

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 148**

21 Número de solicitud: 201031937

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 21/17 (2006.01)

G01N 21/17 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

23.12.2010

43 Fecha de publicación de la solicitud:

19.07.2012

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

16.10.2012

Fecha de la concesión:

02.12.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

13.12.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (100.0%)
Edificio EMPRENDIA - Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**RIGUERA VEGA, Ricardo;
MUÑOZ VALENTÍN, Eva María;
LÓPEZ-RIVADULLA, Manuel y
QUINTELA JORGE, Oscar**

74 Agente/Representante:

TORRENTE VILASÁNCHEZ, Susana

54 Título: **SUPERFICIE INMUNOSENSORA PARA LA DETECCIÓN DIRECTA DE BENZOILECGONINA MEDIANTE RESONANCIA DE PLASMÓN SUPERFICIAL.**

57 Resumen:

Superficie inmunosensora para la detección directa de benzoilecgonina mediante resonancia de plasmón superficial.

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

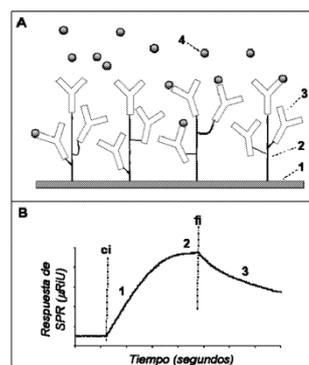


Figura 1

ES 2 385 148 B2

DESCRIPCIÓN

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

Campo técnico de la Invención

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

Antecedentes de la invención

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Descripción de la invención

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

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

5

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

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

15

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

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

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

25

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

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

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

Breve descripción de las figuras

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

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

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

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

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

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

Descripción detallada de la invención

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

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

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

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

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

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

en tiempo real la benzoilecgonina y cuantificarla. Además permite la reutilización de la superficie sensora. Es posible conseguir una inmovilización estable, por ejemplo, mediante enlaces covalentes entre el polímero y el anticuerpo. Así, en una realización particular, los anticuerpos anti-benzoilecgonina se unen al polímero mediante enlaces covalentes. En una
5 realización más particular, los enlaces covalentes se seleccionan entre enlace amida y enlace tipo carbonilo-hidrazina. El enlace amida se puede formar entre grupos carboxílicos del polímero y grupos amino presentes en amino ácidos lisina del anticuerpo. En una realización preferida de la invención, el enlace covalente entre el polímero y el anticuerpo es un enlace tipo carbonilo-hidrazina. El enlace carbonilo-hidrazina se puede formar entre
10 grupos carboxílicos del polímero modificados mediante transformaciones químicas a grupos hidrazina y grupos hidroxilo del anticuerpo, modificados mediante transformaciones químicas a grupos aldehído. Se entiende por “polímero modificado” aquel polímero intermedio obtenido mediante transformaciones químicas a partir de un polímero carboxilado como las que se recogen en Homola, J., 2008. Chem Rev. 108(2), 462-493. El
15 enlace tipo carbonilo-hidrazina se puede formar entre grupos carboxílicos del polímero y grupos hidroxilo de cis-dioles presentes en carbohidratos del anticuerpo. El enlace tipo carbonilo-hidrazina permite una inmovilización dirigida ya que los cis-dioles se encuentran en una región específica del anticuerpo (región Fc) que no participa en la interacción con benzoilecgonina. De esta manera, todos los anticuerpos se inmovilizan en una orientación
20 adecuada donde se mantiene la actividad de sus centros activos. En una realización particular el polímero se selecciona entre un polímero policarboxilado y un polímero policarboxilado modificado. Estos polímeros pueden estar ramificados y así los grupos carboxílicos o carboxílicos modificados pueden tener diferentes disposiciones en el espacio.

25 El término “inmovilización efectiva” se refiere a la inmovilización de un número suficiente de anticuerpos activos en la superficie; este número debe permitir la obtención de una señal tres veces superior a la sensibilidad del detector (que viene dada por el ruido de fondo) cuando se monitoriza la asociación de benzoilecgonina en una muestra de concentración igual al límite inferior de detección determinado por el anticuerpo. La cantidad de
30 anticuerpo que es posible inmovilizar está relacionada con la capacidad de inmovilización del polímero. En una realización particular, el polímero se selecciona entre polímeros con capacidad de inmovilizar una cantidad de anticuerpos anti-benzoilecgonina comprendida entre 730 pg/mm² y 73000 pg/mm². Más preferiblemente la cantidad de anticuerpos anti-benzoilecgonina inmovilizados está comprendida entre 2190 pg/mm² y 58400 pg/mm². Aún
35 más preferiblemente la cantidad de anticuerpos anti-benzoilecgonina inmovilizados está

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

volumen reducido de muestra, por ejemplo es factible utilizar 100 μL ; (7) se trata de un dispositivo reutilizable ya que la superficie inmunosensora puede regenerarse para el análisis consecutivo de muestras; (8) ofrece ventajas tecnológicas como su fácil miniaturización, posibilidad de automatización y la realización de ensayos en paralelo; (10) versatilidad en el diseño del dispositivo inmunosensor ya que la elección del anticuerpo determina el rango de concentración de benzoilecgonina que puede medir. Así, es posible diseñar una superficie inmunosensora multicanal donde se incorporan anticuerpos con diferente afinidad por la benzoilecgonina y que cubren distintos rangos de concentración, como se describió anteriormente.

5
10 En otro aspecto, la invención se dirige a un método de detección de benzoilecgonina que comprende:

i. poner en contacto la muestra problema con la superficie inmunosensora como se describió anteriormente,

15 ii. detectar la señal de SPR durante la etapa de asociación y la etapa de disociación.

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

20
25 Para la cuantificación de benzoilecgonina en una muestra problema, la invención proporciona dos métodos alternativos basados en las etapas de asociación y de disociación.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ejemplo de realización de la invención

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ejemplo 2. Detección directa de benzoilecgonina.

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

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

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

5

Ejemplo 3. Regeneración de la superficie inmunosensora.

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

10

Ejemplo 4. Obtención de las curvas de calibrado.

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

15

20

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

30

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

5 - Se realizan inyecciones de muestras de benzoilecgonina de concentración conocida en fluido oral, siguiendo el procedimiento experimental descrito anteriormente, que se prepararon según la siguiente descripción: 1 ml de fluido oral se diluye en 3 ml de disolución tamponada HEPES*. A continuación, la muestra se filtra en dispositivos Amicon ultra (MWCO 3KDa), centrifugando a 6000 rpm y 25 ° C durante 40 min. En 1 ml
 10 de la muestra filtrada se añade un volumen de disolución madre de benzoilecgonina (1 mg/ml en metanol) para obtener una concentración final de benzoilecgonina igual a 3,46 µM. A partir de esta disolución se prepararan otras de menor concentración por dilución con los 3 ml restantes de muestra de fluido oral sin dopar. Bajo estas condiciones experimentales ambos inmunosensores detectan una concentración 13,5 nM (4 µg/l) de
 15 benzoilecgonina en la muestra de fluido oral.

- Se realizan ciclos consecutivos de inyección-regeneración sobre las dos superficies inmunosensoras, realizando inyecciones de benzoilecgonina en HEPES* o fluido oral y manteniendo una temperatura constante de 25 °C. Bajo estas condiciones experimentales el
 20 inmunosensor I que comprende la superficie inmunosensora I mantiene su actividad durante 4 días y un número total de 54 ciclos de inyección-regeneración. El inmunosensor II que comprende la superficie inmunosensora II mantiene su actividad durante 10 días y un número total de 70 ciclos de inyección-regeneración.

25 - La reproducibilidad intra-ensayo se verifica mediante el análisis de muestras por duplicado donde el valor promedio de coeficiente de variación calculado entre valores correspondientes a la misma concentración es de 8,4 % y 10,9 % para las superficies inmunosensoras I y II, respectivamente. Estos valores son satisfactorios y se encuentran dentro del rango de valores de coeficiente de variación calculados en la determinación de
 30 cocaína mediante cromatografía líquida en combinación con espectrometría de masas (Concheiro, M., Gray, T.R., Shakleya, D.M., Huestis, M.A., 2010. Anal Bioanal Chem. 398(2), 915-924).

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

10

REIVINDICACIONES

1. Superficie inmunosensora que comprende un soporte recubierto por una capa metálica a la que se une un polímero que inmoviliza al menos un anticuerpo anti-benzoilecgonina, donde el polímero se selecciona entre polímeros con capacidad de inmovilizar una cantidad de anticuerpos anti-benzoilecgonina comprendida entre 730 pg/mm² y 73000 pg/mm².
2. Superficie inmunosensora, según la reivindicación 1, que comprende entre dos y seis anticuerpos anti-benzoilecgonina caracterizados por presentar diferente afinidad por benzoilecgonina.
3. Superficie inmunosensora, según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde los anticuerpos anti-benzoilecgonina son anticuerpos monoclonales.
4. Superficie inmunosensora, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los anticuerpos se unen al polímero mediante enlaces covalentes tipo amida o tipo carbonilo-hidrazina.
5. Superficie inmunosensora, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el polímero se selecciona entre un polímero policarboxilado y un polímero policarboxilado modificado.
6. Inmunosensor que comprende:
 - a. una superficie inmunosensora como se describió en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 5, y
 - b. un transductor basado en el fenómeno óptico de la resonancia de plasmón superficial (SPR).
7. Aparato para la detección y cuantificación directa de benzoilecgonina que comprende un inmunosensor como se describió en la reivindicación 6 y un dispositivo o instrumento para procesar o acondicionar la señal recibida durante la etapa de asociación o de disociación.
8. Aparato, según la reivindicación 7, donde además comprende un dispositivo para realizar un cálculo.
9. Aparato, según cualquiera de las reivindicaciones de 7 a 8, donde el inmunosensor está miniaturizado y el aparato es portátil.

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

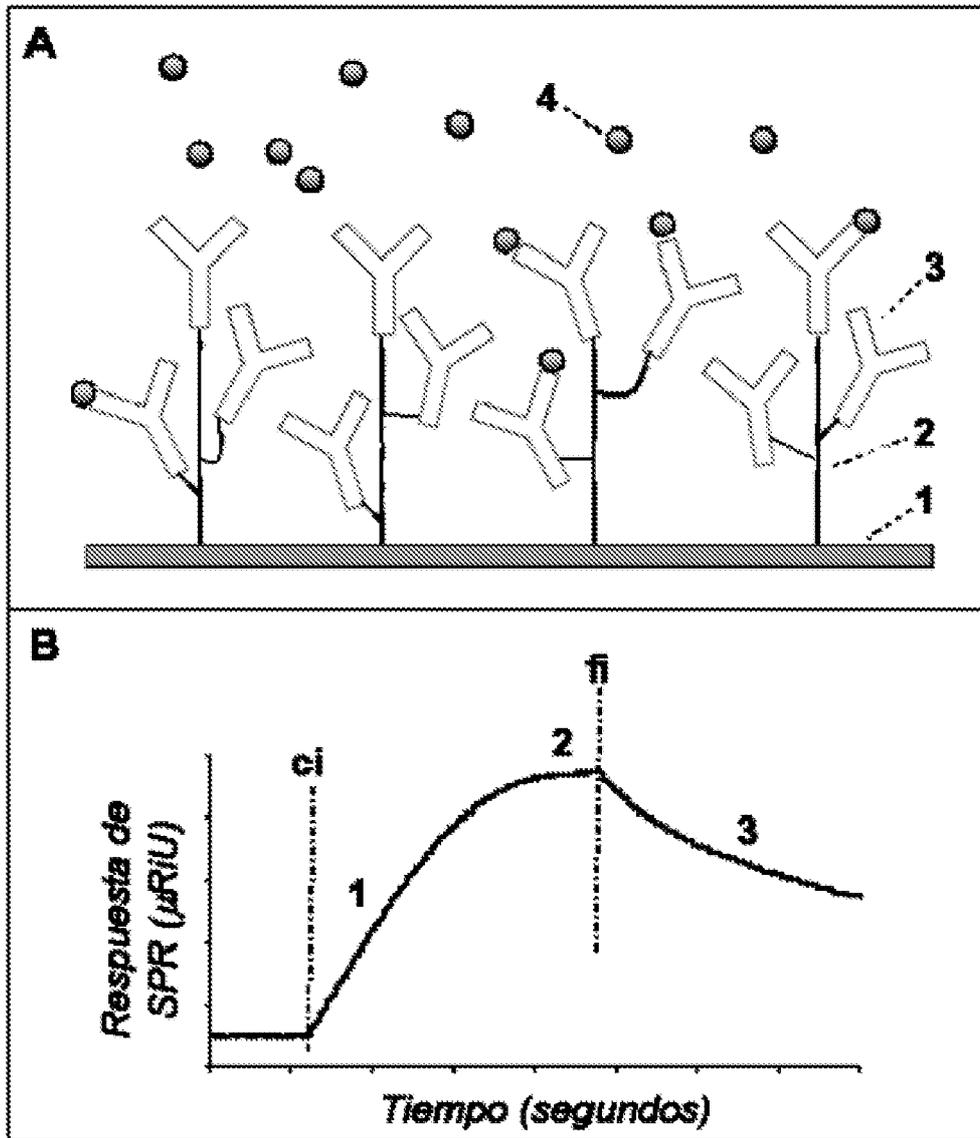


Figura 1

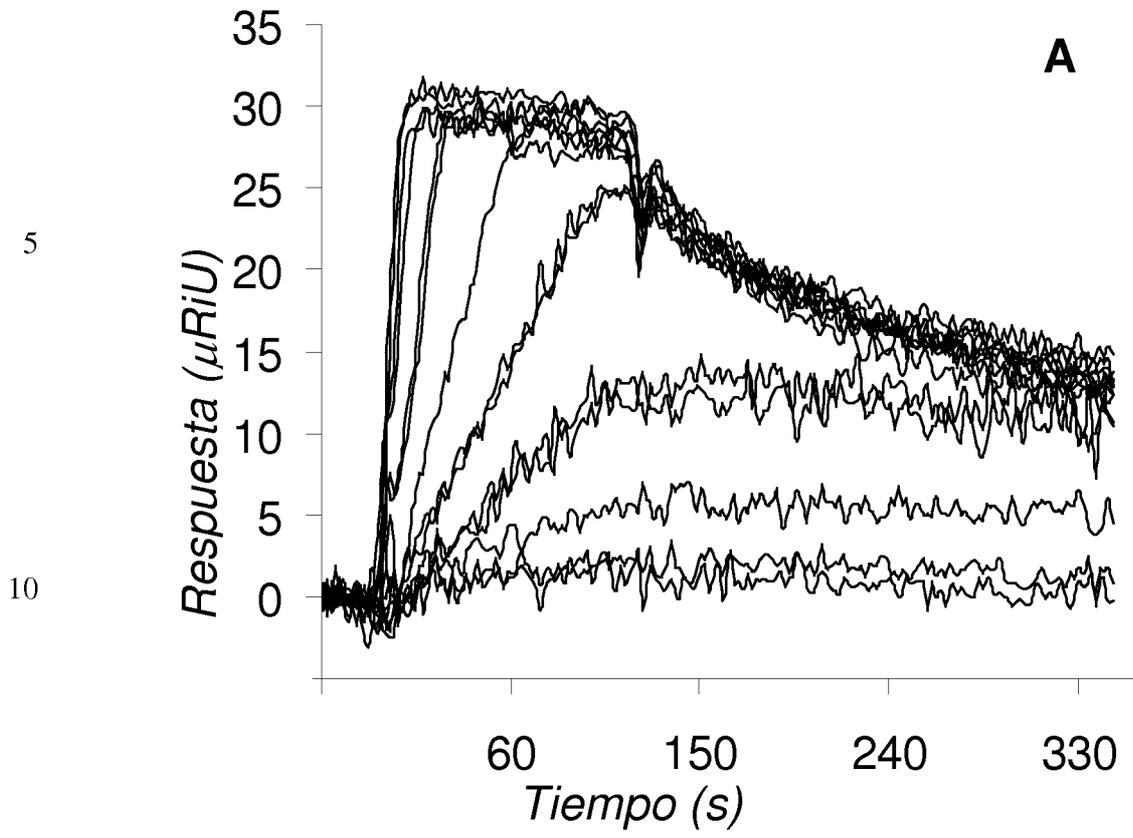


Figura 2A

15

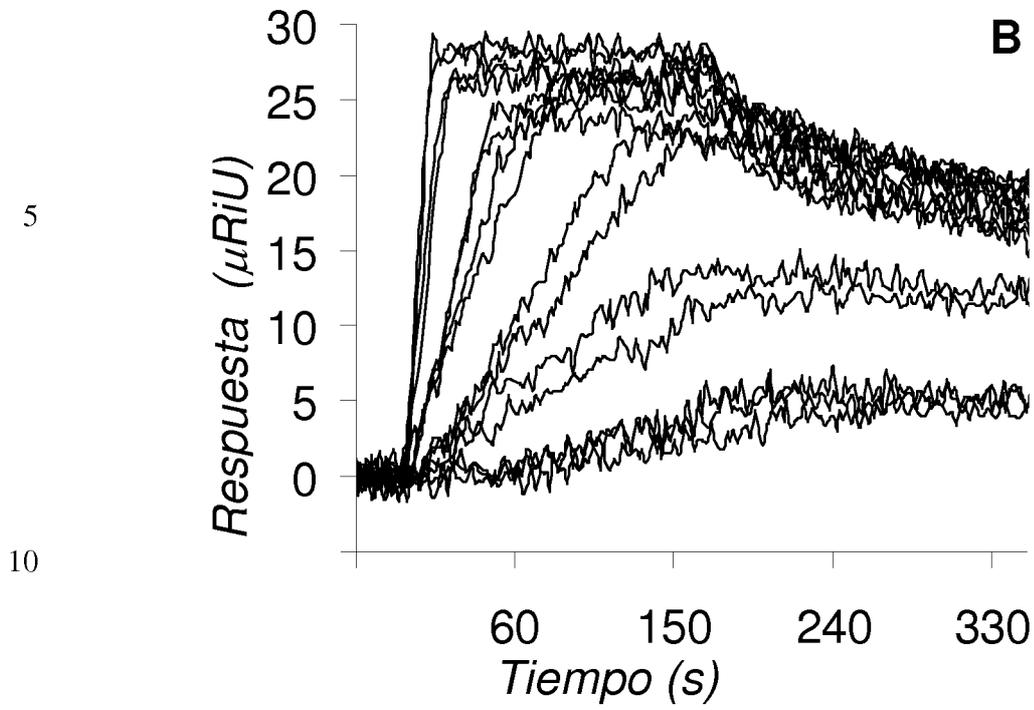


Figura 2B

15

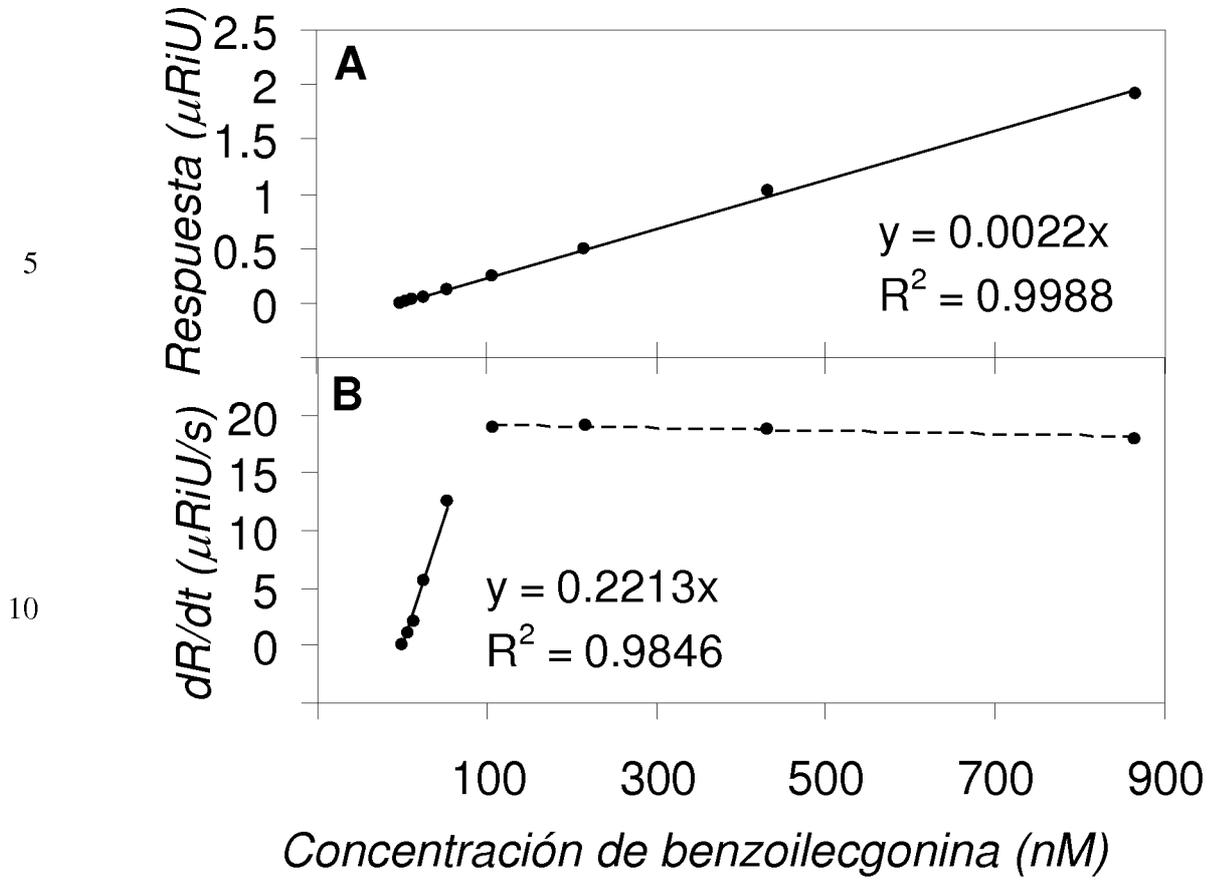


Figura 3

15

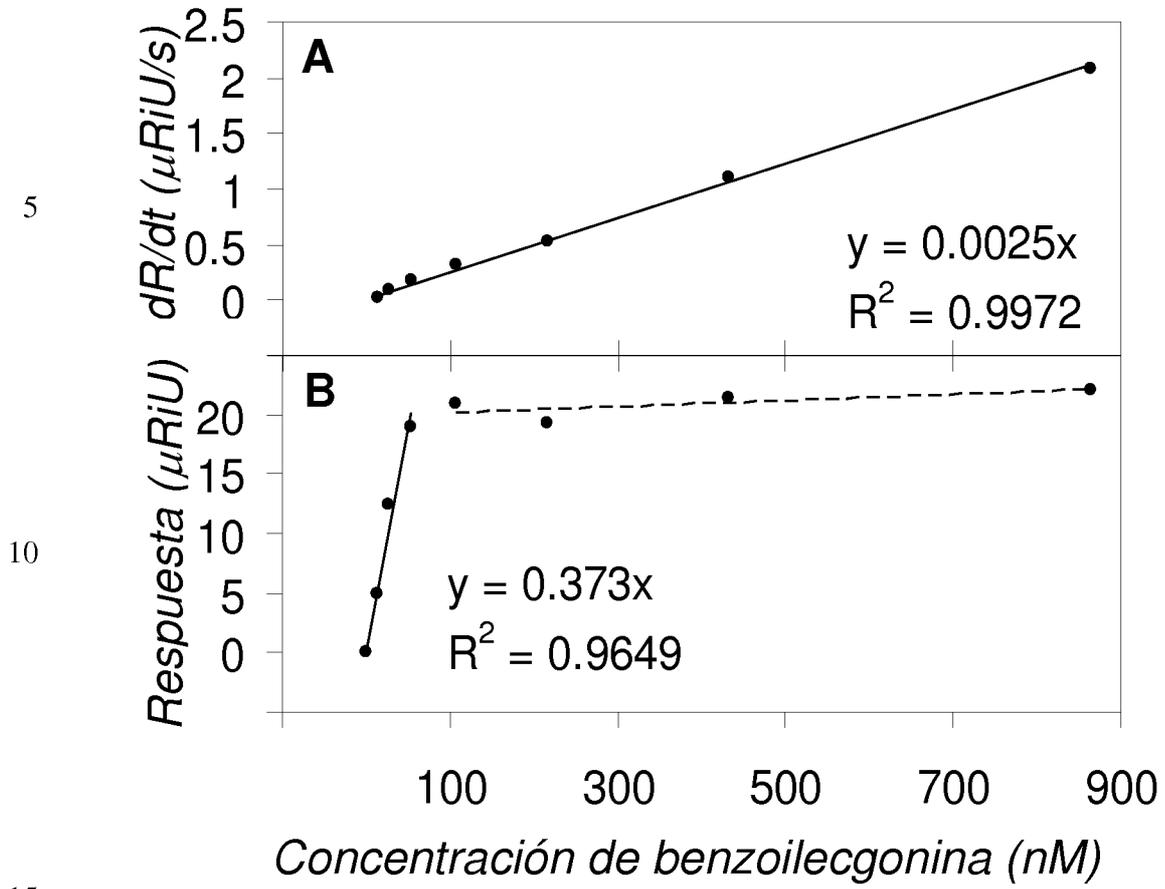


Figura 4

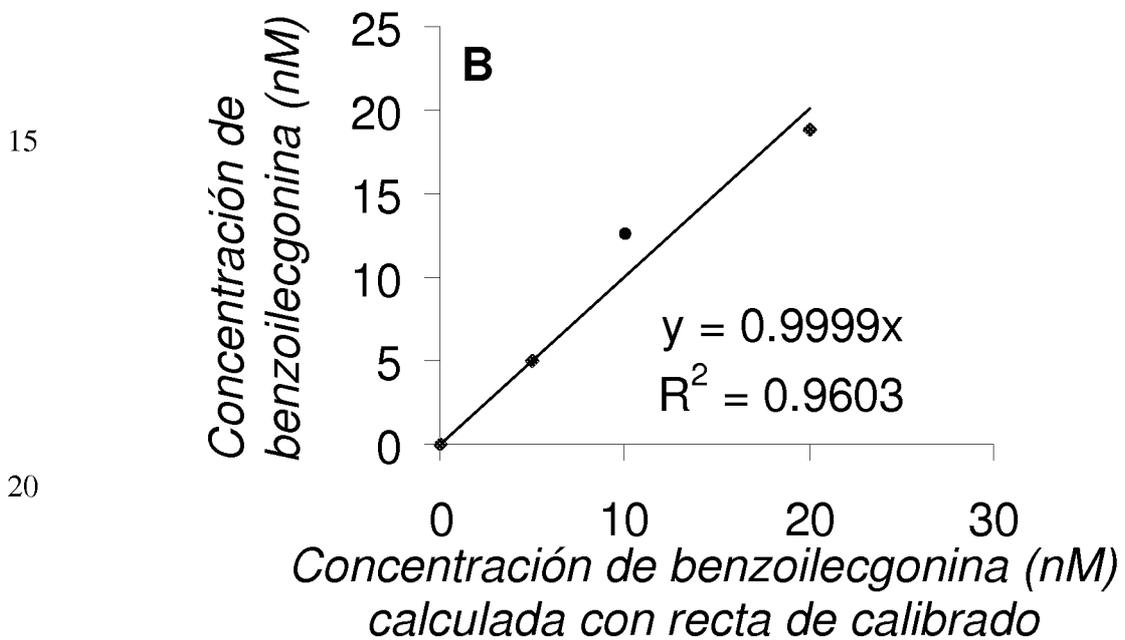
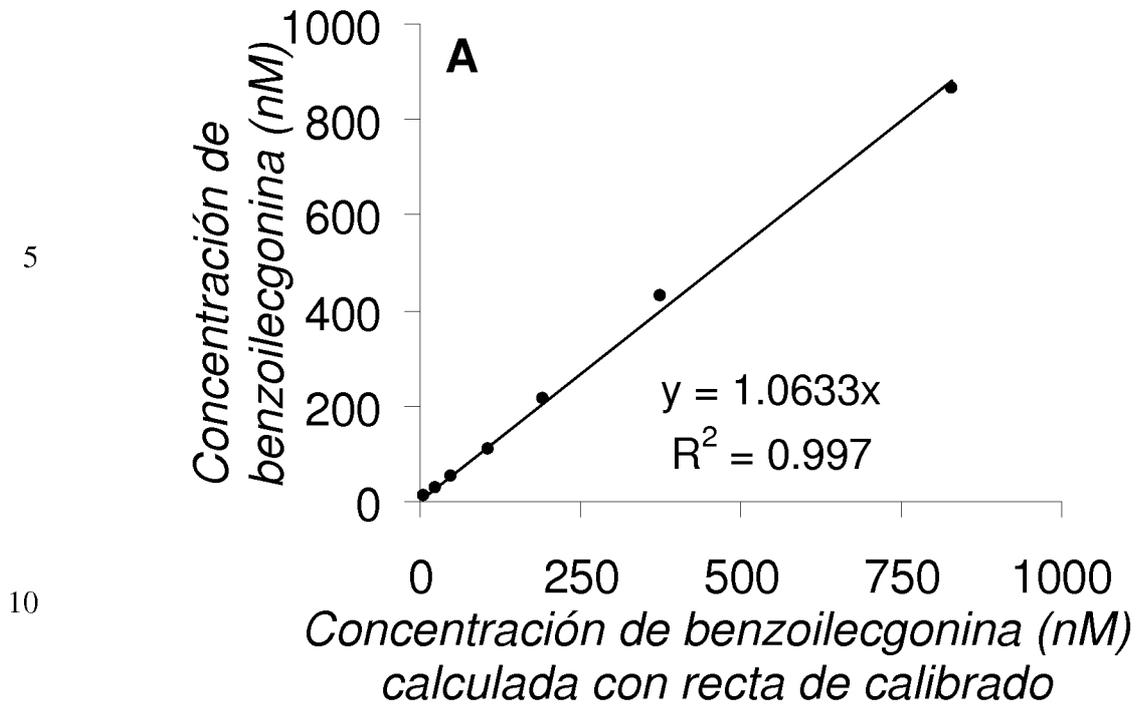


Figura 5



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031937

②② Fecha de presentación de la solicitud: 23.12.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	GUARDADO-CALVO, P., MUÑOZ, E.M., LLAMAS-SAIZ, L. et al. Crystallographic Structure of Porcine Adenovirus Type 4 Fiber Head and Galectin Domains. Journal of Virology. Octubre 2010. Vol 84, Nº 20, páginas 10558-10568. ISSN 1098-5514, en especial "Materials and Methods" y páginas 10565-10566.	1-18
Y	SANLES-SOBRIDO, M., RODRIGUEZ-LORENZO, L., LORENZO-ABALDE, S. et al. Label-free SERS detection of relevant bioanalytes on silver-coated carbon nanotubes: The case of cocaine. Nanoscale. 13.08.2009. Vol 1, Nº 1 páginas 153-158. ISSN 2040-3372, en especial páginas 156 y 157.	1-18
A	US 2005058850 A1 (TOSHIKI, K., TOSHIHIDE, E.) 21.07.2005	1-18
A	US 20030113939 A1 (GAUGLITZ, G., BRECHT, A., PIEHLER, J.) 19.06.2003	1-18
A	JOHNSON, B., LÖFAS, S., LINDQUIST, G. Immobilization of Proteins to a Carboxymethyl-dextran-Modified Gold surface for Biospecific Interaction Analysis in Surface Plasmon Resonance Sensors. Analytical Biochemistry. 01.11.1991, Vol 198, Nº 2, páginas 268-277. ISSN 0003-2697, todo el documento.	1-18
A	JP2005189062 (FUJI FOTO FILM CO LTD) 14.07.2005, (resumen) Base de datos WPI Thomson Scientific, Londres [en línea] Recuperado de: EPOQUE. Nº de acceso 2005-525097 [54].	1-18
A	SPR sensor chips and disc. Xantec bioanalytics. [en línea]. 14.09.2007. [recuperado el 30.06.2007]. Recuperado de internet: URL< http://web.archive.org/web/20070914202516/http://www.xantec.com/new/index.php?content=7&sub=8&haupt=6 >, todo el documento.	1-7
A	MULLETT, W.M., LAI, E.P.C., YEUNG, J.M. Surface Plasmon Resonance-Based Immunoassays. Methods. Septiembre 2000. Vol 22, Nº 1, páginas 77-91, todo el documento.	1-18
A	INDYK, H. E. Optical Biosensors: Making sense of interactions. Chemistry in New Zealand. Julio 2006. Páginas 42-46.	1-18

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
30.06.2011

Examinador
A. Barrios de la Fuente

Página
1/6

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N33/543 (2006.01)

G01N21/17 (2006.01)

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

G01N

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

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

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.06.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-18	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-18	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	GUARDADO-CALVO, P., MUÑOZ, E.M., LLAMAS-SAIZ, L. et al. Crystallographic Structure of Porcine Adenovirus Type 4 Fiber Head and Galectin Domains. Journal of Virology. Octubre 2010. Vol 84, Nº 20, páginas 10558-10568. ISSN 1098-5514, en especial "Materials and methods" y páginas 10565-10566.	Octubre 2010
D02	SANLES-SOBRIDO, M., RODRIGUEZ-LORENZO, L., LORENZO-ABALDE, S. et al. Label-free SERS detection of relevant bioanalytes on silver-coated carbon nanotubes: The case of cocaine. Nanoscale. 13.08.2009. Vol 1, Nº 1 páginas 153-158. ISSN 2040-3372, en especial páginas 156 y 157.	13.08.2009
D03	US 2005058850 A1 (TOSHIKI, K., TOSHIHIDE, E.) 21.07.2005, todo el documento.	21.07.2005
D04	US 20030113939 A1 (GAUGLITZ, G., BRECHT, A., PIEHLER, J.) 19.06.2003	19.06.2003
D05	JOHNSON, B., LÖFAS, S., LINDQUIST, G. Immobilization of Proteins to a Carboxymethyl-dextran-Modified Gold surface for Biospecific Interaction Analysis in Surface Plasmon Resonance Sensors. Analytical Biochemistry. 01.11.1991. Vol 198, Nº 2, páginas 268- 277. ISSN 0003-2697, todo el documento.	01.11.1991
D06	JP2005189062 (FUJI FOTO FILM CO LTD) 14.07.2005, (resumen) Base de datos WPI Thomson Scientific, Londres [en línea] Recuperado de: EPOQUE. Nº de acceso 2005-525097 [54].	14.07.2005
D07	SPR sensor chips and disc. Xantec bioanalytics. [en línea]. 14.09.2007. [recuperado el 30.06.2007]. Recuperado de internet: URL< http://web.archive.org/web/20070914202516/http://www.xantec.com/new/index.php?content=7&sub=8&haupt=6 , todo el documento	14.09.2007
D08	MULLETT, W.M., LAI, E.P.C., YEUNG, J.M. Surface Plasmon Resonance-Based Immunoassays. Methods. Septiembre 2000. Vol 22, Nº 1, páginas 77-91, todo el documento.	Septiembre 2000
D09	INDYK, H. E. Optical Biosensors: Making sense of interactions. Chemistry in New Zealand. Julio 2006. Páginas 42-46.	Julio 2006

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

La presente solicitud tiene por objeto una superficie inmunosensora que comprende un soporte recubierto por una capa metálica a la que se une un polímero que inmoviliza al menos un anticuerpo anti-benzoilecgonina (Reivindicación 1) o entre dos y seis anticuerpos que presentan diferente afinidad por la benzoilecgonina (Reivindicación 2). El anticuerpo inmovilizado sobre la superficie es un anticuerpo monoclonal (Reivindicación 3). Los anticuerpos se unen al polímero mediante enlaces covalente tipo amida o tipo carbonilo-hidrazina (Reivindicación 4). El polímero del soporte se selecciona entre polímeros policarboxilados y policarboxilados modificados (Reivindicación 5), y presenta una capacidad de inmovilización de anticuerpos anti-benzoilecgonina comprendida entre 730 pg/mm² y 73000pg/mm² (Reivindicación 6).

Es además objeto de la presente solicitud un inmunosensor que comprende la superficie inmunosensora descrita en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un transductor basado en el fenómeno de resonancia del plasmón superficial-SPR (Reivindicación 7). Así mismo, también es objeto de esta solicitud un aparato que contiene el inmunosensor descrito en la reivindicación 7 y un dispositivo que acondiciona la señal recibida durante la etapa de asociación o disociación (Reivindicación 8). Dicho aparato comprende un dispositivo para realizar el cálculo (Reivindicación 9), está miniaturizado y es portátil (reivindicación 10).

Son también objeto de esta solicitud un kit (Reivindicación 11) y un aparato portátil (Reivindicación 12) que comprende la superficie inmunosensora.

También se reivindica en esta solicitud un método de detección de benzoilecgonina que comprende la puesta en contacto de la muestra con la superficie inmunosensora y la detección de la señal de SPR durante la etapa de asociación y disociación (Reivindicación 13) y un método de cuantificación de benzoilecgonina que comprende detectar la benzoilecgonina durante la etapa de asociación (Reivindicación 14) o disociación (Reivindicación 15) e interpolar la señal obtenida en la recta de calibrado.

Por último, esta solicitud también reivindica el uso de la superficie inmunosensora para la detección directa de benzoilecgonina (reivindicación 16) en tiempo real (reivindicación 17) en disoluciones acuosas reguladoras, en fluido oral o en mezcla de las mismas (reivindicación 18).

El documento D01 tiene por objeto un estudio sobre el *Adenovirus Porcino tipo 4*. Más concretamente se estudia la estructura de la cabeza de la fibra proteica y de los dominios galectina. Entre los experimentos que se llevan a cabo, se estudia mediante resonancia de plasmón superficial la capacidad de unión del dominio galectina a carbohidratos.

El documento D02 divulga un estudio para detectar y cuantificar benzoilecgonina mediante espectroscopía Raman de superficie mejorada (SERS).

El documento D03 divulga un biosensor que comprende una superficie metálica o una película metálica cubierta por un polímero policarboxilado hidrofóbico (polimetil metacrilato) para su uso en resonancia de plasmón superficial. Sobre este soporte se inmovilizan diferentes proteínas, tales como el anticuerpo anti IL-8 o la enzima tripsina. (ver ejemplos)

El documento D04 divulga un biosensor para la detección de reacciones de afinidad bioquímicas, por medio de técnicas ópticas. La superficie inmunosensora consta de una capa de metal o de óxido metálico sobre la que se une un polímero (polietilenglicol). Sobre este soporte se fijan diferentes proteínas, entre ellas la región Fab del anticuerpo anti-simazina. (ver ejemplos).

El documento D05 tiene por objeto un estudio relativo a la inmovilización de proteínas sobre una superficie biosensora para el análisis de interacciones bioespecíficas mediante resonancia de plasmón superficial. Se describe la inmovilización de proteínas por enlace covalente tipo amida sobre una superficie biosensora que comprende una capa metálica y un polímero policarboxilado (carboximetil dextrano). Entre las proteínas inmovilizadas se encuentran por ejemplo, la proteína A de *Staphylococcus aureus* que interacciona específicamente con anticuerpos policlonales IgG (páginas 275-276) o bien anticuerpos tales como anti α -ferroproteína o IgG1 y anti β 2-micro-globulina o IgG (ver tabla 1).

El documento D06 tiene por objeto un biosensor para su uso resonancia de plasmón superficial. La superficie biosensora comprende una superficie metálica o una película metálica a la que se une un polímero que contiene estireno. Entre sus posibles aplicaciones se señalan su uso para detectar la interacción entre biomoléculas, como reacciones inmunes o para medir o detectar sustancias, entre las que menciona la cocaína.

El documento D07 contiene información relativa a las diferentes superficies biosensoras ofertadas por una casa comercial. Incluye un listado de las diferentes superficies biosensoras disponibles, entre las que se encuentran las superficies basadas en matrices poliméricas, denominadas hidrogeles 3D. Se señala que este tipo de superficies permiten una inmovilización del ligando con una amplificación significativa de la señal y que se utilizan para la detección y determinaciones de concentración. También se menciona la existencia de hidrogeles 3D con densidad de carga negativa reducida para evitar interacciones no específicas (hidrogeles HC).

El documento D08 tiene por objeto una revisión de las técnicas de inmunoensayo llevadas a cabo por resonancia de plasmón superficial.

El documento D09 hace referencia a los biosensores ópticos, concretamente para SPR y sus diferentes aplicaciones.

NOVEDAD (Art.6 Ley 11/86)

Las reivindicaciones de la 1-18 son nuevas, en el sentido del artículo 6 de la Ley de patentes 11/86.

ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8 Ley 11/86)**Reivindicaciones 1-6:**

El documento D01 se considera el estado de la técnica más próximo a la invención. D01 divulga una superficie biosensora que comprende un soporte recubierto por una capa metálica a la que se une un polímero policarboxilado. Sobre este polímero se inmoviliza por enlace covalente, bien el dominio galectina de la fibra proteica de la cápside del *Adenovirus porcino tipo 4* o bien otra proteína, concretamente neutravidina. Para llevar a cabo la inmovilización, se activa la superficie con N-hidroxisuccinamida 0,05 M y con N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carboamida 0,2 M, y posteriormente se inyecta el dominio galectina o neutravidina en una disolución reguladora de acetato sódico 0,01 M. (Ver "*Materials and methods*"). Una vez preparadas las superficies biosensoras, se analiza mediante SPR la interacción del dominio galectina con carbohidratos (página 10565).

La diferencia principal entre la superficie inmunosensora objeto de las reivindicaciones 1-6 con D01 radica en que la proteína que se inmoviliza sobre el soporte no es un anticuerpo anti-benzoilecgonina.

D02 divulga un método óptico de detección de cocaína que se basa en la detección de benzoilecgonina. Para ello se utilizan anticuerpos monoclonales o policlonales anti-benzoilecgonina que se fijan sobre nanotubos de carbono recubiertos con plata (Ver página 157).

El soporte y el anticuerpo monoclonal anti-benzoilecgonina utilizado para la fabricación de la superficie inmunosensora descrita en el ejemplo de la presente solicitud, son idénticos a los anticipados por los documentos D01 y D02 respectivamente, siendo estos además de carácter comercial. Este tipo de soportes que comprenden una capa metálica a la que se une un polímero policarboxilado, se comercializan y utilizan frecuentemente en el estado de la técnica para fijar proteínas, entre estas, anticuerpos o antígenos que permitan su uso como superficies inmunosensoras (ver documentos D03, D04 y D05). Por estos motivos, un experto en la materia, sin el ejercicio de la actividad inventiva, utilizaría un soporte que comprendiese una capa metálica a la que se une un polímero policarboxilado, como por ejemplo, el anticipado por D01, para inmovilizar anticuerpos, entre estos, anticuerpos antibenzoilecgonina como los anticipados en D02. Teniendo en cuenta además que no se deduce de la descripción que haya sido necesario superar ninguna dificultad técnica para llevar a cabo la inmovilización de los anticuerpos sobre el soporte puesto que se recurre a métodos de inmovilización conocidos (ver D01, D03, D04), se considera que el objeto de las reivindicaciones 1,3-6 no implicaría actividad inventiva para un experto en la materia.

En lo que respecta al objeto de la reivindicación 2, la fijación sobre el soporte de anticuerpos anti-benzoilecgonina con diferentes afinidades por benzoilecgonina, se considera que no responde más que a una mera opción de diseño de la superficie inmunosensora y por lo tanto no implicaría actividad inventiva para un experto en la materia.

Reivindicaciones 7-12:

Puesto que la superficie inmunosensora objeto de las reivindicaciones 1-6 se considera que no implica actividad inventiva para un experto en la materia, el inmunosensor y el aparato objeto de las reivindicaciones 8-10 que comprenden dicha superficie, se consideran que no implican actividad inventiva, dado que el resto de los elementos que contienen (transductor para SPR, dispositivo para acondicionar la señal y dispositivo para realizar el cálculo), son elementos ampliamente conocidos en el estado de la técnica.

De la misma forma, el kit y aparato objeto de las reivindicaciones 11 y 12 se consideran que no implican actividad inventiva para un experto en la materia.

Reivindicaciones 13-15:

Dado que se considera que la superficie inmunosensora objeto de las reivindicaciones 1-6 no implica actividad inventiva, el método de detección objeto de la reivindicación 13 que se basa en el uso de dicha superficie, se considera igualmente que no implicaría actividad inventiva para un experto en la materia. Poner en contacto la muestra con la superficie inmunosensora resulta obvio y por otro lado, la técnica SPR se centra en detectar los cambios que se producen en la señal cuando el análisis objeto de la detección se une o se separa del elemento de reconocimiento fijado sobre el soporte.

En lo que respecta al método de cuantificación objeto de las reivindicaciones 14 y 15, se considera que este método se reduce básicamente al método de detección objeto de la reivindicación 13, dado que la etapa iv y vi se limitan simplemente a la interpretación de los resultados obtenidos tras la etapa de detección. En cualquier caso, el uso de curvas de calibración para interpretar las señales obtenidas tras la detección, resulta rutinario en el estado de la técnica no solamente en métodos de detección basados en SPR. (ver D07, página 43)

Reivindicaciones 16-18:

En lo que respecta a las reivindicaciones 16 y 17, y por el mismo motivo anteriormente señalado, el uso de la superficie inmunosensora según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para la detección directa y en tiempo real de benzoilecgonina se considera igualmente que no implicaría actividad inventiva para un experto en la materia.

Por último y en lo que respecta a la reivindicación 18, es conocido en el estado de la técnica que la benzoilecgonina se expresa en la saliva (ver D02, página 153) y de hecho ya se conocen en el estado de la técnica métodos de detección de cocaína donde la muestra es saliva, por lo que se considera de la misma forma, que la reivindicación 18 no implicaría actividad inventiva para un experto en la materia

En conclusión y en base a lo expuesto se considera que el objeto de las reivindicaciones 1-18 no implicaría actividad inventiva para un experto en la materia en el sentido del artículo 8.1 de la Ley de patentes 11/86.