

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 009 257**

21 Número de solicitud: 202330806

51 Int. Cl.:

G01N 21/41 (2006.01)

G01N 21/01 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

26.09.2023

43 Fecha de publicación de la solicitud:

26.03.2025

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO / EUSKAL
HERRIKO UNIBERTSITATEA (100.00%)
Barrio Sarriena, s/n
48940 LEIOA (Bizkaia) ES**

72 Inventor/es:

**BASABE DESMONTS, Lourdes;
BENITO LÓPEZ, Fernando;
VILLATORO BERNARDO, Agustín Joel y
NAZAR, Franco Nicolás**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DEL CITOCROMO P450**

57 Resumen:

Método para la detección del citocromo P450.

La presente invención se refiere a métodos para la detección del citocromo P450 en una muestra y/o para la determinación del estado de oxidación de dicho citocromo mediante el uso de sensores de fibra óptica modificados con nanopartículas de plata que se encuentran inmovilizadas sobre la superficie del sensor. La invención también se refiere a dispositivos para determinar el contenido y/o el estado de oxidación del citocromo P450 en una muestra.

ES 3 009 257 A1

DESCRIPCIÓN

MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DEL CITOCROMO P450

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a métodos y a dispositivos para la detección del citocromo P450 en una muestra y/o para la determinación del estado de oxidación de dicho citocromo mediante el uso de sensores de fibra óptica.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los nuevos medicamentos son esenciales para la sociedad, ya que mejoran el tratamiento de las enfermedades y la calidad de vida de los pacientes. Por desgracia, sacar un medicamento al mercado lleva entre 10 y 15 años y es muy costoso. La razón es que muchos fármacos fracasan durante la fase de I+D. Aproximadamente la mitad de los candidatos a fármacos fracasan debido a una eficacia inaceptable y hasta el 40% de los candidatos a fármacos fracasan debido a la toxicidad (por ejemplo, inhibición inaceptable del citocromo P450). Por lo tanto, los pasos de I+D que implican pruebas de toxicidad son esenciales durante la fase de descubrimiento de fármacos y cuanto antes se puedan realizar, antes se podrán priorizar o despriorizar los candidatos a fármacos para su posterior desarrollo, acelerando el descubrimiento de fármacos y/o reduciendo su coste.

Los estudios de toxicidad forman parte de los estudios ADMET (absorción, distribución, metabolismo, eliminación y toxicidad). Lamentablemente, los estudios ADMET pueden ser costosos y llevar mucho tiempo, ya que muchos de los ensayos: i) se realizan individualmente, ii) requieren distintos equipos (algunos de los cuales son bastante caros), iii) no todos pueden realizarse con un alto rendimiento, y iv) pueden requerir un volumen significativo de reactivos. Así pues, los estudios ADMET se realizan principalmente *in vivo* durante los estudios preclínicos. Sin embargo, si un candidato a fármaco muestra una toxicidad inaceptable en esta fase preclínica o en una fase clínica posterior, representa un gran coste irre recuperable para la empresa en términos de capital y tiempo, ya que el candidato se descarta (en la mayoría de los casos) o debe optimizarse (en algunos casos). Por lo tanto, para acelerar el descubrimiento de fármacos, existe un impulso para llevar los estudios ADMET a las primeras etapas del descubrimiento y desarrollo de fármacos. Para ello, se necesitan métodos

analíticos ADMET que sean fiables, sensibles, de alto rendimiento, multiplexados y estandarizados.

5 Una forma de determinar la toxicidad de un fármaco es la determinación de la inhibición del citocromo P450. Para medir la inhibición y la cinética de las enzimas del citocromo P450 (CYP), se suelen llevar a cabo ensayos bioquímicos, y luego, mediante diferentes métodos y dispositivos tecnológicos, se interpreta el resultado de estos ensayos. Los métodos técnicos para evaluar los resultados de los ensayos van desde mediciones espectrofotométricas (para observar la reducción de iones férricos a ferrosos en el grupo hemo del CYP, lo que indica su actividad), hasta la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), la cromatografía líquida-tándem de espectrometría de masas (LC-MS/MS) o la cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS).

15 Las mediciones espectrofotométricas tienen la ventaja de que se pueden realizar con un rendimiento medio (formato de placa de 96 pocillos) y son rápidas y fáciles de llevar a cabo. Sin embargo, presentan algunos problemas, como que tienen una sensibilidad baja y no son adecuadas para detectar concentraciones bajas, además de requerir volúmenes más grandes, no proporcionan detalles sobre los metabolitos de los fármacos generados por las enzimas CYP. Requieren que se ejecuten diferentes ensayos de forma secuencial y en su mayoría no se pueden realizar en paralelo. El HPLC, LC-MS/MS y GC-MS tienen la ventaja de proporcionar información detallada sobre los metabolitos y presentan una alta sensibilidad, pero también tienen desventajas ya que tienen un rendimiento bajo (incluso la MS de alto rendimiento no se acerca al rendimiento del espectrofotómetro), son laboriosos y requieren mucho tiempo para su ejecución. Las técnicas de MS (LC-MS/MS y GC-MS) requieren personal especializado y equipos muy costosos para su ejecución.

Las fibras ópticas representan una buena alternativa para detectar parámetros biológicos y químicos debido a su bajo coste, inmunidad electromagnética y su tamaño miniaturizado.

30 Los sensores de fibra óptica se han empleado para la detección de iones metálicos y citocromo c mediante el uso de nanopartículas (NPs). También hay otros estudios en los que se detecta el citocromo c mediante nanoespectroscopia plasmónica en la cara de una fibra óptica mediante el uso de nanopartículas de oro (Ángel Ortega Gómez et al., 2021, Sensors and Actuators: B. Chemical, 330).

A pesar de que en los últimos años ha habido avances relacionados con sensores de fibra óptica recubierta de nanoestructuras, la mayoría de estos sensores carecen de especificidad, y los métodos de fabricación ofrecen escasa reproducibilidad.

- 5 Por tanto, a día de hoy existe la necesidad de encontrar nuevos métodos analíticos que permitan determinar la toxicidad de un candidato a fármaco.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 10 Los autores de la presente invención han desarrollado un nuevo método que se basa en mediciones por fibra óptica de los cambios nanoespectroscópicos en la absorción de nanopartículas metálicas tras la complejación de compuestos (desde iones metálicos a compuestos químicos, proteínas o anticuerpos) en solución.
- 15 En concreto, proponen un método para monitorizar el citocromo P450 que se basa en inmovilizar nanopartículas metálicas en la punta de una fibra óptica, estando estas nanopartículas modificadas con ligandos orgánicos que favorecen la unión de la molécula que se busca detectar o monitorizar. Este nuevo método permite la medición multiplexada de varios parámetros importantes en toxicología relacionados con la actividad y cantidad de
- 20 citocromo P450. Además, el método propuesto por los inventores es más sensible que cualquier espectrofotómetro de última generación existente en 10 veces para medir proteínas (como el citocromo P450) y en 1000 veces para medir Fe^{2+} . Se trata de un método muy rápido, ya que permite pruebas rápidas como otros ensayos espectrofotométricos (5-30 minutos), a diferencia del HPLC, western blot, ELISA, LC-MS/MS, GC-MS, que pueden llevar más de un
- 25 día desde la preparación de la muestra hasta la obtención del resultado.

Así, en un primer aspecto, la invención se refiere a un método para detectar el contenido en citocromo P450 en una muestra y/o determinar el estado de oxidación de dicho citocromo P450 que comprende:

- 30
- (i) Poner en contacto la muestra con un sensor de fibra óptica que se encuentra modificado en una superficie plana de detección de dicho sensor con nanopartículas de plata inmovilizadas sobre dicha superficie, en donde las nanopartículas de plata se encuentran modificadas por un ligando capaz de unirse a citocromo P450 y en donde
- 35 la puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para que se produzca

la unión entre el citocromo P450 presente en la muestra y el ligando presente en las nanopartículas

- 5 (ii) Obtener el espectro de absorción de dichas nanopartículas en un rango de longitudes de onda centradas en torno a 450 nm y/o 390 nm

en donde

- 10 - la intensidad del pico de absorción a la longitud de onda de en torno a 450 nm es indicativa del contenido en citocromo P450 Fe^{2+}

- la intensidad del pico de absorción a la longitud de onda de en torno a 390 nm es indicativa del contenido en citocromo P450 Fe^{3+} y/o

- 15 - el cociente entre la intensidad del pico a 390 nm y la intensidad del pico a 450 nm del espectro de absorción es indicativo del contenido relativo en citocromo P450 Fe^{3+} o Fe^{2+} .

20 El "citocromo P450", "CYP", "CIP" o "P450" se refiere a una enorme y diversa superfamilia de hemoproteínas encontradas en bacterias, archaea y eucariotas. Las proteínas del citocromo P450 usan un amplio rango de compuestos exógenos y endógenos como sustratos de sus reacciones enzimáticas. Por lo general forman parte de cadenas de transferencia de electrones con multicomponentes, denominadas sistemas contenedores de P450.

25 La mayoría de los CYP están formados por 400-500 aminoácidos de los cuales cerca de 55% son de naturaleza apolar. El sitio activo del citocromo P450 contiene un centro hierro asociado al grupo hemo. El hierro está enlazado a la proteína P450 por medio de un ligando de tiolato que proviene de un residuo de cisteína. Esa cisteína y otros residuos circunvecinos (RXCXG) son altamente conservados entre los CYP conocidos.

30 El estado de oxidación del citocromo P450 se refiere al estado de oxidación del Fe asociado al grupo hemo, pudiendo ser citocromo P450 Fe^{2+} o Fe^{3+} .

35 Debido a la gran variedad de reacciones catalizadas por los CYP, sus actividades y propiedades varían entre un miembro y el otro en muchos aspectos. Las principales propiedades de una enzima P450 incluyen:

- El estado en reposo de la proteína contiene un grupo Fe^{3+} (oxidado).
- La unión de un sustrato inicia el transporte de electrones y los enlaces al oxígeno.
- Los electrones son donados al CYP por otra proteína, bien sea un citocromo P450 reductasa, ferredoxina o citocromo b5, con el fin de reducir el hierro del hemo.
- 5 - El oxígeno molecular se une con y es reducido por el hierro del grupo hemo.
- Un oxidante unido al hierro, oxida el sustrato bien sea a un alcohol o a un epóxido, regenerando es estado de reposo del CIP.

En una realización particular, el citocromo P450 se refiere a un citocromo de la familia CYP1, CYP2, CYP3, CYP4, CYP5, CYP7, CYP8, CYP11, CYP17, CYP19, CYP20, CYP21, CYP24, CYP26, CYP27, CYP39, CYP46 o CYP51.

En una realización más particular, el citocromo P450 se refiere a CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2A7, CYP2A13, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP2F1, CYP2J2, CYP2R1, CYP2S1, CYP2U1, CYP2W1, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP3A43, CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4V2, CYP4X1, CYP4Z1, CYP5A1, CYP7A1, CYP7B1, CYP8A1, CYP8B1, CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2, CYP17A1, CYP19A1, CYP20A1, CYP21A2, CYP24A1, CYP26A1, CYP26B1, CYP26C1, CYP27A1, CYP27B1, CYP27C1, CYP39A1 o CYP46A1.

El primer paso (i) del método de la invención comprende poner en contacto la muestra con un sensor de fibra óptica que se encuentra modificado en una superficie plana de detección de dicho sensor con nanopartículas de plata inmovilizadas sobre dicha superficie, en donde las nanopartículas de plata se encuentran modificadas por un ligando capaz de unirse a citocromo P450 y en donde la puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para que se produzca la unión entre el citocromo P450 presente en la muestra y el ligando presente en las nanopartículas.

El término "sensor" se refiere a un dispositivo sensor, o a una parte del mismo, al que se pueden unir moléculas diana de interés de forma que se pueda determinar la presencia o ausencia de esta molécula unida. El sensor puede estar adaptado para sumergirse en una cámara de reacción cuando se produce la reacción de unión con dichas moléculas diana en una muestra de fluido a analizar. El sensor puede además estar adaptado para proporcionar una señal cuantificable indicativa de una concentración o cantidad de las moléculas diana presentes en la muestra de fluido. El término "sensor" se refiere en la presente descripción

específicamente a un sensor utilizado para el análisis o la detección de moléculas mediante el cual un analito diana interactúa con una sonda de afinidad y las señales generadas por esta interacción se transforman mediante un mecanismo de detección fisicoquímico en una forma que puede medirse y cuantificarse. Un sensor ejemplar puede ser un sensor óptico, por ejemplo un biosensor óptico, basado en el principio de resonancia de plasmón superficial (SPR), por ejemplo un dispositivo SPR de fibra óptica (FO-SPR).

Un sensor fibróptico o un sensor de fibra óptica es aquel que contiene una fibra óptica conectada a una fuente de luz. Las fibras ópticas (OF) transmiten señales luminosas entre dos puntos gracias a su reflexión interna total debida a la diferencia entre los índices de refracción de su núcleo y su revestimiento.

El sensor se encuentra modificado en una superficie plana de detección con nanopartículas de plata inmovilizadas sobre dicha superficie.

"Nanopartícula" o "nanopartículas" se utiliza aquí para designar sistemas coloidales de forma de esfera, varilla, poliedro, etc., o formas similares, que tienen un tamaño inferior a 1 micrómetro (μm), individualmente o formando estructuras organizadas (dímeros, trímeros, tetrameros, etc.), dispersas en un fluido (solución acuosa). En una realización particular, las nanopartículas adecuadas para poner en práctica la invención tienen un tamaño inferior a 1 μm , generalmente comprendido entre 1 y 999 nanómetros (nm), típicamente entre 5 y 500 nm, preferentemente entre 10 y 150 nm, aproximadamente. La forma de las nanopartículas puede ser muy variable; ventajosamente, dichas nanopartículas adoptarán cualquier forma ópticamente eficiente, como esferas, barras, estrellas, cubos, poliedros o cualquier otra variante, así como asociaciones complejas de varias partículas; en una realización particular, la forma de las nanopartículas para poner en práctica la invención es esférica, o tiene forma de barra, cubo, octaedro, decaedro, estrella, etc. Los métodos de preparación de nanopartículas metálicas son bien conocidos por los expertos en la materia (Lee, Meisel J. Phys. Chem., (1982) 86, 3391-3395; Baker et al. Anal. Bioanal. Chem., (2005) 382, 1751-1770.2005), y no se describen con más detalle en el presente documento. Las nanopartículas de materiales plasmónicos, por ejemplo, nanopartículas metálicas, pueden ser de un tamaño y tipo adecuados.

Las nanopartículas adecuadas para poner en práctica el método de la invención pueden obtenerse mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. A modo de ejemplo no limitativo, la producción de las nanopartículas para poner en práctica la

invención se lleva a cabo mediante métodos sintéticos que van desde métodos de tipo "descendente" a métodos de tipo "ascendente", incluidos métodos químicos que comprenden, por ejemplo, la reducción de sales metálicas, el sobrecrecimiento, la ablación por luz, o métodos físicos, por ejemplo, la evaporación física o química de vapor, el pulverizado, el fresado, etc.

En una realización preferida, el tamaño de las nanopartículas está comprendido entre 5 y 200 nm, preferiblemente entre 10 y 180 nm, más preferiblemente entre 15 y 175 nm, más preferiblemente entre 20 y 170 nm, más preferiblemente entre 25 y 165 nm, más preferiblemente entre 30 y 160 nm, más preferiblemente entre 35 y 155 nm, más preferiblemente entre 40 y 150 nm, más preferiblemente de 45 a 145 nm, más preferiblemente de 50 a 140 nm, más preferiblemente de 55 a 135 nm, más preferiblemente de 60 a 130 nm, más preferiblemente de 65 a 125 nm, más preferiblemente de 70 a 120 nm, más preferiblemente de 75 a 115 nm, más preferiblemente de 80 a 110 nm, más preferiblemente de 85 a 100 nm.

En otra realización preferida, el tamaño de las nanopartículas está entre 30-90 nm, más preferiblemente el tamaño de las nanopartículas está entre 60-70 nm. En una realización más preferida, el tamaño de las nanopartículas está entre 60-75 nm. En una realización más preferida, el tamaño de las nanopartículas es de 70 nm. En otra realización más preferida, el tamaño de las nanopartículas es de 60 nm. En otra realización más preferida, el tamaño de las nanopartículas es de 65 nm. En otra realización preferida, el tamaño de las nanopartículas es de 30-55 nm, más preferiblemente de 30-50 nm, más preferiblemente de 30-45 nm, más preferiblemente de 30-35 nm, más preferiblemente de 35-40 nm, más preferiblemente de 40-45 nm, más preferiblemente de 40-55 nm, más preferiblemente de 45-55 nm, más preferiblemente de 45-50 nm o más preferiblemente de 50-55 nm.

El término "tamaño de partícula", tal como se utiliza aquí, significa el diámetro de la partícula si ésta es esférica o, si la partícula no es esférica, el tamaño de partícula basado en el volumen. El tamaño de partícula basado en el volumen es el diámetro de la esfera que tiene el mismo volumen que la partícula no esférica en cuestión. Los valores de tamaño de partícula obtenidos mediante las técnicas conocidas en la materia concuerdan dentro del error experimental.

El tamaño de la partícula puede determinarse por cualquier método conocido en la técnica. A modo de ejemplos ilustrativos no imitativos, el tamaño de la partícula puede determinarse

mediante tamices, sedimentación, ensayo de electrozonas, difracción láser, citómetro de flujo, microscopía como la microscopía electrónica de barrido o de transmisión (SEM o TEM), técnicas espectroscópicas como la dispersión de luz dinámica o la espectroscopia UV-vis, o Eyecon2™.

5

Según la invención, las nanopartículas empleadas en el método son nanopartículas de un material plasmónico.

10

El término "material plasmónico", tal y como se utiliza en el presente documento, hace referencia a aquellos materiales que pueden mantener ondas plasmónicas superficiales en una interfaz metal-dieléctrica. Prácticamente cualquier interfaz metal-dieléctrica puede sostener ondas plasmónicas superficiales si es excitada por una fuente de luz de frecuencia adecuada a través de diferentes mecanismos de excitación, como la excitación por prisma. El material plasmónico se selecciona del grupo que consiste en oro, plata, cobre, paladio, rodio, aluminio, rutenio, indio, alcalino, metales alcalinotérreos, aleaciones de metales de los mismos, CuSe, CuTe, silicio y combinaciones de los mismos, en particular plata u oro. En el método de la invención el material plasmónico es plata.

15

20

El sensor empleado en el método de la invención se encuentra modificado con nanopartículas de plata inmovilizadas en la superficie del sensor. La inmovilización puede hacerse mediante adsorción electrostática o unión covalente mediante protocolos estándar.

25

En una realización preferida, las nanopartículas se encuentran inmovilizadas en la superficie del sensor como resultado de una reacción entre grupos tiol en la superficie del sensor y las nanopartículas.

30

El grupo tiol se refiere a un compuesto que contiene el grupo funcional formado por un átomo de azufre y un átomo de hidrógeno (-SH). Siendo el azufre análogo de un grupo hidroxilo (-OH), este grupo funcional es llamado grupo tiol o grupo sulfhidrilo.

En otra realización preferida, el extremo de la fibra óptica sobre el que se encuentran inmovilizadas las nanopartículas es sustancialmente plano.

35

En el método de la invención, las nanopartículas de plata se encuentran modificadas por un ligando capaz de unirse a citocromo P450.

El ligando puede estabilizarse en la superficie de las nanopartículas mediante técnicas químicas adecuadas, por ejemplo, en función de los grupos funcionales eventualmente presentes en la superficie de las nanopartículas y en el ligando, como, por ejemplo, la creación de enlaces mediante síntesis química o autoensamblaje, o mediante fenómenos físicos basados en interacciones electrostáticas o hidrofóbicas.

En el método de la invención el contacto entre la muestra y el sensor de fibra óptica modificado se lleva a cabo en condiciones adecuadas para que se produzca la unión entre el citocromo P450 presente en la muestra y el ligando presente en las nanopartículas. Estas condiciones dependerán del ligando y son ampliamente conocidas por un experto en la materia.

"Reactivo capaz de detectar un analito", o "ligando", tal como se utiliza aquí, se refiere a un compuesto que se utiliza para sondear la presencia del analito diana, en la presente invención el citocromo P450. En su sentido más amplio, el término incluye cualquier sustancia con capacidad de unirse a un analito diana, y en particular cualquier molécula capaz de dar lugar a interacciones selectivas con el analito diana. El experto en la materia comprenderá que la naturaleza química del ligando dependerá de la naturaleza química del analito diana. Preferiblemente, los ligandos selectivos, para una amplia variedad de analitos diana, son conocidos o pueden encontrarse fácilmente utilizando técnicas conocidas. A modo de ejemplo:

- cuando el analito diana es una proteína, el ligando puede ser una proteína (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento del mismo (Fabs, etc.));
- cuando el analito diana es una enzima, el ligando puede ser un sustrato o un inhibidor de dicha enzima;
- cuando el analito diana es una proteína de unión a ácido nucleico o un ácido nucleico, el ligando puede ser un aptámero, como un aptámero peptídico o un aptámero de ADN o ARN; y
- cuando el analito diana es un ácido nucleico, el ligando puede ser un ácido nucleico, como una sonda, etc.

En una realización particular, el reactivo capaz de reconocer el analito es una molécula que da lugar a una interacción selectiva con el analito diana; es decir, el ligando tiene la capacidad de distinguir entre varios analitos diana presentes en la muestra. Ejemplos ilustrativos de dicha interacción selectiva incluyen las interacciones antígeno-anticuerpo, interacciones enzima-sustrato, interacciones llave-cerradura, etc.

En otra realización particular, el reactivo capaz de reconocer el analito (en concreto el citocromo P450) es una molécula no específica, es decir, un ligando al que se le pueden unir más proteínas. Aunque el ligando no sea específico, solo se verá la proteína que presente un espectro de absorción en la región del plasmón de la nanopartícula. Esto supone una ventaja
5 frente a otros métodos como la resonancia de plasmón de superficie (SPR) donde lo que se mide es el desplazamiento del pico de absorción, por lo que es necesario un ligando específico para saber qué analito causa la respuesta al sensor.

En una realización particular, el ligando de citocromo P450 se selecciona del grupo formado
10 por un anticuerpo, un aptámero y un reactivo que es capaz de reaccionar de manera específica con el grupo hemo.

Tal y como se utiliza aquí, el término "anticuerpo" o "inmunoglobulina" (Ig) se refiere a glicoproteínas de tipo gamma-globulina. El anticuerpo típico se compone de unidades
15 estructurales básicas, cada una de las cuales con dos cadenas pesadas grandes y dos cadenas ligeras más pequeñas, formando monómeros (con una unidad), dímeros (con dos unidades) o pentámeros (con cinco unidades), por ejemplo. En este contexto, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos naturales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos recombinantes, etc. Asimismo, el término "anticuerpo" se refiere
20 tanto a anticuerpos completos como a fragmentos de los mismos que mantienen la capacidad de unirse al antígeno correspondiente, así como a anticuerpos recombinantes, como por ejemplo, fragmentos Fv de cadena simple (scFv), diabodies, anticuerpos de dominio simple (VH), nanocuerpos (VHH), etc.

Los anticuerpos se pueden preparar utilizando cualquiera de los métodos conocidos por la
25 persona experta en la técnica.

Los aptámeros utilizados en la presente invención se refieren a secuencias cortas de ADN artificial, ARN, ARN o péptido que se unen al citocromo P450.

El término "XNA" se refiere a los ácidos xeno nucleicos (XNA), que son análogos sintéticos de ácidos nucleicos que tienen una columna vertebral de azúcar diferente a los ácidos nucleicos naturales ADN y ARN. En los nucleótidos XNA, los grupos de azúcar desoxirribosa y ribosa del ADN y el ARN han sido reemplazados por otras estructuras químicas. Los
35 aptámeros basados en XNA pueden introducir diversidad química adicional para aumentar la afinidad de unión o una mayor durabilidad en suero o in vivo.

En este contexto, se entiende por reaccionar de manera "específica" a la unión del reactivo al citocromo P450 con la suficiente especificidad como para distinguir entre el analito diana (citocromo P450) y otros componentes o contaminantes de la muestra de ensayo. La unión debe ser lo suficientemente fuerte como para que el reactivo permanezca unido al analito diana en las condiciones de la prueba. En una realización particular, por ejemplo, en la detección de determinadas moléculas biológicas, la constante de diasociación del analito diana y el reactivo será igual o inferior a aproximadamente 10^{-4} M^{-1} , preferiblemente igual o inferior a 10^{-6} M^{-1} , más preferiblemente igual o inferior a 10^{-8} M^{-1} , aún más preferiblemente igual o inferior a 10^{-10} M^{-1} .

En algunas realizaciones, el analito es identificado por su espectro, siendo éste característico de cada compuesto.

El "grupo hemo" es un grupo prostético que forma parte de diversas proteínas, entre las que destaca la hemoglobina, consiste en un ion Fe^{2+} (ferroso) contenido en el centro de un gran heterociclo orgánico llamado porfirina, hecho de cuatro grupos pirrólicos unidos entre sí por medio de puentes metileno.

En una realización particular, el reactivo capaz de reaccionar de manera específica con el grupo hemo contiene al menos un grupo carboxilo terminal.

En una realización más particular, el reactivo que contiene grupos carboxilos terminales es un ácido carboxílico de al menos 2 átomos de carbono.

Los ácidos carboxílicos constituyen un grupo de compuestos, caracterizados porque poseen un grupo funcional llamado grupo carboxilo o grupo carboxi ($-\text{COOH}$).

En una realización particular, el ácido carboxílico es ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido valérico, ácido hexanoico, ácido heptanoico, ácido octanoico, ácido nonanoico, ácido decanoico, ácido undecanoico, ácido dodecanoico, ácido tridecanoico, ácido tretadecanoico, ácido pentadecanoico, ácido hexadecanoico, ácido heptadecanoico, ácido octadecanoico, ácido nonadecanoico o ácido eicosanoico.

En una realización más particular, el ácido carboxílico contiene un grupo tiol. En una realización preferida, el tiol se selecciona del grupo que consiste en ácido mercaptoundecanoico o ácido mercaptopropanoico, ácido 6-mercaptohexanoico, ácido 4-

mercaptobutírico, ácido 8-mercaptooctanoico, ácido 12-mercaptododecanoico, ácido 16-mercaptohexadecanoico, clorhidrato de 6-amino-1-hexanotiol, clorhidrato de 8-amino-1-octanetotiol, clorhidrato de 3-amino-1-propanetotiol, clorhidrato de 11-amino-1-undecanotiol, clorhidrato de 16-amino-1-hexadecanotiol y cisteamina.

5

El segundo paso (ii) del método de la invención comprende obtener el espectro de absorción de las nanopartículas en un rango de longitudes de onda centradas en torno a 450 nm y/o 390 nm, en donde,

- 10 - la intensidad del pico de absorción a la longitud de onda de en torno a 450 nm es indicativa del contenido en citocromo P450 Fe^{2+} .
- la intensidad del pico de absorción a la longitud de onda de en torno a 390 nm es indicativa del contenido en citocromo P450 Fe^{3+} .
- 15 - el cociente entre la intensidad del pico a 390 nm y la intensidad del pico a 450 nm del espectro de absorción es indicativo del contenido relativo en citocromo P450 Fe^{3+} o Fe^{2+} .
-

El espectro de absorción se refiere la fracción de la radiación electromagnética incidente que un material absorbe dentro de un rango de frecuencias.

20

Existe una amplia gama de enfoques experimentales para medir los espectros de absorción. La disposición más común es dirigir un haz de radiación generado hacia una muestra y detectar la intensidad de la radiación que pasa a través de ella. La energía transmitida se puede utilizar para calcular la absorción. La fuente, la disposición de la muestra y la técnica

25 de detección varían significativamente según el rango de frecuencia y el propósito del ensayo.

En una realización particular, la determinación del contenido en citocromo P450 se determina mediante comparación del espectro obtenido en la etapa (ii) del método de la invención con espectros de absorción obtenidos empleando muestras control que contienen cantidades

30 conocidas de citocromo P450.

En otra realización particular, la determinación del contenido en citocromo P450 Fe^{2+} o Fe^{3+} se determina mediante comparación del espectro obtenido en la etapa (ii) del método de la invención con espectros de absorción obtenidos empleando muestras control que contienen

35 citocromo P450 Fe^{2+} sustancialmente libre de citocromo P450 Fe^{3+} o que contienen citocromo P450 Fe^{3+} sustancialmente libre de citocromo P450 Fe^{2+} .

El término “sustancialmente libre de citocromo P450 Fe³⁺” se refiere a una muestra, que comprende menos del 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 12%, 10%, 9%, 7%, 5%, 3%, 2%, 1.7%, 1.5%, 1.4%, 1.3%, 1.2%, 1.1%, 1%, 0.9%, 0.8%, 0.7%, 0.6%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, 0.09%, 0.085%, 0.08%, 0.07%, 0.06%, 0.005%, 0.04%, 0.03%, 0.02%, 0.01%, 0.009%, 0.008%, 0.007%, 0.006%, 0.005%, 0.004%, 0.003%, 0.002%, 0.001% de citocromo P450 Fe³⁺ con respecto a la cantidad de citocromo P450 Fe²⁺ comprendido en la muestra.

El término “sustancialmente libre de citocromo P450 Fe²⁺” se refiere a una muestra, que comprende menos del 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 12%, 10%, 9%, 7%, 5%, 3%, 2%, 1.7%, 1.5%, 1.4%, 1.3%, 1.2%, 1.1%, 1%, 0.9%, 0.8%, 0.7%, 0.6%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, 0.09%, 0.085%, 0.08%, 0.07%, 0.06%, 0.005%, 0.04%, 0.03%, 0.02%, 0.01%, 0.009%, 0.008%, 0.007%, 0.006%, 0.005%, 0.004%, 0.003%, 0.002%, 0.001% de citocromo P450 Fe²⁺ con respecto a la cantidad de citocromo P450 Fe³⁺ comprendido en la muestra.

En otra realización particular, el método se repite en un primer punto temporal y en un segundo punto temporal y en donde se detecta la conversión de citocromo P450 Fe²⁺ en citocromo P450 Fe³⁺ mediante el desplazamiento del pico de 450 nm a 390 nm o en donde se detecta la conversión de citocromo P450 Fe³⁺ en citocromo P450 Fe²⁺ mediante el desplazamiento del pico de 390 nm a 450 nm entre el primer punto temporal y el segundo punto temporal.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un dispositivo, de ahora en adelante el dispositivo de la invención, adecuado para determinar el contenido y/o el estado de oxidación del citocromo P450 en una muestra que comprende un sensor de fibra óptica que se encuentra modificado en una superficie de detección de dicho sensor con nanopartículas de plata inmovilizadas sobre dicha superficie y en donde las nanopartículas de plata se encuentran modificadas por un ligando capaz de unirse a citocromo P450.

El término citocromo P450 ha sido definido en el método de la invención y esta definición es aplicable al dispositivo de la invención.

En una realización particular, el citocromo P450 se refiere a un citocromo de la familia CYP1, CYP2, CYP3, CYP4, CYP5, CYP7, CYP8, CYP11, CYP17, CYP19, CYP20, CYP21, CYP24, CYP26, CYP27, CYP39, CYP46 o CYP51.

En una realización más particular, el citocromo P450 se refiere a CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2A7, CYP2A13, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6,

CYP2E1, CYP2F1, CYP2J2, CYP2R1, CYP2S1, CYP2U1, CYP2W1, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP3A43, CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4V2, CYP4X1, CYP4Z1, CYP5A1, CYP7A1, CYP7B1, CYP8A1, CYP8B1, CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2, CYP17A1, CYP19A1, CYP20A1, CYP21A2, CYP24A1, CYP26A1, CYP26B1, CYP26C1, CYP27A1, CYP27B1, CYP27C1, CYP39A1 o CYP46A1.

El término “nanopartícula” ha sido definido en el método de la invención y esta definición es aplicable al dispositivo de la invención.

10

En una realización preferida, el tamaño de las nanopartículas está comprendido entre 5 y 200 nm, preferiblemente entre 10 y 180 nm, más preferiblemente entre 15 y 175 nm, más preferiblemente entre 20 y 170 nm, más preferiblemente entre 25 y 165 nm, más preferiblemente entre 30 y 160 nm, más preferiblemente entre 35 y 155 nm, más preferiblemente entre 40 y 150 nm, más preferiblemente de 45 a 145 nm, más preferiblemente de 50 a 140 nm, más preferiblemente de 55 a 135 nm, más preferiblemente de 60 a 130 nm, más preferiblemente de 65 a 125 nm, más preferiblemente de 70 a 120 nm, más preferiblemente de 75 a 115 nm, más preferiblemente de 80 a 110 nm, más preferiblemente de 85 a 100 nm. En otra realización preferida, el tamaño de las nanopartículas está entre 30-90 nm, más preferiblemente el tamaño de las nanopartículas está entre 60-70 nm. En una realización más preferida, el tamaño de las nanopartículas está entre 60-75 nm. En una realización más preferida, el tamaño de las nanopartículas es de 70 nm. En otra realización más preferida, el tamaño de las nanopartículas es de 60 nm. En otra realización más preferida, el tamaño de las nanopartículas es de 65 nm. En otra realización preferida, el tamaño de las nanopartículas es de 30-55 nm, más preferiblemente de 30-50 nm, más preferiblemente de 30-45 nm, más preferiblemente de 30-35 nm, más preferiblemente de 35-40 nm, más preferiblemente de 40-45 nm, más preferiblemente de 40-55 nm, más preferiblemente de 45-55 nm, más preferiblemente de 45-50 nm o más preferiblemente de 50-55 nm.

Según la invención, las nanopartículas empleadas son nanopartículas de un material plasmónico.

El término “material plasmónico” ha sido definido en el método de la invención y esta definición es aplicable al dispositivo de la invención.

35

El dispositivo de la invención comprende un sensor de fibra óptica que se encuentra modificado en una superficie de detección de dicho sensor con nanopartículas de plata inmovilizadas sobre dicha superficie.

- 5 El término “sensor” ha sido definido en el método de la invención y esta definición es aplicable al dispositivo de la invención.

La inmovilización de las nanopartículas puede hacerse mediante adsorción electrostática y unión covalente mediante protocolos estándar.

10

En una realización particular, el dispositivo comprende adicionalmente una fuente de luz capaz de emitir luz en un rango de longitud de onda centrado en torno a 450 nm a lo largo de la fibra óptica.

- 15 En otra realización particular, el dispositivo comprende adicionalmente un detector capaz de detectar el espectro de absorción de las nanopartículas en un rango de longitudes centrado en torno a 450 nm.

Las nanopartículas de plata del sensor se encuentran modificadas por un ligando capaz de unirse a citocromo P450.

20

El término “ligando” ha sido definido en el método de la invención y esta definición es aplicable al dispositivo de la invención.

- 25 El ligando puede estabilizarse en la superficie de las nanopartículas mediante técnicas químicas adecuadas, por ejemplo, en función de los grupos funcionales eventualmente presentes en la superficie de las nanopartículas y en el ligando, como, por ejemplo, la creación de enlaces mediante síntesis química o autoensamblaje, o mediante fenómenos físicos basados en interacciones electrostáticas o hidrofóbicas.

30

En una realización particular el ligando capaz de unirse a citocromo P450 se selecciona del grupo formado por un anticuerpo anti-citocromo P450, un aptámero que se une de manera específica a un citocromo P450 o por una molécula que contiene grupos reactivos capaces de reaccionar con el grupo hemo.

35

Los términos “anticuerpo” y “aptámero” han sido definidos en el método de la invención y estas definiciones son aplicable al dispositivo de la invención.

5 El “grupo hemo” es un grupo prostético que forma parte de diversas proteínas, entre las que destaca la hemoglobina, consiste en un ion Fe^{2+} (ferroso) contenido en el centro de un gran heterociclo orgánico llamado porfirina, hecho de cuatro grupos pirrólicos unidos entre sí por medio de puentes metileno.

10 En una realización particular, el reactivo capaz de reaccionar de manera específica con el grupo hemo contiene al menos un grupo carboxilo terminal.

En una realización más particular, el reactivo que contiene grupos carboxilos terminales es un ácido carboxílico de al menos 2 átomos de carbono. En una realización más particular, el ácido carboxílico es ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido valérico, ácido hexanoico, 15 ácido heptanoico, ácido octanoico, ácido nonanoico, ácido decanoico, ácido undecanoico, ácido dodecanoico, ácido tridecanoico, ácido tretadecanoico, ácido pentadecanoico, ácido hexadecanoico, ácido heptadecanoico, ácido octadecanoico, ácido nonadecanoico o ácido eicosanoico.

20 En otra realización particular, el ácido carboxílico contiene un grupo tiol. En una realización preferida, el tiol se selecciona del grupo que consiste en ácido mercaptoundecanoico o ácido mercaptopropanoico, ácido 6-mercaptophexanoico, ácido 4-mercaptobutírico, ácido 8-mercaptooctanoico, ácido 12-mercaptododecanoico, ácido 16-mercaptopentadecanoico, clorhidrato de 6-amino-1-hexanotiol, clorhidrato de 8-amino-1-octanotiol, clorhidrato de 3- 25 amino-1-propanotiol, clorhidrato de 11-amino-1-undecanotiol, clorhidrato de 16-amino-1-hexadecanotiol y cisteamina.

En otra realización particular, el extremo de la fibra óptica sobre el que se encuentran inmovilizadas las nanopartículas es sustancialmente plano.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar el contenido en citocromo P450 en una muestra y/o determinar el estado de oxidación de dicho citocromo P450 que comprende:

(i) Poner en contacto la muestra con un sensor de fibra óptica que se encuentra modificado en una superficie plana de detección de dicho sensor con nanopartículas de plata inmovilizadas sobre dicha superficie, en donde las nanopartículas de plata se encuentran modificadas por un ligando capaz de unirse a citocromo P450 y en donde la puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para que se produzca la unión entre el citocromo P450 presente en la muestra y el ligando presente en las nanopartículas

(ii) Obtener el espectro de absorción de dichas nanopartículas en un rango de longitudes de onda centradas en torno a 450 nm y/o 390 nm

en donde

- la intensidad del pico de absorción a la longitud de onda de en torno a 450 nm es indicativa del contenido en citocromo P450 Fe^{2+}
- la intensidad del pico de absorción a la longitud de onda de en torno a 390 nm es indicativa del contenido en citocromo P450 Fe^{3+} y/o
- El cociente entre la intensidad del pico a 390 nm y la intensidad del pico a 450 nm del espectro de absorción es indicativo del contenido relativo en citocromo P450 Fe^{3+} o Fe^{2+} .

2. El método según la reivindicación 1 en donde las partículas se encuentran inmovilizadas en la superficie del sensor como resultado de una reacción entre grupos tiol en la superficie del sensor y las nanopartículas.

3. El método según las reivindicaciones 1 o 2 en donde el ligando de citocromo P450 se selecciona del grupo formado por un anticuerpo, un aptámero y un reactivo que es capaz de reaccionar de manera específica con el grupo hemo.

4. El método según la reivindicación 3 en donde el reactivo capaz de reaccionar de manera específica con el grupo hemo contiene al menos un grupo carboxilo terminal.

5. El método según la reivindicación 4 en donde el reactivo que contiene grupos carboxilos terminales es un ácido carboxílico de al menos 2 átomos de carbono

6. El método según la reivindicación 5 en donde el ácido carboxílico contiene un grupo tiol.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en donde el extremo de la fibra óptica sobre el que se encuentran inmovilizadas las nanopartículas es sustancialmente plano.
8. El método según las reivindicaciones 1 a 8 en donde la determinación del contenido en citocromo P450 se determina mediante comparación del espectro obtenido en la etapa (ii) con espectros de absorción obtenidos empleando muestras control que contienen cantidades conocidas de citocromo P450.
9. El método según las reivindicaciones 1 a 9 en donde el contenido en citocromo P450 Fe^{2+} o Fe^{3+} se determina mediante comparación del espectro obtenido en la etapa (ii) con espectros de absorción obtenidos empleando muestras control que contienen citocromo P450 Fe^{2+} sustancialmente libre de citocromo P450 Fe^{3+} o que contienen citocromo P450 Fe^{3+} sustancialmente libre de citocromo P450 Fe^{2+} .
10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en donde el método se repite en un primer punto temporal y en un segundo punto temporal y en donde se detecta la conversión de citocromo P450 Fe^{2+} en citocromo P450 Fe^{3+} mediante el desplazamiento del pico de 450 nm a 390 nm o en donde se detecta la conversión de citocromo P450 Fe^{3+} en citocromo P450 Fe^{2+} mediante el desplazamiento del pico de 390 nm a 450 nm entre el primer punto temporal y el segundo punto temporal.
11. Un dispositivo adecuado para determinar el contenido y/o el estado de oxidación del citocromo P450 en una muestra que comprende un sensor de fibra óptica que se encuentra modificado en una superficie de detección de dicho sensor con nanopartículas de plata inmovilizadas sobre dicha superficie y en donde las nanopartículas de plata se encuentran modificadas por un ligando capaz de unirse a citocromo P450.
12. El dispositivo según la reivindicación 6 que comprende adicionalmente una fuente de luz capaz de emitir luz en un rango de longitud de onda centrado en torno a 450 nm a lo largo de la fibra óptica.
13. El dispositivo según las reivindicaciones 6 o 7 que comprende adicionalmente un detector capaz de detectar el espectro de absorción de las nanopartículas en un rango de longitudes centrado en torno a 450 nm.

- 5 14. El dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 en donde el ligando capaz de unirse a citocromo P450 se selecciona del grupo formado por un anticuerpo anti-citocromo P450, un aptámero que se une de manera específica a un citocromo P450 o por una molécula que contiene grupos reactivos capaces de reaccionar con el grupo hemo.
15. El dispositivo según la reivindicación 14 en donde el reactivo capaz de reaccionar de manera específica con el grupo hemo contiene al menos un grupo carboxilo terminal.
- 10 16. El dispositivo según la reivindicación 15 en donde el reactivo que contiene grupos carboxilos terminales es un ácido carboxílico de al menos 2 átomos de carbono
- 15 17. El dispositivo según la reivindicación 16 en donde el ácido carboxílico contiene un grupo tiol.
18. El dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en donde el extremo de la fibra óptica sobre el que se encuentran inmovilizadas las nanopartículas es sustancialmente plano.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ②① N.º solicitud: 202330806
②② Fecha de presentación de la solicitud:
26.09.2023
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. cl.: **G01N21/41** (2006.01)
G01N21/01 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	ORTEGA-GOMEZ, A. <i>et al.</i> Cytochrome c detection by plasmonic nanospectroscopy on optical fiber facets. <i>Sensors and Actuators B: Chemical</i> . Marzo 2021, Vol. 330, nº artículo 129358, ISSN 0925-4005, <DOI: doi: 10.1016/j.snb.2020.129358>, resumen; página 2, columna derecha, último párrafo- página 3, columna izquierda, segundo párrafo; página 2, columna izquierda, quinto párrafo; página 2, columna derecha, segundo, tercer, párrafo; página 3, columna izquierda, cuarto párrafo; página 3, columna derecha, segundo, tercer párrafo; véase página 3, columna izquierda, último párrafo - página 3, columna derecha, primer párrafo.	1-18
Y	ZHAO, J. <i>et al.</i> Resonance surface plasmon spectroscopy: Low molecular weight substrate binding to cytochrome P450. <i>Journal of the American Chemical Society</i> . Agosto 2006, Vol. 128, Nº 34, páginas 11004-11005, ISSN 0002-7863 (print) ISSN 1520-5126 (electronic), <DOI: doi:10.1021/ja0636082>. página 11004, columna derecha, segundo párrafo; página 11004, columna izquierda, último párrafo.	1-18
Y	CN 108613950 A (UNIV JINAN) 02/10/2018, (resumen) (en línea) (recuperado el 10/07/2024) recuperado de EPO EPODOC Database.	1
A	GARZÓN, V. <i>et al.</i> Optical biosensors for therapeutic drug monitoring. <i>Biosensors</i> . Diciembre. 2019, Vol. 9, Nº 4, páginas 1-26, ISSN 2079-6374 (print), <DOI:10.3390/bios9040132>. página 9, segundo párrafo – página 11, tercer párrafo.	1-18
A	KIM, D. M. <i>et al.</i> Biosensing applications using nanostructure-based localized surface plasmon resonance sensors. <i>Sensors</i> . Mayo 2021, Vol. 21, Nº 9, nº artículo 3191, ISSN 1424-8220 (print), <DOI:10.3390/s21093191>. página 1, primer párrafo; página 3, tercer párrafo; página 5, tercer párrafo; página 9, último párrafo.	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
16.07.2024

Examinador
S. González Peñalba

Página
1/2

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, BIOSIS, MEDLINE, NPL, MEDLINE, INTERNET.