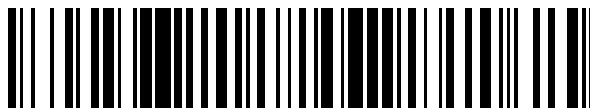


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 811 198**

21 Número de solicitud: 201930784

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)
G01N 33/544 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)
D21H 17/35 (2006.01)
D21H 19/22 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)
B82Y 30/00 (2011.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

09.09.2019

43 Fecha de publicación de la solicitud:

10.03.2021

Fecha de concesión:

08.09.2021

45 Fecha de publicación de la concesión:

15.09.2021

73 Titular/es:

UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS (50.0%)
Cra. de Valldemossa, km 7.5
07122 Palma de Mallorca (Illes Balears) ES y
FUNDACIÓ INSTITUT D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA ILLES BALEARS (50.0%)

72 Inventor/es:

DE LA RICA QUESADA, Roberto;
ALBA PATIÑO, Francy Alejandra y
ADROVER JAUME, Cristina

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

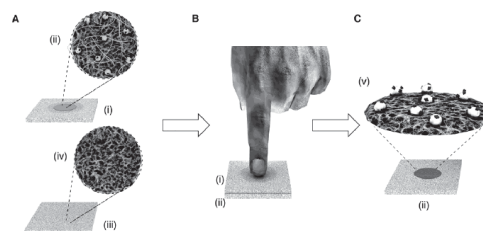
54 Título: **Procedimiento para almacenar y liberar nanopartículas decoradas con proteína en sustratos de papel**

57 Resumen:

Procedimiento para almacenar y liberar nanopartículas decoradas con proteína en sustratos de papel.

La invención se refiere a un procedimiento para almacenar nanopartículas decoradas con proteína en sustratos de papel sin unión irreversible y, particularmente, para almacenar nanopartículas decoradas con proteína dentro de sustratos de papel modificados con un polímero. La invención también se refiere a un reservorio que se obtiene mediante el proceso y que contiene nanopartículas decoradas con proteína capaces de establecer interacciones biológicas entre ligando y receptor y su uso en biosensores hechos de papel.

FIG. 1



Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 811 198 B2

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para almacenar y liberar nanopartículas decoradas con proteína en sustratos de papel

5

La invención se refiere a un procedimiento para almacenar nanopartículas decoradas con proteína en sustratos de papel sin unión irreversible y, particularmente, para almacenar nanopartículas decoradas con proteína dentro de sustratos de papel modificados con un polímero. La invención también se refiere a un reservorio que se obtiene mediante el proceso y que contiene nanopartículas decoradas con proteína capaces de establecer interacciones biológicas entre ligando y receptor y su uso en biosensores hechos de papel.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

15

El papel de filtro es el sustrato predilecto para desarrollar biosensores desechables debido a su ligero peso, bajo precio y alta disponibilidad (Reboud et al. Paper-based microfluidics for DNA diagnostics of malaria in low resource underserved rural communities. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2019, 116, 4834–4842; Roig-Sanchez et al. Nanocellulose films with multiple functional nanoparticles in confined spatial distribution Nanoscale Horiz., 2019, 4, 634–641; Tenda et al., Paper-Based Antibody Detection Devices Using Bioluminescent BRET-Switching Sensor Proteins. Angew. Chemie - Int. Ed. 2018, 57, 15369–15373). Se comercializa en un gran abanico de tamaños de poro y es de fácil modificación con biomoléculas mediante adsorción física o métodos de unión covalente (Chu et al. Paper-based chemiluminescence immunodevice with temporal controls of reagent transport technique. Sensors Actuators, B Chem. 2017, 250, 324–332; Wang et al. Simple and covalent fabrication of a paper device and its application in sensitive chemiluminescence immunoassay. Analyst 2012 137, 3821). Su matriz porosa también sirve para almacenar reactivos, como enzimas y sus sustratos, y para fabricar reservorios integrados en dispositivos analíticos basados en papel (Calabria et al. Smartphone-based enzymatic biosensor for oral fluid L-lactate detection in one minute using confined multilayer paper reflectometry. Biosens. Bioelectron. 2017, 94, 124–130). Estos reservorios han de preservar las propiedades fisicoquímicas de sus elementos reactivos durante un tiempo y, a la vez, asegurar una liberación eficiente de sus contenidos a otras áreas del papel al añadir líquidos. Las nanopartículas plasmónicas son unidades estructurales extremadamente útiles para la

20

25

30

35

fabricación de biosensores mediante el uso de un amplio repertorio de mecanismos de transducción de señales, desde la colorimetría (Russell and de la Rica Paper transducers to detect plasmon variations in colorimetric nanoparticle biosensors. *Sensors Actuators, B Chem.* 2018, 270, 327–332), pasando por la espectroscopía SERS (Catala et al. Online SERS Quantification of *Staphylococcus aureus* and the Application to Diagnostics in Human Fluids *Adv. Mater. Technol.* 2016, 1600163), hasta la fluorimetría (Ellairaja et al. Novel Pyrimidine Tagged Silver Nanoparticle Based Fluorescent Immunoassay for the Detection of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Agric. Food Chem.* 2017, 65, 1802–1812) y la electroquímica (Liang et al. An origami paper device for complete elimination of interferents in enzymatic electrochemical biosensors. *Electrochem. Commun.* 2017 82, 43–46).

Sin embargo, las nanopartículas tienden a adsorberse sobre sustratos de papel tras el secado, lo que dificulta su almacenamiento en reservorios fabricados en este material (Ruivo et al. Colorimetric detection of D-dimer in a paper-based immunodetection device. *Anal. Biochem.* 2017, 538, 5–12). Tradicionalmente, este inconveniente se ha solventado mediante la fabricación de reservorios hechos de fibra de vidrio en vez de papel convencional (Deraney et al., Multiplexed, Patterned-Paper Immunoassay for Detection of Malaria and Dengue Fever. *Anal. Chem.* 2016, 88, 6161–6165). Pero este procedimiento no es del todo compatible con ciertos diseños de biosensores, como los dispositivos analíticos basados en papel de origami. Estos biosensores están fabricados en su totalidad a base de papel con el objetivo de simplificar su fabricación y facilitar el contacto entre sus partes sin el uso de adhesivos adicionales (Liu et al. Aptamer-based origami paper analytical device for electrochemical detection of adenosine. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 2012, 51, 6925–6928; Liu and Crooks, Three-dimensional paper microfluidic devices assembled using the principles of origami. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 17564–17566).

Anteriormente, se ha utilizado PSS para evitar la floculación de nanopartículas, normalmente en forma de capas alternadas de PSS y un polímero cargado positivamente como el cloruro de polidialildimetilamonio (McLintock et al., Universal surface-enhanced Raman tags: Individual nanorods for measurements from the visible to the infrared (514–1064 nm). *ACS Nano* 2014, 8, 8600–8609). También se ha usado como apoyo para el crecimiento de nanopartículas (Cai et al., Coating sulfonated polystyrene microspheres with highly dense gold nanoparticle shell for SERS application. *Colloid Polym. Sci.* 2013, 291, 2023–2029) y para su transferencia a un

5 sustrato receptor con litografía blanda (Basarir, Fabrication of gold patterns via multilayer transfer printing and electroless plating. ACS Appl. Mater. Interfaces 2012, 4, 1324–1329). El PSS combinado con PEDOT se utiliza frecuentemente para modificar celulosa y hacerla conductora (Khan et al., Nano-gold assisted highly conducting and biocompatible bacterial cellulose-PEDOT:PSS films for biology-device interface applications. Int. J. Biol. Macromol. 2018, 107, 865–873).

10 La liberación de nanopartículas almacenadas en sustrato de papel no modificado no ha sido descrita todavía en su totalidad (Chen et al. Three-dimensional origami paper-based device for portable immunoassay applications. Lab Chip 2019, 19, 598–607) y algunos estudios han indicado su elevada ineficiencia (Ruivo et al., 2017).

15 Así pues, sería deseable descubrir un procedimiento para el almacenamiento de nanopartículas en sustratos de papel y su muy eficiente liberación bajo demanda para que así puedan ser implementadas en dispositivos analíticos en 2D y 3D fabricados únicamente con papel.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

20 Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de un reservorio que comprende de nanopartículas decoradas con proteína en sustratos de papel, el cual comprende los pasos siguientes:

- i. el tratamiento del sustrato de papel con polímero hidrofílico cargado negativamente sobre el sustrato de papel; y
- 25 ii. la aplicación de nanopartículas decoradas con proteínas sobre el sustrato de papel modificado con PSS obtenido en el paso (i).

30 En otra realización, la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, caracterizado por que el polímero es poliestireno sulfonato (PSS).

En otra realización, la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, caracterizado por que la proteína es una proteína capaz de establecer interacciones entre ligando y receptor, preferiblemente en el que la proteína es avidina o un anticuerpo y, más preferiblemente, en el que la proteína es avidina.

35

En otra realización, la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, caracterizado por que las nanopartículas son nanopartículas modificadas con PEG.

5 En otra realización, la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, caracterizado por que las nanopartículas modificadas con PEG son nanopartículas de oro modificadas con PEG.

10 En otra realización, la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, caracterizado por que el tratamiento del paso (i) se realiza depositando una gota de polímero, preferiblemente PSS, sobre partes del sustrato de papel.

15 En otra realización, la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, caracterizado por que las partes del sustrato de papel del paso (i) se cortan en forma de cuadrados.

20 En otra realización, la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, caracterizado por que el volumen del polímero añadido, preferiblemente del PSS añadido, es lo suficientemente grande como para formar un volumen de papel con polímero modificado más grande que el volumen que ocuparán las nanopartículas modificadas con PEG.

25 En otra realización, la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, caracterizado por que el volumen del polímero añadido, preferiblemente de PSS añadido, es de 50 μL y la cantidad de nanopartículas modificadas con PEG, preferiblemente de nanopartículas de oro modificadas con PEG, es de 1 μL .

30 En otra realización, la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, que además comprende el paso (iii) de dejar secar el papel tras el paso (ii), y caracterizado por que el paso (iii) de secado se realiza a una temperatura de 15 °C a 25 °C.

En otra realización, la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, que además comprende el paso (iv) de liberación de nanopartículas del reservorio.

35 En otra realización, la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, caracterizado por que el paso de liberación (iv) es un paso de transferencia a un sustrato de papel receptor, preferiblemente a un sustrato de papel receptor húmedo.

En otra realización, la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, caracterizado por que el paso de transferencia (iv) se realiza mediante presión, preferiblemente mediante presión con un dedo, una prensa o una abrazadera, y más preferiblemente, ejerciendo presión en el punto de la mancha durante 4 minutos como mínimo.

La transferencia de nanopartículas al reservorio puede ser ajustada para que suceda de manera preferente en los bordes o uniformemente por el reservorio mediante el afinamiento del % de PSS y de la concentración de nanopartículas; por ejemplo, un % de PSS de entre 1.9 y 7.5 % y una concentración de nanopartículas de 72 nM favorece la transferencia en los bordes, mientras que un % de PSS de 30 % y una concentración de nanopartículas de 210 nM o más produce una transferencia homogénea de nanopartículas hacia los sustratos receptores.

Por consiguiente, en otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, caracterizado por que el paso de transferencia (iv) se ajusta mediante el afinamiento del contenido de PSS y de la concentración de nanopartículas, preferiblemente de nanopartículas modificadas con PEG o de nanopartículas de oro modificadas con PEG.

En otra realización, la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, caracterizado por que el paso de transferencia (iv) se ajusta mediante el afinamiento del contenido de PSS a entre 1.9 y 7.5 % y la concentración de nanopartículas de oro modificadas con PEG a 72 nM.

En otra realización, la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, caracterizado por que el paso de transferencia (iv) se ajusta mediante el afinamiento del contenido de PSS a un 30 % y la concentración de nanopartículas de oro modificadas con PEG a, como mínimo, 210 nM.

En otra realización, la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, caracterizado por que el sustrato de papel receptor del paso (iv) ha sido modificado con un ligando biológico, preferiblemente albúmina de suero bovino (ASB) modificada con biotina y saturada con tampón fosfato salino con Tween-20 (PBST), que interacciona específicamente con una proteína receptora unida a las nanopartículas.

En otra realización, la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, que además comprende el paso (v) de retirar el reservorio tras la ejecución del paso (iv) y de retirar los reactivos en exceso, y preferiblemente, caracterizado por que el paso (v) se realiza mediante de 3 a 5 lavados con PBST.

5

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un reservorio que comprende nanopartículas decoradas con proteína en sustratos de papel obtenido mediante el procedimiento descrito anteriormente.

10

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere al uso del reservorio de nanopartículas decoradas con proteína descrito anteriormente en la preparación de biosensores fabricados íntegramente en papel.

15

La presente invención introduce una nueva estrategia para la fabricación de reservorios de nanopartículas en papel de filtro. Esta consiste en modificar los sustratos de papel con poliestireno sulfonato cargado negativamente (PSS) para evitar la unión irreversible de nanopartículas modificadas con PEG a la matriz de celulosa (Figura 1A). Los reservorios preparados de esta manera pueden liberar nanopartículas con gran eficiencia.

20

De acuerdo con la invención, el PSS sirve para evitar la unión irreversible de nanopartículas a matrices de celulosa. Además de permitir bajo demanda la liberación de nanopartículas de las matrices de celulosa, el PSS también posibilita la transferencia de nanopartículas del reservorio seco a un sustrato de papel receptor húmedo mediante la simple presión del reservorio contra el receptor (Figura 1B). Así, los reservorios expuestos son de gran utilidad para el desarrollo de biosensores con esquemas simplificados de manipulación de líquidos, pues no hay necesidad de añadir un volumen controlado de tampón al reservorio para transferir su contenido al área de detección. Además, las nanopartículas modificadas con proteína (avidina) mantienen su habilidad de reconocer específicamente su ligando meta (biotina) que se encuentra inmovilizado en el papel receptor de manera dependiente de la dosis, lo cual demuestra la idoneidad de esta estrategia para el desarrollo de biosensores (Figura 1C).

35

Aquí se introduce un procedimiento para el almacenamiento de nanopartículas decoradas con proteína en sustratos de papel que también permite su liberación bajo

demanda. Este consiste en depositar nanopartículas en partes del filtro de papel modificado anteriormente con poliestireno sulfonato (PSS). Las nanopartículas de oro modificadas con avidina son fácilmente transferibles del reservorio seco al trozo de papel receptor húmedo mediante la simple presión con un dedo. Asimismo, las nanosondas pueden establecer interacciones bioespecíficas entre la avidina y la biotina con moléculas unidas a sustrato, lo cual hace que estos reservorios sean idóneos para la fabricación de biosensores basados en nanopartículas. El ajuste del % de PSS y de la concentración de nanopartículas en los reservorios permite una transferencia uniforme entre diferentes capas de papel sin que se formen «anillos de café». Estas características hacen que el procedimiento de la invención sea ideal para desarrollar biosensores de origami hechos íntegramente de papel de filtro y para incorporar mecanismos de generación de señales basados en nanosondas.

Los reservorios que propone esta invención son fáciles de fabricar, tienen una vida útil elevada y evitan los inconvenientes típicos de los biosensores de papel, como la generación de señales colorimétricas arrodaladas. Estas características hacen que sean idóneos para la fabricación de biosensores hechos íntegramente de papel.

En resumen, la presente invención describe un procedimiento para almacenar nanopartículas modificadas con PEG y con proteína en papel de filtro cuando el papel de filtro ha sido tratado anteriormente con PSS. Este tratamiento con PSS evita interacciones irreversibles con el papel, lo que permite la completa liberación de nanopartículas al añadir una solución acuosa. También permite la transferencia de nanopartículas del reservorio a un sustrato receptor mediante la presión con un dedo de un papel contra el otro. Afinar el % de PSS evita la formación de «anillos de café» tanto en el reservorio como en el sustrato receptor. De esta manera, se obtienen señales colorimétricas homogéneamente distribuidas gracias a interacciones biomoleculares entre las nanosondas y las moléculas unidas a sustrato. La presencia de PSS en el reservorio no interfiere en la generación de interacciones entre avidina y biotina y, además, preserva las nanosondas durante un mes como mínimo. Estas características hacen que los reservorios de esta propuesta sean idóneos para la fabricación de biosensores íntegramente de papel y que incorporen nanosondas decoradas con biomoléculas.

A lo largo de la presente invención el término «polímero hidrofílico cargado negativamente» se refiere a polímeros que establecen interacciones favorables

termodinámicamente con agua y que contienen grupos que pueden ser desprotonados para producir grupos negativamente cargados. Entre los ejemplos se incluyen el poliestireno sulfonato (PSS), el ácido poliglutámico y ácidos nucleicos.

5 «Una proteína capaz de establecer interacciones entre ligando y receptor» se refiere a una proteína que interacciona con otra molécula mediante interacciones biomoleculares específicas. Entre los ejemplos se incluyen interacciones entre avidina y biotina, entre estreptavidina y biotina, entre anticuerpos y antígenos, entre agonista y receptor, entre enzima y sustrato, y entre enzima e inhibidor.

10

«Nanopartículas modificadas con PEG» se refiere a nanopartículas modificadas con polietilenglicol (PEG). Entre los ejemplos se incluyen nanopartículas de óxidos metálicos o de metales modificadas con PEG (oro, plata, platino, óxido de hierro o de zinc, etc.), nanopartículas semiconductoras modificadas con PEG (como puntos

15 cuánticos y nanopartículas de *upconversion*, entre otras), liposomas y nanopartículas de proteínas modificadas con corteza de PEG, y nanopartículas de polímeros con PEG en sus capas externas.

15

Salvo que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos que

20 aparecen en este escrito se usan con el significado común que entiende cualquier persona conocedora de la técnica a la que pertenece esta invención. Para poner en práctica esta invención pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este escrito. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones el término «comprender» y sus variaciones se usan sin la intención de

25 excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los ejemplos y dibujos siguientes se presentan a modo de ilustración sin intención de limitar la presente invención.

25

30

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Representación esquemática del reservorio de nanopartículas y del procedimiento de transferir su contenido a un sustrato de papel receptor; (A) El

35 reservorio de papel (i) contiene poliestireno sulfonato (PSS) y nanopartículas de oro decoradas con proteínas receptoras (ii); el sustrato receptor (iii) contiene ligandos

adsorbidos físicamente (iv); (B) Tras colocar el reservorio seco (i) en el sustrato de papel húmedo (ii) y presionar, con un dedo por ejemplo, se transfieren las nanopartículas del primero al segundo; (C) Tras limpiar los reactivos en exceso, la nanopartícula permanece unida al sustrato receptor (ii) mediante interacciones
5 bioespecíficas entre ligando y receptor (v).

FIG. 2. Fabricación de reservorios de nanopartículas con diferentes % de PSS; (A) Imágenes escaneadas de los reservorios antes (arriba) y después (abajo) de 3 lavados con 1 mL de PBST; (B) Perfiles de intensidad de píxel (IP) de los reservorios; (C) Señales colorimétricas (S) en el reservorio antes (círculos) y después (cuadrados) de 3 lavados con PBST. Las barras de error son la desviación típica ($n = 3$). Las líneas de
10 tendencia son una guía para la vista.

FIG. 3. Fabricación de reservorios con 30 % de PSS y diferentes concentraciones de nanopartículas decoradas con avidina; (A) Imágenes escaneadas de los reservorios antes (arriba) y después (abajo) de 3 lavados con 1 mL de PBST; (B) Perfiles de intensidad de píxel (IP) de los reservorios; (C) Señales colorimétricas (S) en el reservorio antes (círculos) y después (cuadrados) de 3 lavados con PBST. Las barras de error son la desviación típica ($n = 3$). Las líneas de tendencia son una guía para la
15 vista.

FIG. 4. Transferencia de nanopartículas decoradas con avidina de reservorios con diferentes % de PSS a sustratos receptores modificados con proteínas biotiniladas; (A) Imágenes escaneadas de los sustratos receptores después de presionar los reservorios durante 4 minutos, de retirarlos y de lavarlos 3 veces con 1 mL de PBST; (B) Perfiles de intensidad de píxel (IP) de los sustratos receptores; (C) Señales colorimétricas (S) en el sustrato de papel receptor. Las barras de error son la desviación típica ($n = 3$). Las líneas de tendencia son una guía para la vista.
20

FIG. 5. Transferencia dependiente del tiempo de nanopartículas decoradas con avidina de reservorios con un 30 % de PSS a sustratos receptores modificados con proteínas biotiniladas; (A) Imágenes escaneadas de los sustratos receptores después de presionar los reservorios durante diferentes periodos de tiempo; (B) Perfiles de intensidad de píxel (IP) de los sustratos receptores; (C) Señales colorimétricas (S) en el sustrato de papel receptor. Las líneas de tendencia son una guía para la vista.
30
35

FIG. 6. Transferencia de nanopartículas decoradas con avidina almacenadas en diferentes concentraciones a sustratos de papel con diferentes tamaños de poro (22, 11 y 3 μm en papel de Whatman 41, 6 y 1 respectivamente) modificados con proteínas biotiniladas; (A) Imágenes escaneadas de los sustratos receptores modificados con ASB biotinilada (biotina) o ASB sin modificar (controlada); (B) Señales colorimétricas en sustratos receptores en papel de Whatman #41 (triángulos), #6 (círculos) y #1 (cuadrados); los experimentos controlados con ASB sin biotinilación están indicados con líneas de puntos; (C) Perfiles de intensidad de píxel (IP) en diferentes sustratos receptores en papel de Whatman #41. Las barras de error son la desviación típica ($n = 3$). Las líneas de tendencia son una guía para la vista.

FIG. 7. Variación de la señal colorimétrica (intensidad de píxel, IP) resultante de las interacciones bioespecíficas entre avidina y biotina cuando se realiza el ensayo con reservorios secos de nanopartículas almacenados durante diferentes periodos de tiempo. El porcentaje de la señal ha sido calculado con respecto a los reservorios almacenados durante 1 h. Las barras de error son la desviación típica ($n = 3$).

FIG. 8 Detección de *E. coli* (A) y de glicoproteína B de citomegalovirus (B) con nanopartículas decoradas con anticuerpos almacenadas en reservorios de papel (escala semilogarítmica). Las barras de error son la desviación típica ($n = 3$).

EJEMPLOS

Síntesis y modificación de nanopartículas de oro con polietilenglicol y avidina: Se sintetizaron nanopartículas de oro bloqueadas con citrato y de un diámetro de aproximadamente 40 nm mediante el método de Turkevich, como se ha descrito anteriormente (Russell et al., Augmented Reality for Real-Time Detection and Interpretation of Colorimetric Signals Generated by Paper-Based Biosensors. ACS Sensors 2017, 2, 848–853). Seguidamente, se modificaron las nanopartículas con 0.1 mM de moléculas de polietilenglicol (PEG) tiolado finalizados en grupos carboxilo (polietilenglicol mercaptoetil eter ácido acético) por la noche. Después, las nanopartículas modificadas con PEG fueron concentradas y lavadas 5 veces con agua vía centrifugación a 8000 rpm durante 6 min. Finalmente, las nanopartículas fueron resuspendidas en 0.5 M ácido 2-morfolino etano sulfónico (MES, Sigma) ajustado a pH 5.5. A continuación, para transformar los grupos carboxilo de alrededor de las nanopartículas en ésteres de sulfo-NHS se añadieron 1 mg de N-(3-

Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida clorhidrato) y 2 mg de sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida por 20 min. Seguidamente, se precipitaron las nanopartículas por medio de centrifugación y se substituyó el sobrenadante por una solución con 1 mg·mL⁻¹ de avidina en 0.1 M de tampón de fosfato pH 7.4. Tras 1 h, se bloquearon los

5 ésteres de sulfo-NHS sin reacción con 0.1 M de glicina y 10 mg·mL⁻¹ de albúmina de suero bovino (ASB) por 30 min. Después, se lavaron las nanopartículas 5 veces con tampón fosfato salino (PBS) con un 0.1 % de Tween-20 (PBST). Las nanopartículas cubiertas con avidina fueron guardadas a 4°C hasta su uso. Se obtuvieron nanopartículas modificadas con anticuerpos mediante la incubación durante 1 h de

10 anticuerpos biotinilados con las nanopartículas cubiertas con avidina, seguida por el lavado de los reactivos en exceso vía 3 pasos de centrifugación.

Densitometría: Las nanopartículas de oro sobre sustratos de papel generan señales colorimétricas dependientes de la concentración que pueden ser calculadas con densitometría, como se expone a continuación. En primer lugar, se escanearon los

15 sustratos de papel con una impresora-escáner MFC-1910W (Brother). Se obtuvieron con ImageJ los perfiles de intensidad de píxel (PI). En escala de grises, la intensidad de píxel de blanco puro es de 255, mientras que la intensidad de píxel de negro puro es de 0. Se obtuvo la señal colorimétrica S de la siguiente manera. Primero, se midió

20 la intensidad de píxel en escala de grises en un área circular dentro del área de interés con la función *Histogram* de ImageJ. La señal colorimétrica S fue tomada como el valor absoluto tras extraer la señal de fondo. Nótese que la extracción del perfil de intensidad de la señal de fondo produce señales invertidas comparadas con los datos brutos.

Fabricación de los reservorios de nanopartículas: Se usó papel de filtro Whatman números 41, 1 y 6 (con diámetros respectivos de 20-25, 11 y 3 µm). Se cortó el papel en cuadrados y se modificó con 50 µL de sulfonato poliestireno (PSS, 30 %, Sigma) que fueron diluidos con agua a un diferente % (v/v) cuando se requería. Tras el

30 secado, se añadió 1 µL de nanopartículas de oro modificadas con PEG y con avidina, y se dejó secar a temperatura ambiente. Para estudiar la liberación de las nanopartículas de los reservorios, se colocaron los sustratos de papel secos modificados con nanopartículas encima de un papel de filtro doblado y se añadió 3 veces 1 mL de PBST. Para evaluar la presencia de nanopartículas tras este paso se

35 dejó secar el papel y se examinó mediante densitometría cualquier cambio de color en el reservorio de nanopartículas.

Transferencia de nanopartículas y bioreconocimiento: la transferencia de nanopartículas del reservorio al sustrato de papel receptor se estudió mediante el siguiente procedimiento. Se modificaron los sustratos de papel receptores con 2 μL de ASB biotinilada ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en PBS) o con antígenos en las diferentes concentraciones expuestas en la Figura 8. Se obtuvo ASB biotinilada mediante un EZ-Link™ sulfo-NHS-biotinylation kit (Thermo Scientific). Se realizaron experimentos controlados con ABS no biotinilada para evaluar la contribución de las interacciones no específicas a las señales colorimétricas. Tras el secado, se añadió 1 mL de PBS con un suplemento de $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ASB (PBS-ASB). A continuación, se colocó el reservorio encima del papel receptor húmedo y se facilitó la transferencia de nanopartículas ejerciendo presión en el centro de la mancha durante 4 min. Posteriormente, se retiró el reservorio y se lavó 3 veces el sustrato receptor con PBST para eliminar interacciones no específicas. Tras el secado, se evaluó la señal colorimétrica mediante densitometría tal y como se detalló anteriormente.

La modificación de sustratos de papel con PSS facilita el almacenamiento de nanopartículas en la matriz de celulosa a la vez que permite su liberación con gran eficiencia. Para su estudio, se cortó el papel de filtro en cuadrados y posteriormente se añadieron 50 μL de PSS en diferentes diluciones y se dejaron secar. Los sustratos de papel con un tamaño de poro de 22 μm (Whatman #41) permanecieron mayormente llanos con todas las distintas concentraciones de PSS, por lo que, consecuentemente, fueron usados para la fabricación de los reservorios de nanopartículas. Estos se obtuvieron tras pipetear 1 μL de nanopartículas de oro en el centro del papel modificado con PSS y tras dejarlo secar a temperatura ambiente. Las suspensiones de nanopartículas de oro con más disponibilidad se sintetizan mediante el método de Turkevich, el cual las deja bloqueadas con moléculas de citrato cargadas negativamente. Para evitar la agregación de nanopartículas en soluciones con concentraciones altas de cationes o proteínas, se suelen sustituir las moléculas de citrato por ligandos de polietilenglicol tiolado (de la Rica et al., Enzyme-responsive nanoparticles for drug release and diagnostics. Adv. Drug Deliv. Rev. 2012, 64, 967–978). Esto no solo evita la agregación de partículas sino que también permite la introducción de grupos reactivos, como grupos carboxilo, para una unión más covalente con biomoléculas. Con esto en mente, se ha estudiado la fabricación de reservorios que contengan sondas de nanopartículas modificadas con PEG y con avidina vía la formación de enlaces avida. La Figura 2A (arriba) muestra imágenes de los reservorios de nanopartículas preparados con diferentes % de PSS y 72 nM de

nanopartículas de oro modificadas con avidina. En estas imágenes, el diámetro de la mancha tiende a reducirse al aumentar el % de PSS en el papel. Simultáneamente, la intensidad del color aumenta al aumentar el % de PSS. Esto también se puede observar en los perfiles de intensidad de píxel obtenidos de estas imágenes, disponibles en la Figura 2B. En escala de grises, la intensidad de píxel es la más alta cuando el color es blanco (255) y la más baja cuando el color es negro (0). En la Figura 2B, la intensidad de píxel a lo largo del reservorio se reduce al aumentar el % de PSS. El diámetro de la mancha sigue el mismo patrón. Todo esto indica que las nanopartículas se encuentran en concentraciones mayores y dentro de un volumen más reducido en la matriz del papel al aumentar el % de PSS. Por consiguiente, la formación de estos reservorios de nanopartículas más pequeños y más concentrados está relacionada con una difusión más lenta de las nanopartículas en la matriz de celulosa. Es bien sabido que la viscosidad de una solución aumenta al aumentar la concentración de PSS (Boris and Colby, Rheology of sulfonated polystyrene solutions. *Macromolecules* 1998, 31, 5746–5755). Ya que el coeficiente de difusión es inversamente proporcional a la viscosidad según la ecuación de Stokes-Einstein, una elevada concentración de PSS reduce la difusión radial y provoca manchas más pequeñas que contienen nanopartículas a una concentración mayor. Nótese que aunque el PSS da un color amarillento al sustrato de papel, su contribución a la intensidad de píxel no es del todo responsable de los cambios de color observados en el reservorio. Por ejemplo, en la Figura 2B la intensidad de píxel fuera del área de nanopartículas se ve reducido de 254 a 234 debido a la modificación con el 30 % de PSS, pero todavía se reduce más en el centro del reservorio, donde se encuentran las nanopartículas ($IP \approx 62$). Esto significa que la contribución principal al cambio de color es a causa de una mayor concentración de nanopartículas en el reservorio y no del PSS añadido. En la Figura 2B, también se observa que la intensidad de píxel es más baja en el borde del reservorio que en el centro. Esto se debe a una mayor concentración de nanopartículas en el borde de las manchas a causa de una distribución desigual de los solutos durante el procedimiento del secado (conocido como «anillos de café») (Zhang et al. Converting color to length based on the coffee-ring effect for quantitative immunoassays using a ruler as readout. *Lab Chip* 2018, 18, 271–275). Finalmente, se ha determinado si las nanopartículas pueden ser liberadas eficientemente del reservorio, pues este es un requerimiento importante para la integración de reservorios en biosensores. Para ello, se añadió a los reservorios 1 mL de PBST en 3 ocasiones. En la Figura 2A (abajo) el color no sufre ningún cambio con la ausencia de PSS, lo cual demuestra que, sin el polímero, las nanopartículas se

unen irreversiblemente a la matriz de celulosa. Sin embargo, al aumentar el % de PSS, el color de dentro de la mancha desaparece paulatinamente, lo cual indica que las nanopartículas salen del reservorio más eficientemente cuando el % de PSS en el reservorio es mayor. Estos experimentos demuestran que el PSS evita la formación de interacciones irreversibles entre las nanopartículas y la matriz de celulosa. En la Figura 2C, la cuantificación de señales con densitometría indica la falta de color en el reservorio cuando el % de PSS utilizado para la fabricación del reservorio es de 15 % o más, lo que sugiere, bajo esta condición, la liberación completa de nanopartículas modificadas con avidina. En resumen, los resultados presentes en la Figura 2 demuestran que es posible almacenar nanopartículas modificadas con PEG y con proteína en un trozo de papel seco que haya sido previamente modificado con PSS y, que las nanopartículas pueden ser liberadas bajo demanda mediante la agregación de una solución acuosa.

A continuación, se ha demostrado que la concentración de nanopartículas tiene un impacto en la fabricación de un reservorio que está basado en papel y que contiene nanopartículas de oro modificadas con avidina. Para ello, se pipetearon 1 μ L de nanopartículas con diferentes concentraciones en sustratos de papel modificados con un 30 % de PSS (Figura 3A). El análisis del perfil revela que la formación de «anillos de café» en el reservorio presentes en la Figura 2 puede evitarse cuando las nanopartículas se distribuyen con una concentración de 140 nM o más, pues la intensidad de píxel es la misma tanto en el centro como en el borde de la mancha (Figura 3B). Con el objetivo de estudiar el efecto de la concentración de nanopartículas en la liberación de los contenidos de la matriz de celulosa modificada con PSS, se lavaron los reservorios con PBST como antes y se midió la señal colorimétrica que queda vía densitometría. En la fila inferior de la Figura 3A y en la Figura 3C, las señales colorimétricas que quedan son bajas en todas las concentraciones analizadas. Solo se detecta un ligero aumento en el color en la concentración más alta de nanopartículas analizada. Esto indica que un 30 % de PSS es efectivo para evitar las interacciones irreversibles con el papel incluso cuando el reservorio contiene altas concentraciones de nanopartículas de oro. En resumen, los experimentos en la Figura 3 indican que los mejores parámetros de fabricación para la obtención de reservorios con los métodos propuestos son un 30 % de PSS y nanopartículas de oro con una concentración de 140-210 nM. Bajo estas condiciones, las nanopartículas dentro del reservorio se distribuyen uniformemente (no aparecen «anillos de café») y la liberación

de coloides del reservorio es completa (no quedan restos de color en el reservorio de papel).

Tras el estudio de las mejores condiciones para el almacenamiento y la liberación de nanopartículas en celulosa, se examinó la habilidad de transferencia de los coloides del reservorio seco a un papel receptor húmedo mediante presión del reservorio contra el papel (Figura 1B). Al mismo tiempo, se examinó si la avidina de alrededor de las nanopartículas todavía podía unirse a las moléculas biotiniladas en el sustrato de papel. En otras palabras, se ha estudiado si la presencia de PSS interfirió con la interacción biológica del modelo de la invención. Para llevar a cabo esta investigación, los reservorios secos fueron presionados contra el sustrato de papel receptor modificado con ASB biotinilada y saturados con PBST. Este proceso transfirió el líquido del papel receptor húmedo al reservorio de papel seco. La rehidratación resultante del reservorio permitió que las nanopartículas fueran transferidas del reservorio al sustrato receptor. Tras separar el reservorio, se lavó 3 veces el sustrato de papel receptor y se evaluó la presencia de nanopartículas unidas al sustrato mediante interacciones entre avidina y biotina. La Figura 4A muestra imágenes del sustrato receptor cuando el reservorio estaba fabricado con la misma concentración de nanopartículas (72 nM) pero diferente % de PSS. En estas imágenes, el color de la mancha se distribuye más uniformemente y es más intenso a medida que el % de PSS aumenta. Así, con un bajo % de PSS solo se genera un anillo de nanopartículas, el cual se va rellenando para dar una mancha coloreada con un alto % de PSS. La Figura 4B también muestra que las nanopartículas decoradas con avidina tienden a acumularse en la periferia de la mancha receptora cuando la concentración de PSS es baja. A medida que el % de PSS aumenta, el diámetro del anillo de nanopartículas se reduce y se observan más nanopartículas en el centro de la mancha. En la Figura 4C, la señal colorimétrica aumenta al aumentar el % de PSS porque se transfieren más nanopartículas en el área de interés. Se propusieron dos mecanismos para que la transferencia de nanopartículas provocara la formación de anillos. El primero de estos mecanismos implica que, con un % de PSS bajo, las nanopartículas se dispersan radialmente y se acumulan en los bordes al ser transferidas, mientras que con un % de PSS alto, las nanopartículas se dispersan radialmente en menor medida y se transfieren uniformemente al papel receptor. Esto provocaría una mayor concentración de nanopartículas en el centro de la mancha al aumentar el % de PSS, tal y como se observa en la Figura 4. En la segunda hipótesis, las nanopartículas son transferidas preferentemente desde los bordes del reservorio al sustrato de papel receptor. Así, se

genera en primer lugar un anillo que, posteriormente, se va rellorando con más nanopartículas. Para discernir qué mecanismo gobierna sobre la transferencia de nanopartículas del reservorio al papel receptor, se repitieron los mismos experimentos con reservorios fabricados con la concentración más elevada de PSS (30 %) pero con diferente tiempo de contacto entre las capas del papel. En la Figura 5 A y B las nanopartículas se transfieren como un anillo cuando se utilizan cortos tiempos de transferencia incluso cuando el % de PSS es elevado. En la Figura 5 C, la señal colorimétrica aumenta al aumentar el tiempo. Estos resultados invalidan el primer mecanismo, pues no se observan nanopartículas en el centro del reservorio durante las primeras fases del proceso de nanopartículas. Así pues, se propone que las nanopartículas y el PSS se transfieren preferentemente desde los bordes del reservorio. Esto genera una barrera de difusión que da lugar a la transferencia posterior de polímeros y nanomateriales en el área central del papel receptor, tal y como propone la segunda hipótesis descrita anteriormente. A continuación, se demuestra que la concentración de nanopartículas y el tipo de papel son relevantes para la generación de señales específicas y no específicas para las aplicaciones de biosensores.

La Figura 6 muestra el efecto que tiene el tamaño del poro del papel receptor en la generación de señales colorimétricas cuando los reservorios llevan un 30 % de PSS y diferentes concentraciones de nanopartículas de oro con avidina injertada. Se evaluaron las interacciones no específicas con ASB no biotiniladas (filas inferiores en la Figura 6A). En la Figura 6B, la densitometría muestra que, aunque los 3 tipos de papel generan señales colorimétricas similares en sustratos biotinilados, los papeles de Whatman 6 y 1 dan lugar a más interacciones no específicas que en el papel de Whatman 41. Esto se atribuye a la mayor área específica de los tipos de papel 6 y 1 debido a su tamaño de poro más pequeño (de 11 y 3 μm , respectivamente), el cual favorece las interacciones no específicas entre las nanopartículas y el sustrato receptor. En la Figura 6C, la intensidad de píxel de la señal colorimétrica se distribuye uniformemente (sin formación de anillos) cuando la concentración de nanopartículas en el reservorio es de 140 nM o más en papel de Whatman 41. Estos resultados, junto a los obtenidos en la Figura 4, indican que los reservorios basados en papel y que contienen un 30 % de PSS y 140 nM de sondas de nanopartículas son los mejores candidatos para la generación uniforme y muy intensa de señales plasmónicas en biosensores.

Además de ser capaces de transferir nanopartículas modificadas con biomoléculas, los reservorios que contienen nanosondas biomoleculares deberían ser capaces de almacenarlas en condiciones de sequedad durante largos periodos de tiempo. Esto es especialmente importante de cara a la incorporación de los reservorios en biosensores destinados a aplicaciones en campo, ya que no siempre es posible almacenarlos en condiciones ideales (baja temperatura, condiciones de sequedad). Para evaluar la vida útil de los reservorios que se proponen, se almacenaron durante un mes sustratos de papel modificados con 30 % de PSS y 140 nM de nanopartículas de oro modificadas con avidina. Se guardaron los reservorios en un sobre a temperatura ambiente. Con el objetivo de preservar las sondas, no se añadieron conservantes ni se tomaron medidas adicionales, tales como liofilización o almacenamiento con gel de sílica. Posteriormente, se experimentó tanto con ASB biotinilada como sin biotinilar para evaluar la habilidad de las nanopartículas de establecer interacciones bioespecíficas tras haber sido almacenadas en los reservorios de papel durante distintos periodos de tiempo. La Figura 7 muestra el % de la señal colorimétrica que queda comparada con reservorios que se usaron a una hora de su fabricación. En esta figura, la señal nunca baja del 85 % del original, lo cual demuestra que el método propuesto es de gran utilidad para la fabricación de biosensores con una larga vida útil sin la necesidad de imponer unas condiciones de almacenamiento sujetas a niveles de temperatura o humedad precisos.

Finalmente, se ha demostrado que los reservorios que contienen nanopartículas modificadas con anticuerpos podrían usarse para detectar específicamente antígenos inmovilizados en sustratos de papel con diferentes concentraciones. Para ello, se modificó el sustrato de papel receptor con una gota de *E. coli* o bien de glucoproteína B y se dejó secar. Tras bloquear y añadir PBST, se colocaron los reservorios encima y se presionaron contra los sustratos receptores durante 5 min. Tras retirar y lavar el reservorio, se calculó el aumento de la intensidad de píxel. En la Figura 8, las curvas de calibrado muestran que la señal colorimétrica aumenta al crecer la concentración de antígenos, lo cual demuestra que los reservorios de esta propuesta se pueden utilizar para almacenar y liberar nanopartículas modificadas con anticuerpos, y que los anticuerpos retienen sus funciones de bioreconocimiento tras haber sido almacenados en el reservorio.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la obtención de un reservorio que comprende de nanopartículas decoradas con proteína en sustratos de papel, el cual comprende los pasos siguientes:
 - i. tratamiento del sustrato de papel con polímero hidrofílico cargado negativamente sobre el sustrato de papel; y
 - ii. aplicación de nanopartículas decoradas con proteína sobre el sustrato de papel modificado con PSS obtenido en el paso (i).
2. El procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que el polímero es poliestireno sulfonato (PSS).
3. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, caracterizado por que la proteína es una proteína capaz de establecer relaciones entre ligando y receptor.
4. El procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado por que la proteína es avidina o un anticuerpo.
5. El procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado por que la proteína es avidina.
6. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado por que las nanopartículas son nanopartículas modificadas con PEG.
7. El procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado por que las nanopartículas modificadas con PEG son nanopartículas de oro modificadas con PEG.
8. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizado por que el tratamiento del paso (i) se realiza depositando una gota de polímero sobre partes del sustrato de papel.
9. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, caracterizado por que los trozos del sustrato de papel del paso (i) se cortan en forma de cuadrados.

10. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, caracterizado por que el volumen del polímero añadido es lo suficientemente grande como para formar un volumen de papel con polímero modificado más grande que el volumen que ocuparán las nanopartículas.
- 5
11. El procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado por que el volumen del polímero añadido es de 50 μL y la cantidad de nanopartículas modificadas con PEG es de 1 μL .
- 10
12. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que además comprende el paso (iii) de dejar secar el papel tras el paso (ii).
13. El procedimiento según la reivindicación 12, caracterizado por que el paso (iii) de dejar secar el papel se realiza a una temperatura de 15 °C a 25 °C.
- 15
14. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, que además comprende el paso (iv) de liberación de las nanopartículas del reservorio.
- 20
15. El procedimiento según la reivindicación 14, caracterizado por que el paso de liberación (iv) es un paso de transferencia a un sustrato de papel receptor.
16. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 14-15, caracterizado por que el paso de liberación (iv) es un paso de transferencia a un sustrato de papel receptor húmedo.
- 25
17. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 15-16, caracterizado por que el paso de transferencia (iv) se lleva a cabo mediante presión.
- 30
18. El procedimiento según la reivindicación 17, caracterizado por que el paso de transferencia (iv) se lleva a cabo mediante presión con un dedo, una prensa o una abrazadera.
- 35
19. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 15-18, caracterizado por que el paso de transferencia (iv) se ajusta mediante el afinamiento del contenido de PSS y de la concentración de nanopartículas.

20. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-19, caracterizado por que el sustrato de papel receptor del paso (iv) ha sido modificado con un ligando biológico que interacciona específicamente con una proteína receptora unida a las nanopartículas.

5

21. Un reservorio que comprende de nanopartículas decoradas con proteína en sustratos de papel obtenido mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-20.

- 10 22. Uso del reservorio de nanopartículas decoradas con proteína según la reivindicación 21 en la preparación de biosensores fabricados íntegramente de papel.

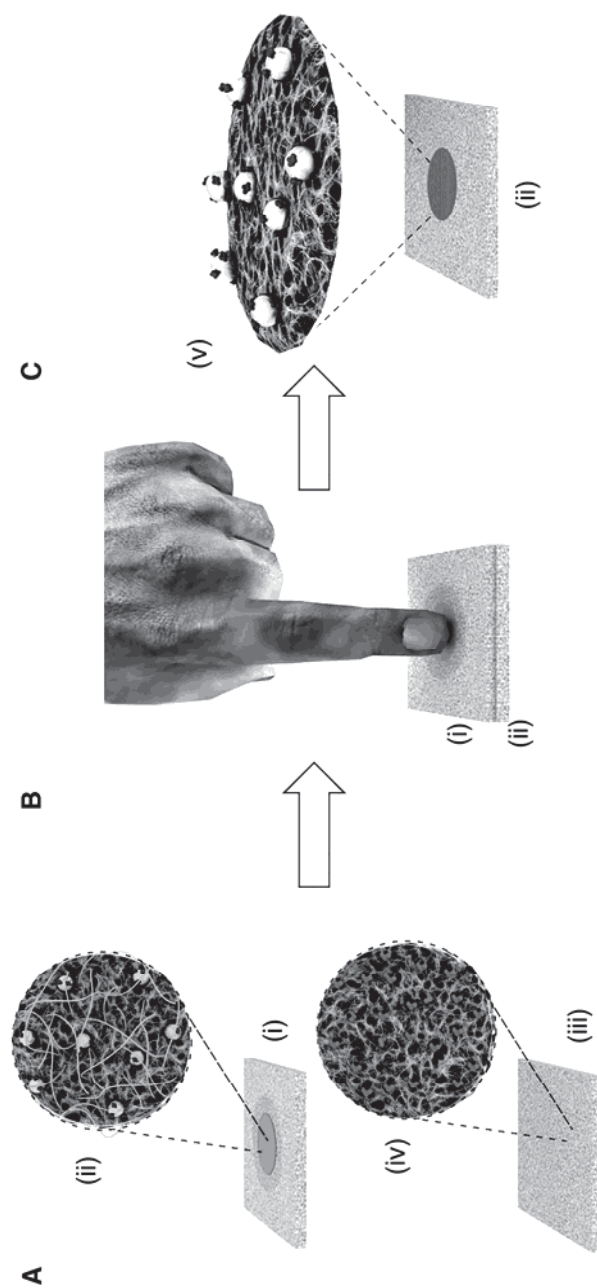


FIG. 1

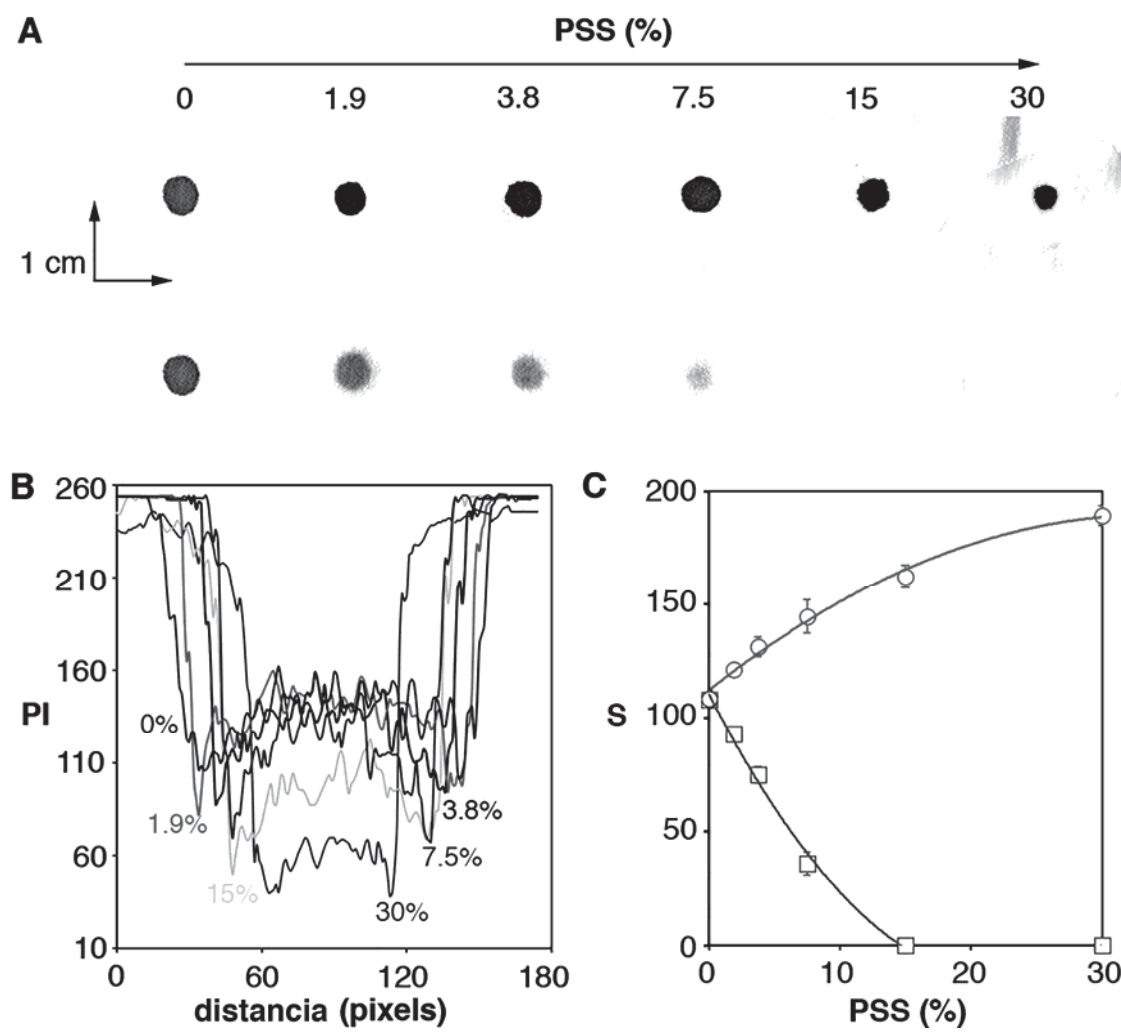


FIG. 2

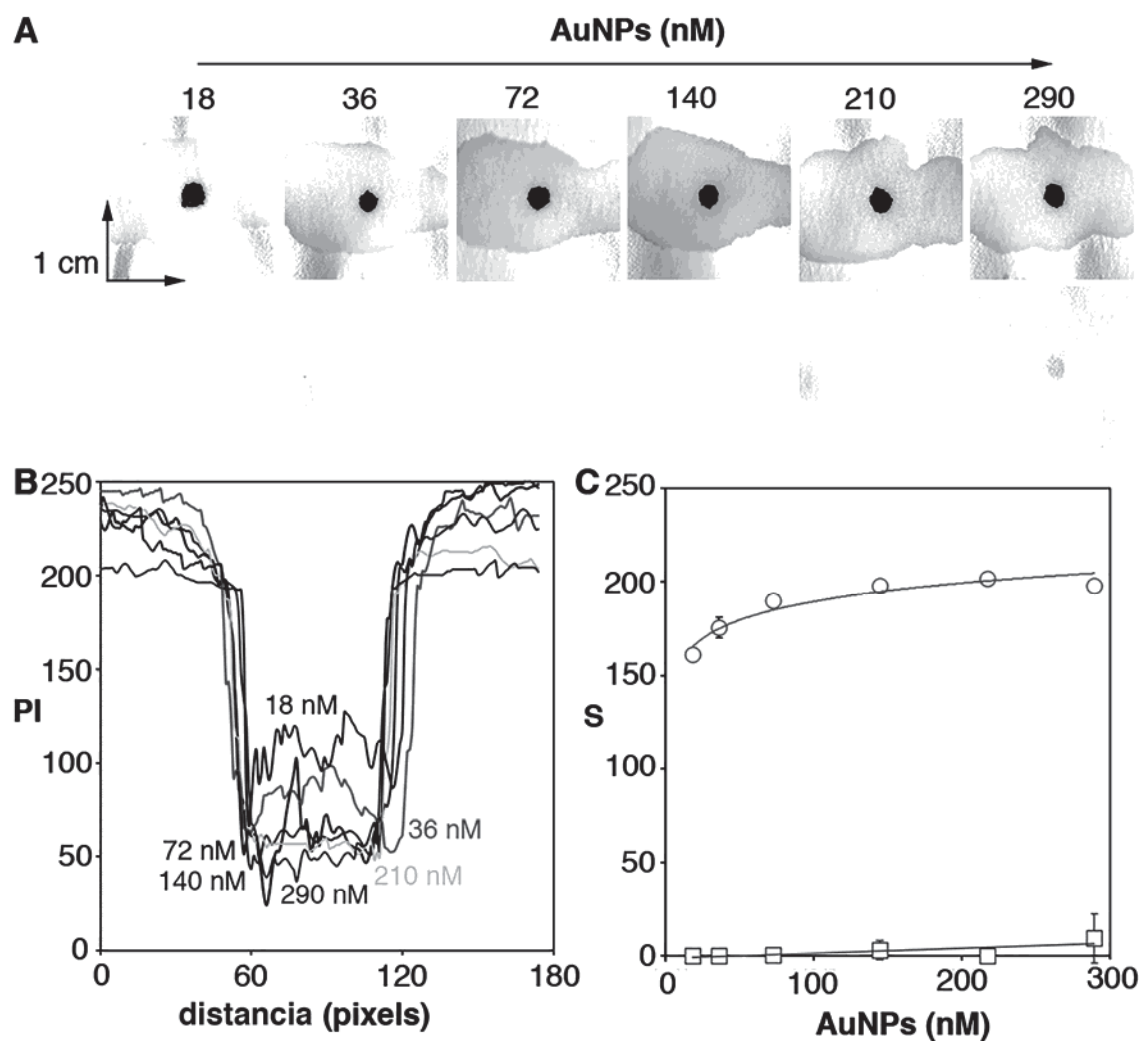


FIG. 3

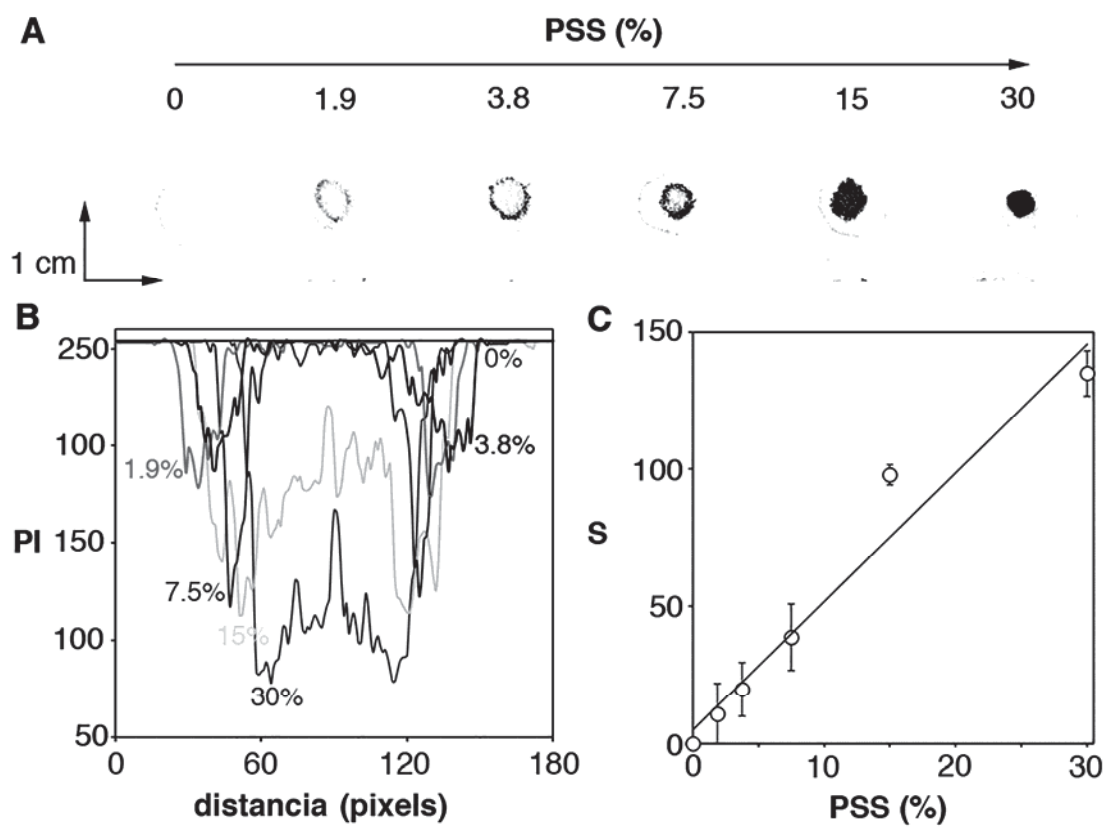


FIG. 4

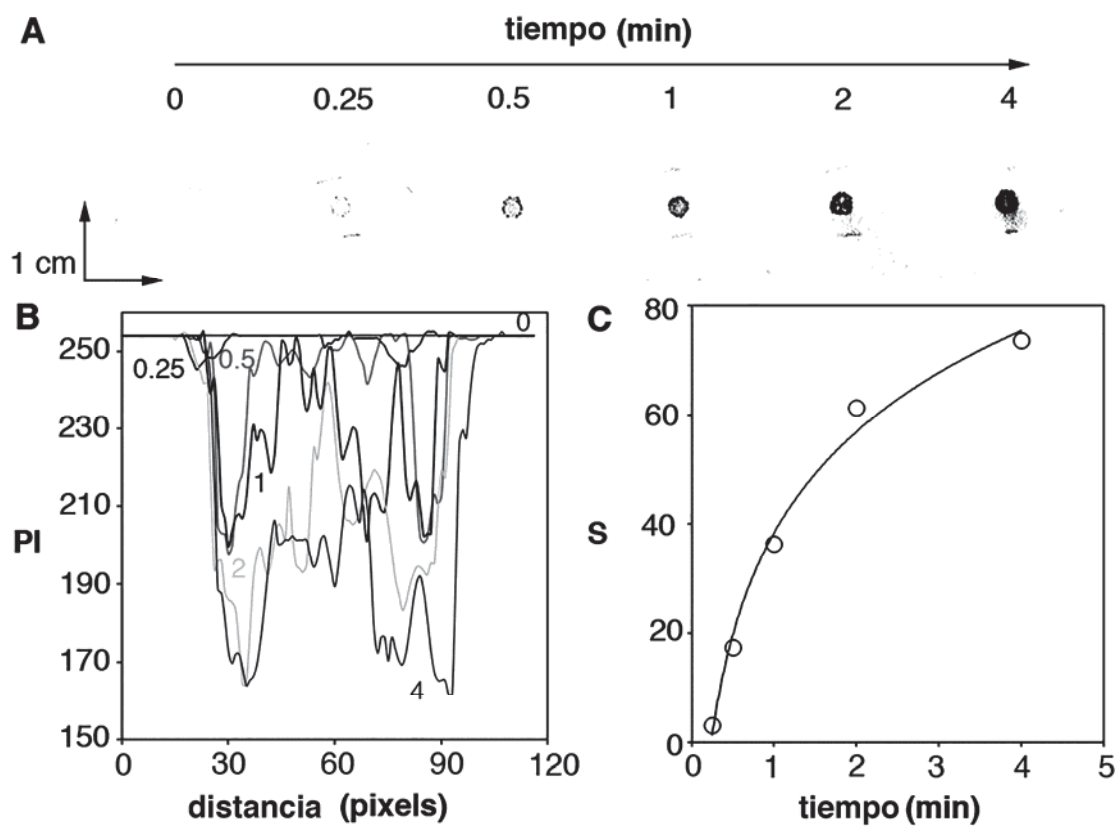


FIG. 5

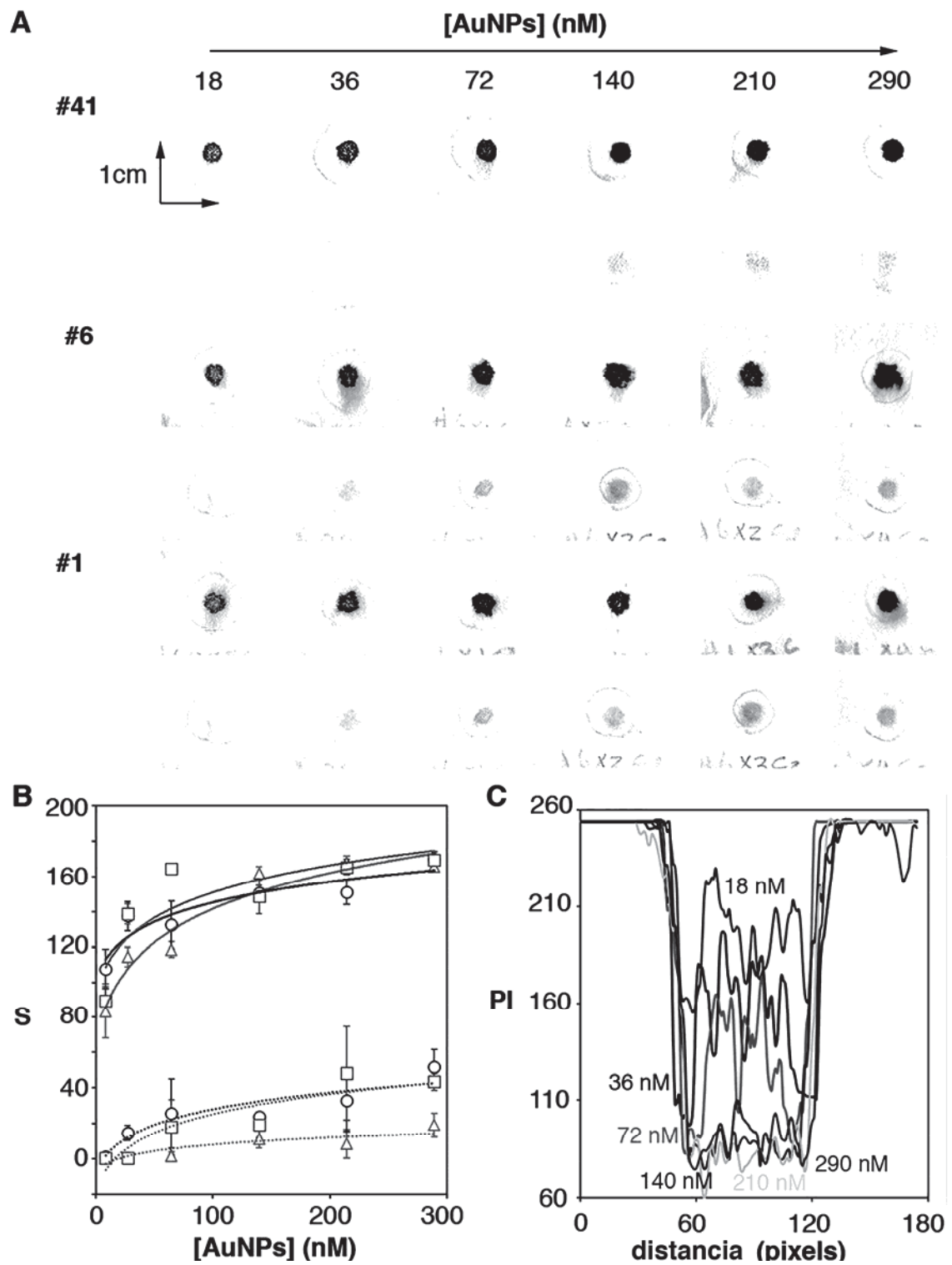


FIG. 6

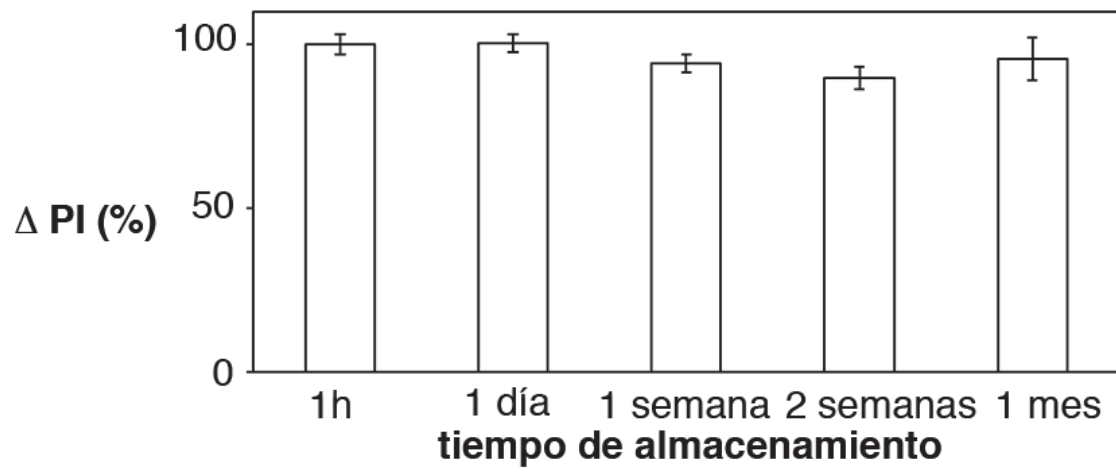


FIG.7

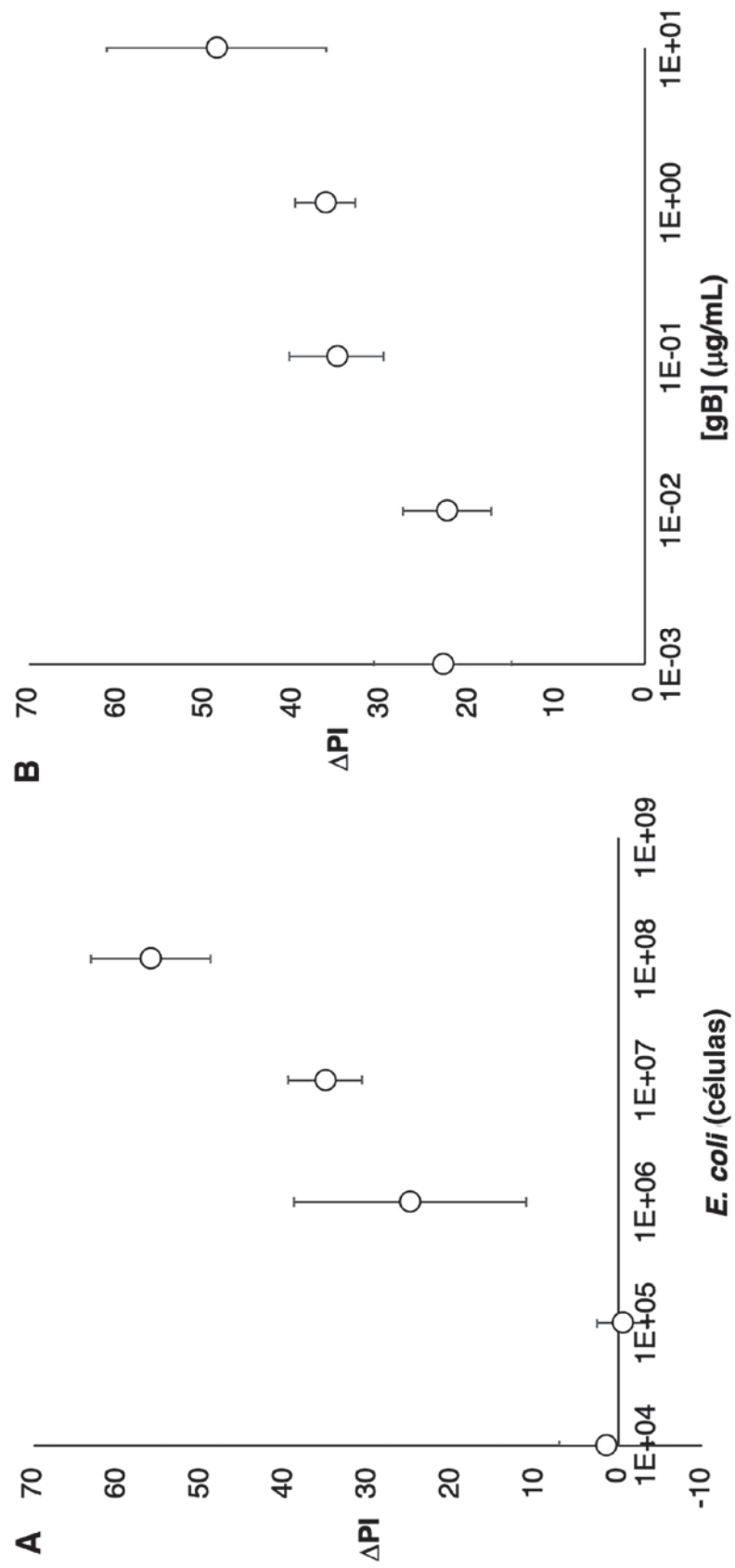


FIG. 8