pHs neutros. La capa de sílice permite, a su vez, insertar posteriormente grupos funcionales para trabajar sobre la superficie de las nanopartículas.

25

30

El recubrimiento con sílice de las nanopartículas se hace del siguiente modo: se toman 30 mL del ferrofluido de ferrita de cobalto sintetizada previamente y se diluyen hasta 150 mL con agua. Luego se añade 500 μL de hidróxido de tetrametilamonio (TMA), subiendo el pH hasta 11.5-12, y se llevan al matraz de reacción. A continuación se prepara 100 mL de silicato sódico en disolución al 0.50%, y con la resina Dowex W X8 previamente activada se disminuye el pH hasta 10.5, tras lo cual se filtra con papel de filtro para eliminar la resina de intercambio iónico.

35

40

El matraz con el ferrofluido se calienta hasta ebullición con un sistema de reflujo, y se van añadiendo los 100 mL de silicato sódico a lo largo de 2 horas, gota a gota durante la primera hora y media con la ayuda de una bomba peristáltica. El volumen se ha de mantener constante, para lo que se va liberando poco a poco algo de vapor en caso que sea necesario. Cuando la reacción termina, se deja enfriar a temperatura ambiente al aire. El producto de la reacción se dializa durante cuatro días en tubos de cellophane frente a agua, llevada a pH = 10 por adición de dos gotas de TMA. Se cambia el agua de diálisis cada día.

50

Para introducir el grupo amino en la superficie de las nanopartículas magnéticas ya recubiertas por sílice se utiliza una reacción basada en el método de Stöber (Wang y col., 1996), una condensación de grupos siloxanos entre los grupos silano del γ -aminopropiltrióxido de silano (APTES) y la capa de sílice depositada en la etapa previa sobre el ferrofluido. Para ello se pone en un matraz de reacción la cantidad pertinente de etanol absoluto con amoníaco al 1%, el ferrofluido al 1.5% y el APTES en concentración 1 milimolar (mM), y se deja agitando suavemente, a 400 revoluciones por minuto (rpm) y con una varilla de vidrio, hasta el día siguiente. Luego, las partículas se sedimentan magnéticamente y se lavan con etanol, redispersándolas tras dos lavados en un volumen igual a la cantidad original de ferrofluido. Para ello se necesita una inmersión corta (entre 15 y 20 segundos) en un baño de ultrasonidos.

55

Para llevar el ferrofluido funcionalizado a fase acuosa, las nanopartículas se sedimentan magnéticamente y se decanta el etanol, siendo sustituido por un volumen igual de disolución acuosa de HEPES 20 mM a pH = 12. Luego se introduce en el baño de ultrasonidos el tiempo necesario para una correcta dispersión. Este procedimiento se realiza tres veces para eliminar todo el etanol.

60

Paralelamente se sintetizaron nanopartículas de oro siguiendo el método de reducción de una sal de oro (III) descrito por D. Duff y A. Baiker (Duff y Baiker, 1993). En este caso se preparó una disolución básica con concentraciones finales 60 mM de NaOH, 1 mM del agente reductor [cloruro de tetrakis-(hidroxifenil)fosfonio, (THPC)] y 1 mM de HAuCl_4 . En un medio acuoso se añaden estos compuestos bajo agitación a 600 rpm, por ese orden y en los volúmenes correspondientes a la cantidad final que se quiera preparar. Tras la formación del coloide, que sucede a los pocos segundos de añadir la sal de oro, se filtra con un filtro Whatman de nitrato de celulosa con un tamaño de poro de 450 nm, y se almacena.

65

Sobre el ferrofluido de ferrita de cobalto funcionalizado con grupos amino y/o tiol en su superficie se inmovilizan las nanopartículas de oro por autoensamblaje a estos grupos funcionales, aprovechando la afinidad bien conocida de estos grupos por el oro, produciéndose una quimisorción. En concreto, la presencia de nanopartículas de oro junto a las nanopartículas magnéticas funcionalizadas conduce a la decoración superficial de estas últimas con las primeras, quedando recubierta cada nanopartícula magnética por varias nanopartículas de oro. Estas nanopartículas de oro son

la semilla para reducir metales en la superficie, promoviendo el crecimiento de una capa de oro o de plata sobre la nanopartícula. Esto sucede cuando se ponen en presencia de los iones metálicos con los que se quiere recubrir la nanopartícula y un agente reductor suave capaz de hacer crecer una superficie metálica pero incapaz de producir nucleación secundaria.

Dado que ambas dispersiones -ferrofluido de ferrita de cobalto funcionalizado y las nanopartículas de oro- están a pH básico, se pueden mezclar ambos coloides sin que haya problemas posteriores de floculación durante el autoensamblaje. En un principio se añaden cantidades iguales de ambos fluidos y tras homogeneizar por agitación en vortex la mezcla se deja reaccionar dos horas. Luego, se sedimentan las nanopartículas magnéticamente y se comprueba mediante espectrofotometría si en el sobrenadante hay nanopartículas de oro. Si no las hay, se redispersa el sedimento y se añaden más nanopartículas de oro, repitiéndose el proceso hasta que se sature la superficie de las nanopartículas magnéticas con las de oro, momento en el que se detectará un exceso de oro en el sobrenadante. Posteriormente, se lavan las partículas por sedimentación magnética y posterior redispersión en un medio HEPES 20 mM a pH = 11 tres veces, para eliminar el exceso de nanopartículas de oro.

Sobre las nanopartículas anteriores ya decoradas con nanopartículas de oro se hace crecer una capa de oro mediante la reducción de HAuCl₄ con un reductor suave que favorezca el crecimiento en lugar de la nucleación de nuevas partículas de oro, como es la hidroxilamina (NH₂OH). En cada reducción, las nanopartículas magnéticas decoradas con nanopartículas de oro actúan como centros de nucleación. Repitiendo este proceso de reducción varias veces se consigue que se forme una capa continua de oro sobre las nanopartículas magnéticas. Además, en función de la cantidad de oro que se añade y del número de etapas de reducción se pueden lograr diferentes tamaños de partícula. Esto se ve reflejado en la banda de absorción de resonancia de plasmón superficial, que se desplaza en función de la cantidad de oro añadida.

El tamaño final de las nanopartículas biosensoras producidas en el presente ejemplo está comprendido entre 50 y 80 nm de diámetro, como puede comprobarse por microscopía electrónica de transmisión (Figura 2). Las partículas 5 magnéticas que constituyen el núcleo de las nanopartículas tienen 18±3 nm, y el espesor de la capa de sílice es entre 1 y 15 nm.

Ejemplo 1.2

Síntesis de nanopartículas biosensoras de aleación oro/plata

El proceso de obtención de nanopartículas recubiertas por una aleación Au/Ag se basa en la reducción del ión plata sobre las nanopartículas magnéticas decoradas con nanopartículas de oro obtenidas tal como se indica en el apartado 1.1. Para ello se ponen 500 μL del ferrofluido decorado con partículas de oro, 400 μL de glicina 0.5 M, 600 μL de agua (de pureza milli-Q), 20 μL de AgNO₃ 12 mM y 100 μL de ácido ascórbico 10 mM. Esta solución se deja a temperatura ambiente y en oscuridad durante 6 horas, se lavan las nanopartículas por sedimentación magnética tres veces, resuspendiendo en 500 μL de agua cada vez, y se repite el proceso (Huang y col., 2004). La inmovilización de las moléculas de PNA se realiza tal como se detallará en el Ejemplo 1.4.

Ejemplo 1.3

Síntesis de nanopartículas biosensoras de oro, plata y oro

Se toman 2 mL de un ferrofluido de ferrita de cobalto cuya síntesis se ha descrito en el ejemplo 1.1. y se hace reaccionar con una mezcla de dos silanos, en proporciones diferentes entre 50 y 80% de γ-APTMS y el resto de γ-MPTMS. El volumen añadido de estos reactivos suma 50 μL. Todo esto se hace en un matraz, bajo agitación suave (100 rpm) con varilla de vidrio, poniendo 288 mL de etanol absoluto y 10 mL de NH₃ al 25%. Luego se vierte el ferrofluido y, por último, los silanos. Esto se deja reaccionar a temperatura ambiente hasta el día siguiente. Posteriormente se lavan, se resuspenden en 20 mL de etanol 2 veces y otras 3 veces en agua, y se dejan en un volumen final de 10 mL (con ello se diluye la concentración de nanopartículas 5 veces, de modo que queda aproximadamente 3 mg/mL).

Por otro lado se sintetizan nanopartículas de oro según el método descrito en el apartado 1.1.

Las nanopartículas de oro se ponen en presencia de las nanopartículas magnéticas funcionalizadas, y se acidifica la suspensión de forma que el oro se inmovilice sobre el ferrofluido, durante al menos una hora. Luego se lava y al resuspender en 5 mL de agua, se sube el pH hasta 11 con NaOH 1N. En ese punto, al atraer con un imán no ha de quedar oro en la disolución.

A continuación se recubre con plata según el método del formaldehído descrito por N. Halas (Hallas y col., 2005), etapa que se hace el número necesario de veces para conseguir un recubrimiento total. El método consiste en tomar 9 mL de agua con una concentración 0.15 mM de AgNO₃ y añadir 500 μL de las nanopartículas magnéticas decoradas con oro. Acto seguido se añaden 50 μL de formaldehído al 37%, se agita con el vortex rápidamente y se vierte de inmediato 50 μL de NH₃ al 25%. Se vuelve a agitar, y al cabo de dos minutos se sedimenta magnéticamente. Se mide el plasmón del sobrenadante, y tras lavar dos veces, el de las nanopartículas. Estas medidas se hacen en todas las etapas del recubrimiento, hasta que se vea que el plasmón de la plata se extiende a lo largo de todo el rango visible, punto en el que se considera que la capa de plata está prácticamente cerrada.

Posteriormente, la capa de plata se recubre a su vez con oro por el método descrito en el Ejemplo 1.1., resuspendiéndose hasta una dilución mayor: 0.3 mg/mL en lugar de 3 mg/mL. El resultado final es que las nanopartículas adquieren una estabilidad en disolución mucho mayor, y no se agregan. Se ponen tres etapas de recubrimiento de oro en las siguientes condiciones: 5 mL de nanopartículas a 0.3 mg/mL, 50 μ L de H₂AuCl₄ 25 mM y 80 μ L de NH₂OH·HCl 100 mM, bajo agitación en el vortex. Se lava dos veces, y se siguen las etapas de recubrimiento con la variación de la banda de resonancia del plasmón superficial. Se observa cómo va creciendo la banda a 520 nm, y el máximo se desplaza hacia longitudes de onda más largas, lo que indica la progresión del recubrimiento. Cuando se recubren las nanopartículas 10 veces más diluidas, como es en este caso, su estabilidad en superficie resulta mucho mayor.

10 Ejemplo 1.4

Inmovilización de PNA sobre las nanopartículas biosensoras con capa externa de oro ó plata

Posteriormente a lo indicado en los Ejemplos 1.1 a 1.3, en las nanopartículas magnéticas con recubrimiento de oro así elaboradas se procede a la inmovilización de una molécula biosensora. En concreto para el presente ejemplo se ha utilizado una molécula orgánica tipo PNA, lo que confiere a la nanopartícula biosensora de la invención la funcionalidad de poder hibridarse a ácidos nucleicos naturales (DNA o RNA) con secuencias complementarias a las del PNA. La capa de oro externa de las nanopartículas presenta unas propiedades de soporte, y sobre ella se pueden quimisorber compuestos tiolados. Por ello, los PNAs que se van a inmovilizar sobre las nanopartículas tienen en un extremo un grupo tiol aportado por una cisteína (Cys), de modo que van a formar monocapas orientadas de hebras de PNA, tal como los inventores han demostrado previamente con cristales de oro (Briones y col., 2004; 2005).

En realizaciones particulares de este ejemplo se han empleado dos moléculas diferentes de PNA de cadena sencilla, ambas con una cisteína en su extremo amino. A continuación de la Cys, las moléculas de PNA poseen dos grupos espaciadores de tipo "O" que corresponden a moléculas de ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico, y que en conjunto forman un espaciador de 3 nm de longitud que permite separar el extremo de la molécula inmovilizado sobre la nanopartícula de la región sensora con capacidad para hibridarse a ácidos nucleicos. La primera molécula de PNA utilizada se denomina "P-G", posee 11 bases nucleotídicas de longitud y su secuencia (escrita desde el extremo amino al extremo carboxilo) es: Cys-O-O-SEQ ID N° 1. Esta secuencia ha sido elegida por su relevancia en virología animal, ya que corresponde a la región más antigénica (denominada "loop RGD") de la proteína VP1 de la cápsida del virus de la fiebre aftosa (FMDV) (Martínez y col., 1997).

La segunda secuencia de PNA se denomina "P-M" y su secuencia (de 9 bases nucleotídicas de longitud) es: Cys-O-O-SEQ ID N° 2. Esta secuencia ha sido elegida debido a su relevancia biosanitaria, ya que incluye la secuencia complementaria al codón 41 de la región de la transcriptasa reversa (RT) del gen *pol* del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), una posición en la que se ha descrito la frecuente aparición de la mutación M41L implicada en la resistencia de HIV al fármaco antiviral denominado Zidovudina (AZT) (Yeni y col., 2002).

Para inmovilizar el PNA sobre las nanopartículas, se toman 76 μ L del ferrofluido recubierto con oro elaborado previamente, y se añaden 4 μ L de una disolución de las moléculas de PNA diluida en agua (pureza milli-Q) a concentración 10 μ M. La quimisorción del PNA sobre las nanopartículas se logra mediante incubación a una temperatura de entre 20 y 25°C, durante tres horas y cuarto. Posteriormente, las nanopartículas se sedimentan magnéticamente y el sobrenadante se cambia por agua. Se resuspenden las nanopartículas, y se repite el proceso dos veces más para eliminar todo el PNA que no haya reaccionado con el recubrimiento de oro de las nanopartículas. Las nanopartículas ya decoradas con PNA se concentran bajo la acción de un campo magnético y se comprueba la adsorción de las moléculas de PNA por espectroscopia infrarroja de transmisión (línea discontinua en Figura 3). Este espectro de PNA sobre la nanopartícula se considerará el "blanco" en los experimentos posteriores de hibridación de las nanopartículas a DNA de una muestra, tal como se expone en el Ejemplo 2.

50 Ejemplo 2

Hibridación de la nanopartícula biosensora recubierta de oro y PNA a una molécula de DNA con secuencia complementaria a la del PNA. Determinación mediante el aumento de la intensidad de las bandas de absorción en el infrarrojo debidos a la hibridación del DNA con el PNA

Como se ha indicado previamente, la diferencia estructural más importante entre el PNA y los ácidos nucleicos naturales es que aquél posee un esqueleto de naturaleza peptídica mientras que el DNA y el RNA presentan en su esqueleto una sucesión de grupos desoxirribosa (el DNA) o ribosa (el RNA) y fosfato (Nielsen y col., 1991; Egholm y col., 1992). Por tanto, el PNA carece de grupos fosfato y de anillos glucídicos, lo que le ofrece una utilidad especial en el diseño de biosensores para la detección de hibridación de DNA o RNA. En este ejemplo se aprovecha precisamente que el cambio más notable que produce la hibridación PNA/DNA en la región del infrarrojo lo proporcionan los grupos fosfato del DNA, ya que tienen la tensión antisimétrica (una banda ancha en el intervalo 1260-1200 cm^{-1}) y la simétrica del enlace P=O (en torno a 1100 cm^{-1}). Otros hechos espectrales atribuibles a los residuos de desoxirribosa o ribosa de las cadenas DNA/RNA se detectan a 1065 cm^{-1} . Estas bandas se observan en una zona del espectro donde no absorben radiación ni las bases nucleotídicas del PNA y el DNA ni el esqueleto peptidomimético del PNA. Además, se produce un aumento en la señal en torno a 1580 cm^{-1} debida al apareamiento de las bases nitrogenadas (Ver figuras 3 y 4).

En el presente ejemplo se han empleado nanopartículas magnéticas recubiertas de oro funcionalizadas con moléculas del PNA “P-G” o bien con el “P-M”, cuyas secuencias se indican en el ejemplo 1.4. Se han diseñado moléculas de DNA de cadena sencilla que poseen una región central complementaria a la de dichos PNAs. Se han diseñado y sintetizado cuatro moléculas de DNA diana, de 31 nucleótidos (nt) de longitud, que corresponden con las secuencias de tipo salvaje y mutante de FMDV (“DNA-G” 5’-SEQ ID N° 3 -3’, y “DNA-E” 5’- SEQ ID N° 4 -3’, respectivamente, que difieren en la mutación de tipo “transición” G-A en su posición central) y de HIV (“DNA-M” 5’-SEQ ID N° 5 -3’, y “DNA-L” 5’- SEQ ID N° 6 -3’, respectivamente, que difieren en la mutación de tipo “transversión” A→T en su posición central). De esta forma, se estudia la capacidad de cada familia de nanopartículas funcionalizadas con un tipo de PNA no sólo para detectar la presencia del DNA o RNA complementario en una muestra sino incluso para discriminar entre secuencias de DNA o RNA con una mutación puntual. Por tanto se aplica nuestro sistema biosensor en biosanidad animal y humana, tanto para la detección de secuencias de DNA/RNA características de virus patógenos como para determinar si tales secuencias informan sobre la existencia de una población viral con capacidad de evadir el sistema inmune, escapar a vacunas o ser resistente a fármacos antivirales. En cada caso, las secuencias de DNA de la otra familia se utilizan como control de no hibridación, es decir, aquellas hibridaciones que no deben producirse (o, si se producen, deben lavarse completamente) puesto que la complementariedad de secuencia PNA/DNA es despreciable (por ejemplo, el PNA “P-G” con los DNAs “DNA-M” y “DNA-L”).

Por otra parte, se han diseñado y sintetizado otras dos moléculas de DNA, de cadena sencilla y 20 nt de longitud, que son complementarias a la vez a los dos PNAs utilizados en una y otra orientación: “DNA-GM”: 5’-SEQ ID N° 7-3’ (hibridación paralela con “P-G” y antiparalela con “P-M”) y “DNA-MG”: 5’-SEQ ID N° 8-3’ (hibridación antiparalela con “P-G” y paralela con “P-M”). Por tanto, cada una de estas dos moléculas de DNA podrá hibridar con los dos PNAs que recubren sendas nanopartículas diferentes.

En todos los casos, la hibridación de las nanopartículas recubiertas con PNA y el DNA se realiza durante 1 hora, a temperaturas comprendidas entre los 41 y 58°C, con concentraciones de DNA de 100 μ M, y seguidas de un lavado de dos ciclos de 15 minutos a temperaturas comprendidas entre 37 y 50°C. Las soluciones de hibridación (SH) y lavado (SL) empleadas han sido de dos tipos: i) SH compuesta de NaCl 7 mM + citrato de Na 0.7 mM (pH = 7.2), SL compuesta de NaCl 45 mM + citrato de Na 4.5 mM (pH = 7.0); ii) SH y SL compuesta de NaCl 60 mM + citrato de Na 6 mM + laurilsarcosina 0.72%. Previamente al análisis, en todos los casos se realiza un último lavado en agua (milli Q) para eliminar restos de sales.

Como ejemplo de los resultados producidos, el espectro de infrarrojo obtenido tras la hibridación y lavado de las nanopartículas biosensoras con cobertura metálica de oro y recubiertas por PNA de tipo “P-G” con el “DNA MG” se muestra en trazo continuo en la Figura 3. En ella se hace patente que tras la hibridación entre PNA y DNA perfectamente complementario aparecen entre otros los picos correspondientes a los grupos fosfato del DNA, como señal que claramente indica el evento de hibridación producido, a una frecuencia de 1220 y 1060 cm^{-1} .

Como ejemplo de los resultados obtenidos con nanopartículas biosensoras con cubierta metálica formada por capas sucesivas de oro/plata/oro, se muestra en el panel superior de la Figura 4 el espectro de infrarrojo obtenido tras la hibridación y lavado de estas nanopartículas biosensoras recubiertas por PNA de tipo “P-G” con el “DNA MG” de secuencia complementaria. Por comparación, el espectro inferior corresponde a nanopartículas idénticas a las anteriores (recubiertas por PNA tipo “P-G”) pero hibridadas con una sonda de DNA de secuencia no complementaria al PNA (“DNA L”), que al no hibridar específicamente es eliminada durante el ciclo de lavado. En el espectro superior de la figura aparecen los picos a 1225 y 1036 cm^{-1} correspondientes a los grupos fosfato del DNA, ligeramente desplazados respecto a sus posiciones en la figura 3 por efecto de la capa de plata. Además, análogamente a lo que se observa en la Figura 3, otro hecho espectral característico de la hibridación del PNA a un DNA complementario es la banda a 1590 cm^{-1} , correspondiente al apareamiento específico de las bases nitrogenadas del PNA con las del DNA.

Ejemplo 3

Hibridación de la nanopartícula biosensora recubierta de oro y PNA a una molécula de DNA con secuencia complementaria a la del PNA. Voltamogramas cíclicos de la tionina incorporada a través de interacciones iónicas con los residuos fosfatos de las cadenas de DNA

Empleando las nanopartículas biosensoras elaboradas como se detalla en el Ejemplo 1 se ha llevado a cabo el proceso indicado en el Ejemplo 2, pero empleando una diferente técnica de detección de la hibridación. Se han obtenido voltamogramas cíclicos empleando electrodos planos de oro modificados con las moléculas de PNA indicadas en el Ejemplo 1.4, posteriormente incubadas con diferentes concentraciones de DNA complementario. En este caso, tras la hibridación y el lavado, las nanopartículas hibridadas se incuban con una disolución de tionina y se someten a voltametría cíclica en presencia de peroxidasa y H_2O_2 .

La Figura 5 muestra las corrientes obtenidas empleando nanopartículas funcionalizadas con el PNA “P-M”, en un rango de concentración de “DNA-M” entre 10^{-14} y 10^{-6} M. Posteriores aumentos de sensibilidad se obtienen disminuyendo el volumen de reacción, con lo que se llega a sensibilidades de detección de 10^{-16} M de DNA, es decir, de 0.1 femtomolar.

Referencias

1. **Abad, JM. Vélez, M., Santamaría, C., Guisan, J.M., Matheus, P.R., Vázquez, L., Gazaryan, I., Gorton, L., Gibson, T. & Fernández, V.M.** Immobilization of peroxidase glycoprotein on gold electrodes modified with mixed epoxy-boronic acid monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 12845-12853 (2002).
2. **Arlinghaus HF, Ostrop M, Friedrichs O, Feldner JC.** Genome diagnostics with TOF-SIMS. *Appl. Surf. Sci.* 203: 689-692 (2003).
3. **Arlinghaus, H.F., Kwoka, M.N., Jacobson, K.B.** Analysis of biosensor chips for identification of nucleic acids. *Anal Chem.* 69: 3747-3753 (1997).
4. **Brandt, O., Feldner, J., Stephan, A., Schroder, M., Schnolzer, M., Arlinghaus, H. F., Hoheisel, J. D. & Jacob, A.** PNA microarrays for hybridisation of unlabelled DNA samples. *Nucleic Acids Res.* 31, e119-e127 (2003).
5. **Briones, C., Mateo-Martí, E., Gómez-Navarro, C., Parro, V., Román, E. y Martín-Gago, J.A.** Ordered self-assembled monolayers of peptide nucleic acids with DNA recognition capability. *Physical Review Letters* 93: 208103 (2004).
6. **Briones, C., Mateo-Martí, E., Gómez-Navarro, C., Parro, V., Román, E. y Martín-Gago, J.A.** Structural and functional characterization of self-assembled monolayers of peptide nucleic acids and its interaction with complementary DNA. *Journal of Molecular Catalysis* 228: 131-136 (2005).
7. **del Monte, F., Morales, M.P., Levy, D., Fernández, A., Ocaña, M., Roig, A., Molins, E. & Serna, C. J.** Formation of gamma-Fe₂O₃ isolated nanoparticles in a silica matrix. *Langmuir* 13: 3627-3634 (1997).
8. **Demidov VV, Protozanova E, Izvol'sky KI, Price C, Nielsen PE, Frank-Kamenetskii MD.** Kinetics and mechanism of the DNA double helix invasion by pseudocomplementary peptide nucleic acids. *Proc Natl. Acad Sci USA.* 99: 5953-5958 (2002).
9. **Demidov VV, Yavnilovich MV, Belotserkovskii BP, Frank-Kamenetskii MD, Nielsen PE.** Kinetics and mechanism of polyamide ("peptide") nucleic acid binding to duplex DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92: 2637-2641 (1995).
10. **Duff, D.G., Baiker, A. & Edwards, P.P.** A new hydrosol of gold clusters. 1. Formation and particle-size variation. *Langmuir* 9: 2301-2309 (1993).
11. **Egholm, M., Buchardt, O., Christensen, L., Behrens, C., Freier, S. M., Driver, D. A., Berg, R.H., Kim, S.K., Norden, B. & Nielsen, P. E.** PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature* 365, 566-568 (1993).
12. **Egholm, M., Buchardt, O., Nielsen, P. E., & Berg, R. H.** Peptide nucleic acids (PNA). Oligonucleotide analogues with an achiral backbone. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 1895-1898 (1992).
13. **Garcell L., Morales M.P., Andres-Verges M., Tartaj P. & Serna C.J.** Interfacial and rheological characteristics of maghemite aqueous suspensions. *J. of Colloid and Interf. Sci.* 205, 470-475 (1998).
14. **Griffin TJ, Tang W, Smith LM.** Genetic analysis by peptide nucleic acid affinity MALDI-TOF mass spectrometry. *Nat Biotechnol.* 15: 1368-1372 (1997).
15. **Hacia, J.G.** Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays. *Nature Genetics* 21: 42-47 (1999).
16. **Halas N.** Playing with plasmons. Tuning the optical resonant properties of metallic nanoshells. *MRS Bulletin* 30: 362-367 (2005).
17. **Harris, H.** The DNA microarray. *The Scientist* 19: 27-31 (2005).
18. **Huang, C.C., Yang, Z.S. & Chang, H.T.** Synthesis of dumbbell-shaped Au-Ag core-shell nanorods by seed-mediated growth under alkaline conditions. *Langmuir* 20: 6089-6092 (2004).
19. **Jackson JB, Halas NJ.** Silver nanoshells: Variations in morphologies and optical properties. *JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B* 105: 2743-2746 (2001).
20. **Jolivet, J.P., Massart, R. & Fruchard, J.M.** Synthesis and physicochemical study of non-surfactant magnetic colloids in an aqueous medium. *Nouv. J. Chim.* 7: 325-331 (1983).

21. **Kambhampati D, Nielsen PE, Knoll W.** Investigating the kinetics of DNA-DNA and PNA-DNA interactions using surface plasmon resonance-enhanced fluorescence spectroscopy. *Biosens Bioelectron.* 16: 1109-1118 (2001).
22. **Lee, J., Isobe, T. & Senna, M.** Preparation of ultrafine Fe₃O₄ particles by precipitation in the presence of PVA at high pH. *J. Colloid Interface Sci.* 177: 490-494 (1996).
23. **Madoz, J., Kuznetsov, B.A., Medrano, F.J., García, J.L. & Fernández, V.M.** Functionalization of gold surfaces for specific and reversible attachment of a fused beta-galactosidase and choline-receptor protein. *J. Am. Chem. Soc.* 119: 1043-1051 (1997).
24. **Martínez, M.A., Verdaguer, N., Mateu, M.G. & Domingo, E.** Evolution subverting essentiality: dispensability of the cell attachment Arg-Gly-Asp motif in multiply passaged foot-and-mouth disease virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 6798-6802 (1997).
25. **Massart, R & Cabuil, V.** Effect of some parameters on the formation of colloidal magnetite in alkaline-medium - yield and particle-size control. *J. Chem. Phys.* 84, 967-973 (1987).
26. **Massart, R.** Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE transactions on magnetics* 17: 1247-1248 (1981).
27. **Nielsen PE.** Applications of peptide nucleic acids. *Curr Opin Biotechnol.* 10: 71-75 (1999).
28. **Nielsen PE.** Peptide nucleic acid targeting of double stranded DNA. *Methods Enzymol.* 340: 329-340 (2001).
29. **Nielsen, P. E., Egholm, M., Berg, R. H. & Buchardt, O.** Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 254, 1497-1500 (1991).
30. **Oldenburg, S.J., Averitt, R.D., Wescott, S.L. & Halas, N.J.** Nanoengineering of optical resonances. *Chemical Physics Lett.* 288: 243-247 (1998).
31. **Osawa, M. & Ikeda, M.** Surface-enhanced infrared-absorption of para-nitrobenzoic acid deposited on silver island films - contributions of electromagnetic and chemical mechanisms. *J. Phys. Chem.* 95: 9914-9919 (1991).
32. **Parinov, S., Barsky, V., Yershov, G., Kirillov, E., Timofeev, E., Belgovskiy, A. & Mirzabekov, A.** DNA sequencing by hybridisation to microchip octa- and decanucleotides extended by stacked pentanucleotides. *Nucleic Acids Res.* 24, 2998-3004 (1996).
33. **Philipse, A.P., van Bruggen, M.P.B. & Pathmamanoharan, C.** Magnetic silica dispersions - preparation and stability of surface-modified silica particles with a magnetic core. *Langmuir* 10: 92-99 (1994).
34. **Relógio, A., Schwager, C., Richter, A., Ansorge, W. & Valcárcel, J.** Optimization of oligonucleotide-based DNA microarrays. *Nucleic Acids Res.* 30: e51 (2002).
35. **Rogers FA, Vasquez KM, Egholm M, Glazer PM.** Site-directed recombination via bifunctional PNA-DNA conjugates. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 16695-16700 (2002).
36. **Solinas S., Piccaluga G., Morales M.P. & Serna C.J.** Sol-gel formation of gamma-Fe₂O₃/SiO₂ nanocomposites; *Acta Materialia* 49, 2805-2811 (2001).
37. **Southern E.M.** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 98: 503-517 (1975).
38. **Southern E.M. Case-Green, S.C., Elder, J.K., Jonson, M., Mir, K.U., Wang, L. & Williams, J.C.** Arrays of complementary oligonucleotides for analysing the hybridization behavior of nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 22: 1368-1373 (1994).
39. **Sugimoto, T. & Matijevic, E.** Formation of uniform spherical magnetite particles by crystallization from ferrous hydroxide gels. *J. Colloid Interface Sci.* 74: 227-243 (1980).
40. **Tartaj, P., González-Carreño, T. & Serna, C.J.** Single-step nanoengineering of silica coated maghemite hollow spheres with tunable magnetic properties. *Advanced materials* 13: 1620-1624 (2001).
41. **Urakawa, T., Nakzawa, T., Inoue, H., Shirat, T. & Fluk, E. J.** Preparation and Mossbauer spectroscopic characterization of ultrafine iron oxide particles. *J. Mater. Sci. Lett.* 15: 1237-1239 (1996).
42. **Veintenillas-Verdaguer, S., Morales, M.P. & Serna, C.J.** Continuous production of gamma Fe₂O₃ ultrafine powders by laser pyrolysis. *Materials Lett.* 35, 227-231 (1998).

ES 2 301 296 A1

43. **Vo-Dinh**, T. Surface-enhanced Raman spectroscopy using metallic nanostructures. *Trends in Anal. Chem.* 17: 557-582 (1998).

5 44. **Wagner**, J., **Autenrieth**, T. & **Hempelmann**, R. Core shell particles consisting of cobalt ferrite and silica as model ferrofluids [CoFe₂O₄-SiO₂ core shell particles]. *J. of Magnetism and Magnetic Materials* 252: 4-6 (2002).

10 45. **Wang** J, **Nielsen** PE, **Jiang** M, **Cai** X, **Fernandes** JR, **Grant** DH, **Ozsoz** M, **Beglieter** A, **Mowat** M. Mismatch-sensitive hybridization detection by peptide nucleic acids immobilized on a quartz crystal microbalance. *Anal Chem.* 69: 5200-5202 (1997).

10 46. **Wang**, J., **Palecek**, E., **Nielsen**, P.E., **Rivas**, G., **Cai**, X., **Shiraishi**, H., **Dontha**, N., **Luo**, D., **Farias**, P.A.M. Peptide Nucleic Acid Probes for Sequence-Specific DNA Biosensors. *J. Am. Chem. Soc.* 118: 7667-7670 (1996).

15 47. **Watson**, J.D. & **Crick**, H.D. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171: 737-738 (1953).

48. **Wittung**, P., **Nielsen**, P. E., **Buchardt**, O., **Egholm**, M. & **Norden**, B. DNA-like double helix formed by peptide nucleic acid. *Nature* 368: 561-563 (1994).

20 49. **Yeni**, P.G., **Hammer**, S.M., **Carpenter**, C.C., **Cooper**, D.A., **Fischl**, M.A., **Gatell**, J.M., **Gazzard**, B.G., **Hirsch**, M.S., **Jacobsen**, D.M., **Katzenstein**, D.A., **Montaner**, J.S., **Richman**, D.D., **Saag**, M.S., **Schechter**, M., **Schooley**, R.T., **Thompson**, M.A., **Vella**, S. & **Volberding**, P.A. Antiretroviral treatment for adult HIV infection in 2002: updated recommendations of the International AIDS Society-USA Panel. *JAMA* 288, 222-235 (2002).

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Nanopartícula biosensora que comprende:

- a. Una nanopartícula magnética
- b. Una capa de sílice,
- c. Una capa o varias capas externas metálicas que pueden ser de distinta naturaleza y depositadas con distinta alternancia, e inmovilizada en su superficie externa
- d. Una capa de moléculas biosensoras orgánicas o inorgánicas, sintéticas o de origen natural con capacidad de unirse a biomoléculas

2. Nanopartícula biosensora de la reivindicación 1, donde:

- a. El espesor del núcleo magnético presenta un tamaño mínimo de 4 nm de diámetro y máximo de 30 nm de diámetro
- b. El espesor de la capa de sílice oscila entre un mínimo de 1 nm de espesor y un máximo de 20 nm de espesor
- c. El espesor de la capa metálica oscila entre un mínimo de 1 nm de espesor y un máximo de 200 nm de espesor.

3. Nanopartícula biosensora según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 donde el núcleo magnético comprende uno o cualquier combinación de los siguientes grupos:

- a. óxido de hierro
- b. óxido de hierro cobalto
- c. materiales magnéticos no óxidos

4. Nanopartícula biosensora según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 donde la capa externa metálica comprende uno de los siguientes metales: oro, plata, cobre, platino o una aleación formada por varios o todos estos metales.

5. Nanopartícula biosensora según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 donde las moléculas biosensoras comprenden una o varias moléculas seleccionadas de los siguientes conjuntos:

- a. Biomoléculas naturales
- b. Biomoléculas naturales obtenidas por procedimientos de selección *in vitro*
- c. Biomoléculas artificiales

6. Nanopartícula biosensora según la reivindicación 5 donde las biomoléculas naturales obtenidas por procedimientos de selección *in vitro* son aptámeros, ribozimas o aptazimas.

7. Nanopartícula biosensora según la reivindicación 5 donde las biomoléculas artificiales son ácidos nucleicos peptídicos (PNAs).

8. Nanopartícula biosensora según la reivindicación 5 donde las biomoléculas artificiales son anticuerpos artificiales, anticuerpos recombinantes o minianticuerpos.

9. Nanopartícula biosensora según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 donde:

- a. La nanopartícula magnética es ferrita de cobalto
- b. La capa de sílice está funcionalizada con grupos amino o grupos tiol
- c. La capa metálica es oro o una capa de plata y sucesivamente otra de oro.
- d. La biomolécula inmovilizada es un PNA modificado en uno de sus extremos, consistiendo dicha modificación en la inserción de un grupo tiol en dicho extremo.

10. Procedimiento de obtención de la nanopartícula biosensora de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 que comprende las siguientes etapas:

ES 2 301 296 A1

- a. Preparación de un coloide de partículas magnéticas de entre 4 y 30 nm de tamaño
- b. Condicionamiento del coloide para que sea estable a pHs básicos (mayores de pH=7)
- 5 c. Recubrimiento de las nanopartículas coloidales en medio básico con una capa de sílice de un espesor entre 1 y 20 nm.
- d. Funcionalización química de la superficie de las nanopartículas obtenidas en c) para introducir grupos funcionales
- 10 e. Recubrimiento de las nanopartículas magnéticas funcionalizadas de d) con una capa metálica
- f. Inmovilización de la molécula biosensora sobre la superficie de la nanopartícula resultante de e.
- 15 11. Procedimiento de obtención de la nanopartícula biosensora según la reivindicación anterior donde el recubrimiento de la nanopartículas magnéticas funcionalizadas de d) con una capa metálica comprende las siguientes etapas:
 - a. Síntesis de nanopartículas de metal estables en agua, con un diámetro de entre 3 y 20 nm
 - 20 b. Quimisorción de las nanopartículas de metal sobre las nanopartículas resultantes de d)
 - c. Crecimiento sobre el producto obtenido en b) de una capa metálica, formando una capa de un espesor controlado entre 1 y 200 nm.
- 25 12. Procedimiento de obtención de la nanopartícula biosensora de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 donde se realiza una extensión de la etapa c) de la reivindicación 10, promoviendo un crecimiento adicional de la capa de sílice con tetraetoxi ortosilicato.
- 30 13. Uso de la nanopartícula biosensora según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para la elaboración de un microarray o micromatriz en el que cada punto está constituido por una nanopartícula biosensora.
- 35 14. Uso de la nanopartícula biosensora según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para al menos una de las siguientes aplicaciones:
 - a. Detección de patógenos de tipo viral, bacteriano, fúngico o protozoario
 - b. Caracterización de mutaciones o polimorfismos genéticos (SNPs) en dichos agentes que pueden hacerlos resistentes a fármacos o facilitar el escape de vacunas.
 - 40 c. Caracterización de mutaciones o SNPs en genes humanos o animales, relacionados con enfermedades o con propensión a ellas.
 - d. Detección de marcadores tumorales concretos e. Detección de microorganismos concretos, patógenos o contaminantes en alimentos
 - 45 f. Detección de la presencia de organismos manipulados genéticamente (OMG) o transgénicos en alimentos
 - g. Detección de microorganismos o toxinas contaminantes del medio ambiente.
- 50 15. Método para la determinación de la hibridación o unión de una molécula biológica a la biomolécula orgánica inmovilizada a una nanopartícula biosensora de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende las siguientes etapas:
 - a. Reacción de la nanopartícula biosensora de la invención con una muestra susceptible de contener la molécula biológica candidata.
 - 55 b. Captura de las nanopartículas biosensoras por sedimentación magnética
 - c. Determinación de la hibridación ocurrida en la etapa a)
 - 60 d. Deducción de la existencia de la molécula biológica candidata en la muestra susceptible de contenerla
 - e. Opcionalmente, cuantificación de la concentración de la molécula biológica candidata en la muestra.
- 65 16. Método para la determinación de la hibridación según la reivindicación anterior que se lleve a cabo mediante detección espectroscópica.

ES 2 301 296 A1

17. Método según la reivindicación anterior donde el método de detección espectroscópica utilizado es mediante radiación ultravioleta.

5 18. Método según la reivindicación 16 donde el método de detección espectroscópica utilizado es mediante radiación visible.

19. Método según la reivindicación 16 donde el método de detección espectroscópica utilizado es mediante radiación infrarroja.

10 20. Método según la reivindicación 16 donde el método de detección espectroscópica utilizado es mediante espectroscopia Raman.

15 21. Método según la reivindicación 19 donde la detección espectroscópica de la molécula biológica hibridada o unida a la nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 se lleva a cabo mediante el uso de un equipo infrarrojo, midiendo la absorción de las nanopartículas por transmisión o reflexión atenuada o en la modalidad de ángulo rasante.

20 22. Método según la reivindicación 21 donde la medida de la absorción de las nanopartículas por transmisión integra la técnica de la Transformada de Fourier para la resolución de espectros y utiliza ventanas de transmisión de fluoruro de bario o fluoruro de calcio u otro tipo de ventana transparente a la radiación infrarroja.

23. Método según la reivindicación anterior donde las ventanas transparentes a la radiación infrarroja pueden adoptar una configuración en flujo.

25 24. Método para la detección de una sonda electroquímica que se lleve a cabo mediante técnicas electroquímicas lineales, cíclicas o de pulso que es atraída electrostáticamente por las cargas negativas portadas por las cadenas de DNA o RNA hibridadas con cadenas neutras de PNA inmovilizadas sobre la nanopartícula biosensora de cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

30 25. Método según la reivindicación anterior donde la sonda electroquímica es una molécula catiónica en su estado oxidado o neutra o aniónica en su estado reducido.

35 26. Método según la reivindicación anterior donde la sonda electroquímica en su estado neutro o cargado negativamente puede ser reoxidada catalíticamente a su estado de carga positiva por un enzima u otro catalizador.

27. Método según la reivindicación anterior donde el catalizador obtiene electrones de la sonda electroquímica y los transfiere a un reactivo adecuado.

40 28. Método según la reivindicación 26 donde la enzima es una peroxidasa.

29. Método según la reivindicación 27 donde el reactivo es peróxido de hidrógeno.

30. Método según la reivindicación 26 donde la sonda es la molécula tionina.

45

50

55

60

65

FIG. 1

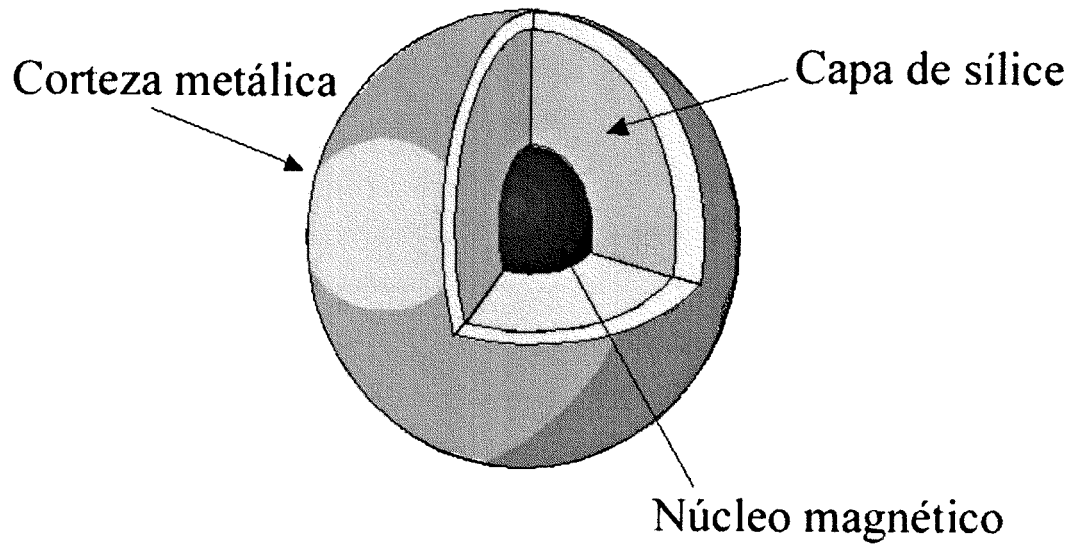


FIG. 2



T0002
PM4203 200.0KV X120K 50nm

FIG. 3

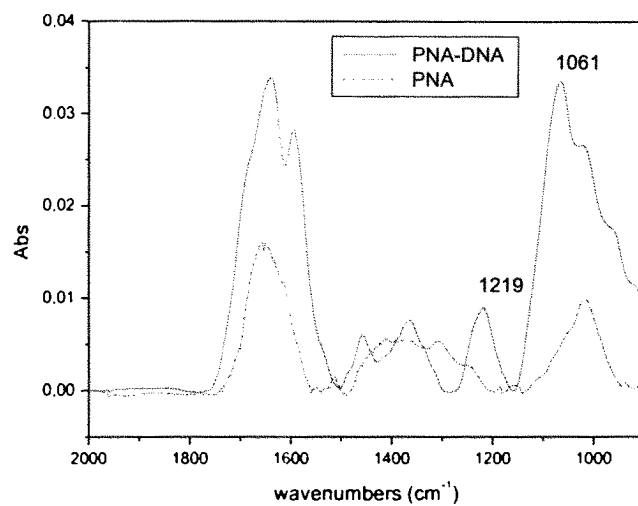


FIG. 4

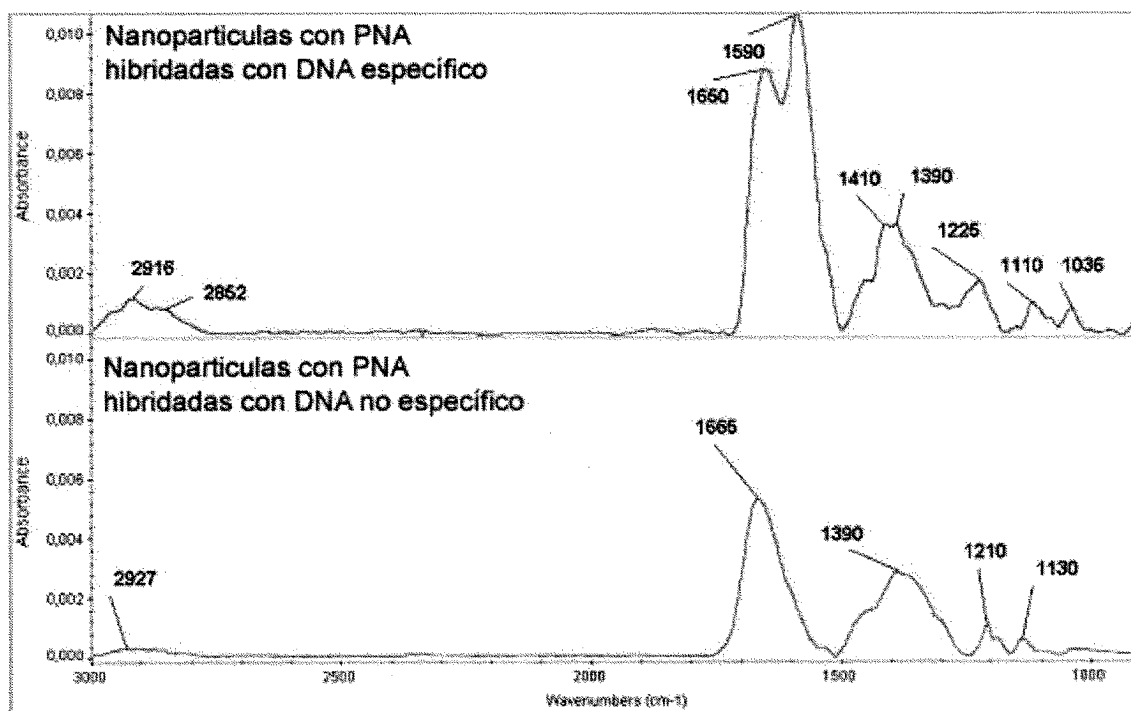
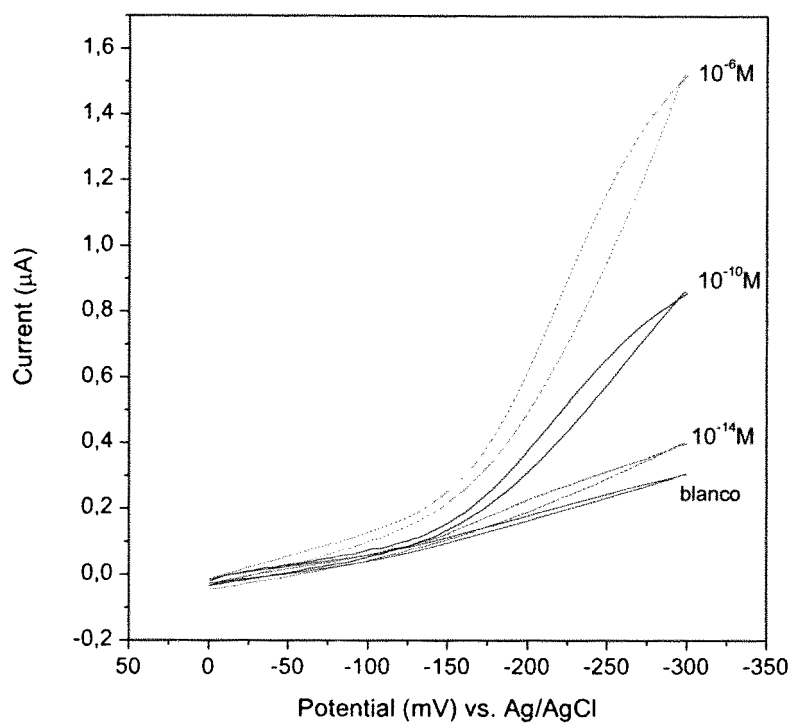


FIG. 5



ES 2 301 296 A1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas
- 5 <120> Nanopartícula Biosensora, Procedimiento de Elaboración y sus Aplicaciones
- <130> ES
- <160> 8
- 10 <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- 15 <211> 11
- <212> bases nucleotidicas
- <213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1)..(11)
- 25 <223> La secuencia corresponde a las 11 bases nucleotidicas situadas a partir de la Cys-O-O- situadas sobre el esqueleto del PNA.
- <400> 1
- 30 aatccccgca t 11
- <210> 2
- <211> 9
- 35 <212> Bases nucleotidicas
- <213> Secuencia Artificial
- 40 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1)..(9)
- 45 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1)..(9)
- 50 <223> La secuencia corresponde a las 9 bases nucleotidicas situadas a partir de la Cys-O-O- situadas sobre el esqueleto del PNA.
- <400> 2
- 55 gccatctct 9
- <210> 3
- <211> 31
- 60 <212> DNA
- <213> FMDV
- <220>
- 65 <221> misc_feature
- <222> (1)..(31)
- <223> Corresponde con la secuencia salvaje de FMDV

ES 2 301 296 A1

<400> 3

ccgccagtgc atgcggggat ttggctcacc t

31

5

<210> 4

<211> 31

<212> DNA

10 <213> FMDV

<220>

<221> misc_feature

15 <222> (1)..(31)

<223> Corresponde con la secuencia mutante de FMDV

<400> 4

20

ccgccagtgc atgcgaggat ttggctcacc t

31

<210> 5

25

<211> 31

<212> DNA

<213> HIV

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(31)

35

<400> 5

gaaatttga cagagatgga aaaggaaggg a

31

40

<210> 6

<211> 31

<212> DNA

45

<213> HIV

<220>

<221> misc_feature

50 <222> (1)..(31)

<400> 6

55

gaaatttga cagagttgga aaaggaaggg a

31

<210> 7

<211> 20

60

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

65 <221> misc_feature

<222> (1)..(20)

ES 2 301 296 A1

<400> 7

ttagggcgt aagatggc

20

5

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> misc_feature

15 <222> (1)..(20)

<400> 8

20 cggtagagaa tgcggggatt

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 301 296

② Nº de solicitud: 200502269

③ Fecha de presentación de la solicitud: **16.09.2005**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **G01N 33/52** (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SPASOVA, M., SALGUEIRIÑO-MACEIRA, V., SCHLACHTER, A. et al. Magnetic and optical tunable microspheres with a magnetite/gold nanoparticle shell. Journal of Materials Chemistry. 2005, Vol. 15, Nº 21, páginas 2095-2098. ISSN 0959-9428. Publicado en línea 13.04.2005.	1-4,15-30
A	WO 2005015213 A1 (TSINGHUA UNIVERSITY & CAPITAL BIOCHIP COMPANY LTD.) 17.02.2005, todo el documento.	1-18,24-30
A	US 5445971 A (ROHR, T. E.) 29.08.1995, columna 5, línea 14 - columna 6, línea 22; columna 9, línea 57 - columna 14, línea 45.	1-8,13-30
A	US 2005048570 A1 (WEBER, A., SCHIESTEL, T., TOVAR, G., et al.) 03.03.2005, páginas 3-8; ejemplos 3,15,16,19,23.	1-30
A	EP 1138743 A1 (NITTETSU MINING CO., LTD. & NAKATSUKA, KATSUTO) 04.10.2001, ejemplos 3,7,11.	1-4,10-12, 16-18
A	LI, J., XUE, M., WANG, H., et al. Amplifying the electrical hybridization signals of DNA array by multilayer assembly of Au nanoparticle probes. The Analyst. Julio 2003, Vol. 128, Nº 7, páginas 917-923. ISSN 0003-2654.	1,9,13-16, 19-30

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 15.04.2008	Examinador E. Relaño Reyes	Página 1/1
---	--------------------------------------	----------------------