

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 034 438**

51 Int. Cl.:

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/544 (2006.01)

G01N 33/548 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.09.2020 PCT/EP2020/075013**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.03.2021 WO21048087**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2020 E 20768572 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2025 EP 4028764**

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

30 Prioridad:

09.09.2019 ES 201930784

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.08.2025

73 Titular/es:

**UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS (50.00%)
Carretera de Valldemossa, km 7.5
07122 Palma de Mallorca (Islas Baleares), ES y
FUNDACIÓ INSTITUT D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA ILLES BALEARS (50.00%)**

72 Inventor/es:

**DE LA RICA QUESADA, ROBERTO;
ALBA PATIÑO, FRANCY ALEJANDRA y
ADROVER JAUME, CRISTINA**

74 Agente/Representante:

BERTRÁN VALLS, Silvia

ES 3 034 438 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

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 depósito que contiene nanopartículas decoradas con proteína capaces de establecer interacciones biológicas obtenido mediante el procedimiento y a su uso en biosensores hechos de papel.

Antecedentes de la técnica

El papel de filtro es el sustrato de elección para desarrollar biosensores desechables debido a su ligero peso, bajo precio y fácil eliminación (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). Está disponible comercialmente en un amplio repertorio de tamaños de poro y puede modificarse fácilmente con biomoléculas siguiendo métodos de adsorción física o 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 puede usarse para almacenar reactivos tales como enzimas y sus sustratos para fabricar depósitos 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 depósitos han de conservar las propiedades fisicoquímicas de los reactivos constituyentes a lo largo del tiempo mientras que también se aseguren una liberación eficiente de su contenido a otras zonas del papel tras la adición de líquido. Las nanopartículas plasmónicas son elementos estructurales extremadamente útiles para la 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) y la espectroscopia Raman mejorada en la superficie (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 de manera irreversible sobre sustratos de papel tras el secado, lo que dificulta su almacenamiento en depósitos hechos de 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 depósitos 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 enfoque no es del todo compatible con diseños de biosensores tales como los dispositivos analíticos basados en papel de origami. Estos biosensores están hechos en su totalidad de papel con el propósito 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 y Crooks, Three-dimensional paper microfluidic devices assembled using the principles of origami. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 17564–17566).

Anteriormente, se ha usado PSS para evitar la floculación de nanopartículas, normalmente en forma de capas alternas 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 soporte 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 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 usa 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).

El documento de patente US 2019/118175 divulga un dispositivo analítico microfluídico basado en papel que comprende un papel con patrón formado químicamente que comprende micropartículas recubiertas con proteína.

La liberación de nanopartículas almacenadas en sustrato de papel no modificados no se ha caracterizado en su totalidad (Chen *et al.* Three-dimensional origami paper-based device for portable immunoassay applications. Lab

Chip 2019, 19, 598–607) y en algunos casos se ha informado de que son altamente ineficientes (Ruivo *et al.*, 2017).

Por tanto, sería deseable descubrir un procedimiento para el almacenamiento de nanopartículas en sustratos de papel y su liberación con alta eficiencia bajo demanda para que así puedan implementarse en dispositivos analíticos en 2D y 3D hechos de papel.

Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de un depósito que comprende nanopartículas decoradas con proteína en sustratos de papel que comprende las etapas de:

- i. tratamiento de un sustrato de papel con un polímero hidrófilo cargado negativamente sobre el sustrato de papel; y
- ii. aplicación de nanopartículas decoradas con proteína sobre el sustrato de papel modificado con polímero hidrófilo cargado negativamente obtenido en la etapa (i).

En otra realización, la invención se refiere al procedimiento tal como se definió anteriormente, en el que el polímero es sulfonato de poliestireno (PSS).

En otra realización, la invención se refiere al procedimiento tal como se definió anteriormente, en el que la proteína es una proteína capaz de establecer interacciones biológicas, preferiblemente en el que la proteína es avidina o un anticuerpo.

En otra realización, la invención se refiere al procedimiento tal como se definió anteriormente, en el que la proteína es una proteína capaz de establecer interacciones biológicas y la proteína es avidina.

En otra realización, la invención se refiere al procedimiento tal como se definió anteriormente, en el que la proteína es una proteína capaz de establecer interacciones biológicas y la proteína es un anticuerpo.

En otra realización, la invención se refiere al procedimiento tal como se definió anteriormente, en el que las nanopartículas son nanopartículas pegiladas.

En otra realización, la invención se refiere al procedimiento tal como se definió anteriormente, en el que las nanopartículas pegiladas son nanopartículas pegiladas hechas de oro.

En otra realización, la invención se refiere al procedimiento tal como se definió anteriormente, en el que el tratamiento de la etapa (i) se realiza depositando una gota de polímero, y preferiblemente de PSS, sobre partes del sustrato de papel.

En otra realización, la invención se refiere al procedimiento tal como se definió anteriormente, en el que las partes del sustrato de papel de la etapa (i) se cortan en forma de cuadrados.

En otra realización, la invención se refiere al procedimiento tal como se definió anteriormente, en el que el volumen del polímero añadido, preferiblemente del PSS añadido, es lo suficientemente grande como para crear un volumen de papel modificado con polímero más grande que el volumen que ocuparán las nanopartículas pegiladas.

En otra realización, la invención se refiere al procedimiento tal como se definió anteriormente, en el que el volumen del polímero añadido, preferiblemente del PSS añadido, es de 50 ml y el volumen de nanopartículas pegiladas, preferiblemente de nanopartículas pegiladas hechas de oro, es de 1 µl.

En otra realización, la invención se refiere al procedimiento tal como se definió anteriormente, que comprende además la etapa (iii) de secar el papel después de la etapa (i), y preferiblemente en el que la etapa (iii) de secado se realiza a una temperatura de desde 15 °C hasta 50 °C.

En otra realización, la invención se refiere al procedimiento tal como se definió anteriormente, que comprende además la etapa (iv) de dejar secar el papel después de la etapa (ii), y preferiblemente en el que la etapa (iv) de secado se realiza a una temperatura de desde 15 °C hasta 25 °C.

En otra realización, la invención se refiere al procedimiento tal como se definió anteriormente, que comprende además la etapa (v) de liberar las nanopartículas del depósito.

En otra realización, la invención se refiere al procedimiento tal como se definió anteriormente, en el que la etapa de liberación (v) es una etapa de transferencia a un sustrato receptor, y preferiblemente a un sustrato de papel receptor húmedo o a un sustrato receptor de polipropileno.

En otra realización, la invención se refiere al procedimiento tal como se definió anteriormente, en el que la etapa de transferencia (v) se realiza mediante presión, preferiblemente mediante presión con un dedo, una prensa o una abrazadera, y más preferiblemente mediante presión en el centro de la mancha durante al menos 4 minutos.

La transferencia de nanopartículas al depósito puede ajustarse para que suceda de manera preferente en los bordes o de manera homogénea por todo el depósito mediante el ajuste fino del % de PSS y de la concentración de nanopartículas; por ejemplo, cuando el % de PSS está comprendido entre el 1,9 y el 7,5 % y la concentración de nanopartículas es de 72 nM, entonces se favorece la transferencia desde los bordes, y cuando el % de PSS es del 30 % y la concentración de nanopartículas es de 210 nM o más, se obtiene una transferencia homogénea de nanopartículas hacia los sustratos receptores.

Por tanto, en otra realización, la invención se refiere al procedimiento tal como se definió anteriormente, en el que la etapa de transferencia (v) se ajusta mediante el ajuste fino del contenido de PSS y de la concentración de nanopartículas, preferiblemente de nanopartículas pegiladas o de nanopartículas pegiladas hechas de oro.

En otra realización, la invención se refiere al procedimiento tal como se definió anteriormente, en el que la etapa de transferencia (v) se ajusta mediante el ajuste fino del contenido de PSS entre el 1,9 y el 7,5 % y a una concentración de nanopartículas pegiladas hechas de oro de 72 nM.

En otra realización, la invención se refiere al procedimiento tal como se definió anteriormente, en el que la etapa de transferencia (v) se ajusta mediante el ajuste fino del contenido de PSS al 30 % y a una concentración de nanopartículas pegiladas hechas de oro de al menos 210 nM.

En otra realización, la invención se refiere al procedimiento tal como se definió anteriormente, en el que el sustrato de papel receptor de la etapa (v) se ha modificado con un ligando biológico, preferiblemente albúmina sérica bovina (ASB) modificada con biotina y saturada con solución salina tamponada con fosfato con Tween-20 (PBST), que interacciona específicamente con una proteína receptora, preferiblemente con avidina, unida a las nanopartículas.

En otra realización, la invención se refiere al procedimiento tal como se definió anteriormente, en el que la proteína, preferiblemente avidina o un anticuerpo, unida a las nanopartículas establece interacciones biológicas con una diana, preferiblemente biotina o antígenos, unida al sustrato receptor, preferiblemente al sustrato de papel húmedo o al sustrato de polipropileno, en la etapa (v).

En otra realización, la invención se refiere al procedimiento tal como se definió anteriormente, que comprende además una etapa (vi) de retirar el depósito después de realizar la etapa (v) y retirar los reactivos en exceso, y preferiblemente en el que la etapa (vi) se realiza mediante de 3 a 5 lavados con PBST.

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

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere al uso del depósito de nanopartículas decoradas con proteína tal como se definió anteriormente en la preparación de biosensores hechos de papel.

La presente invención introduce un nuevo enfoque para la fabricación de depósitos de nanopartículas en papel de filtro. Este consiste en modificar los sustratos de papel con el polímero cargado negativamente sulfonato de poliestireno (PSS) para evitar la unión irreversible de nanopartículas pegiladas a la matriz de celulosa (figura 1A). Los depósitos preparados de esta manera pueden liberar nanopartículas con alta eficiencia.

Según la invención, el PSS es útil para evitar la unión irreversible de nanopartículas a matrices de celulosa. Además de permitir la liberación de nanopartículas de las matrices de celulosa bajo demanda, el PSS también posibilita la transferencia de nanopartículas desde el depósito seco hasta un sustrato de papel receptor húmedo simplemente mediante presión del primero contra el segundo (figura 1B). Esto hace que los depósitos propuestos sean útiles para el desarrollo de biosensores con esquemas simplificados de manipulación de líquidos, ya que no hay necesidad de añadir un volumen controlado de tampón al depósito para transferir su contenido a una zona de detección. Además, las nanopartículas modificadas con proteína (avidina, anticuerpos) mantienen su capacidad para reconocer específicamente su diana (biotina, antígenos) inmovilizada en la parte receptora del papel de manera dependiente de la dosis, lo cual demuestra la idoneidad de este enfoque para el desarrollo de biosensores (figura 1C).

En este caso, se ha introducido 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 una gota de nanopartículas sobre partes del papel de filtro previamente modificado con sulfonato de poliestireno (PSS). Las nanopartículas de oro modificadas con avidina pueden transferirse fácilmente desde el depósito seco hasta la parte receptora húmeda del papel simplemente mediante presión con un dedo. Además, las nanosondas pueden establecer interacciones avidina-biotina bioespecíficas con moléculas unidas a sustrato, lo cual hace que los depósitos sean adecuados para la fabricación de biosensores basados en nanopartículas. El ajuste del % de PSS y de la concentración de nanopartículas en los depósitos permite una transferencia homogénea entre capas de papel

sin la formación de “anillos de café”. Estas características hacen que el procedimiento de la invención sea ideal para el desarrollo de biosensores de origami hechos de papel de filtro y la incorporación de mecanismos de generación de señales basados en nanosondas.

- 5 Los depósitos que propone esta invención son fáciles de fabricar, tienen una vida útil larga y evitan los inconvenientes típicos asociados con los biosensores de papel, tales como la generación de señales colorimétricas con parches. Estas características hacen que sean ideales para la fabricación de biosensores hechos de papel.

10 En resumen, la presente invención describe un procedimiento para almacenar nanopartículas modificadas con PEG y proteínas en papel de filtro cuando el papel de filtro se trata previamente con PSS. Este tratamiento con PSS evita interacciones irreversibles con el papel, lo que permite la completa liberación de nanopartículas al añadir una disolución acuosa. También permite la transferencia de nanopartículas desde el depósito hasta un sustrato receptor mediante presión con un dedo de una hoja de papel contra la otra. El ajuste fino del % de PSS evita la formación de “anillos de café” tanto en el depósito como en el sustrato receptor. Esto conduce a señales colorimétricas
15 homogéneamente distribuidas que resultan de interacciones biomoleculares entre las nanosondas y las moléculas unidas a sustrato. La presencia de PSS en el depósito no interfiere con la generación de interacciones avidina-biotina o anticuerpo-antígeno, y conserva las nanosondas durante al menos un mes. Estas características hacen que los depósitos propuestos sean ideales para la fabricación de biosensores hechos íntegramente de papel que incorporan nanosondas decoradas con biomoléculas.

20 A lo largo de la presente invención, el término “polímero hidrófilo cargado negativamente” se refiere a polímeros que establecen interacciones termodinámicamente favorables con el agua y que contienen grupos que pueden desprotonarse para producir restos cargados negativamente. Los ejemplos incluyen, entre otros, sulfonato de poliestireno (PSS), poli(ácido glutámico) y ácidos nucleicos.

25 “Una proteína capaz de establecer interacciones biológicas” se refiere a una proteína que interacciona con otra molécula mediante interacciones biomoleculares específicas. Los ejemplos incluyen, entre otras, interacciones avidina-biotina, interacciones estreptavidina-biotina, interacciones anticuerpo-antígeno, interacciones agonista-receptor, interacciones enzima-sustrato e interacciones enzima-inhibidor.

30 “Nanopartículas pegiladas” se refiere a nanopartículas modificadas con polietilenglicol (PEG). Los ejemplos incluyen, entre otras, nanopartículas metálicas o de óxido de metal modificadas con PEG (oro, plata, platino, óxido de hierro u óxido de zinc, entre otros), nanopartículas semiconductoras modificadas con PEG (por ejemplo, puntos cuánticos y nanopartículas de conversión ascendente, entre otros), liposomas y nanopartículas proteicas modificadas con
35 cubierta de PEG, y nanopartículas poliméricas que contienen PEG en sus capas externas.

El término “sustrato receptor” se refiere a cualquier material sólo al que pueden transferirse nanopartículas. El término incluye, entre otros, “sustratos de papel receptores húmedos” que se refieren a una parte del papel
40 humidificada con una disolución acuosa y “sustrato receptor de propileno”. Los ejemplos incluyen, entre otros, papel de filtro con diferentes tamaños de poro, celulosa bacteriana, nitrocelulosa, mascarillas de propileno, materiales textiles tales como algodón o poliéster, piel, tejidos animales, metales, obleas de silicio, elastómeros e hidrogeles.

Salvo que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención.
45 Para poner en práctica esta invención pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, no se pretende que el término “comprender” y sus variaciones excluyan otras características técnicas, aditivos, componentes, o etapas. Para los expertos en la técnica resultarán evidentes otros objetos, ventajas y características de la invención tras examinar la descripción, o pueden aprenderse poniendo en práctica la invención. Los ejemplos y dibujos siguientes se
50 proporcionan a modo de ilustración y no pretenden limitar la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

55 **FIGURA 1.** Representación esquemática del depósito de nanopartículas y del procedimiento para transferir su contenido a un sustrato de papel receptor; (A) el depósito de papel (i) contiene sulfonato de poliestireno (PSS) y nanopartículas de oro decoradas con proteínas; el sustrato receptor (ii) contiene ligandos adsorbidos físicamente; (B) tras colocar el depósito seco (i) en el sustrato receptor húmedo (ii) y presionar, por ejemplo, con un dedo, se transfieren las nanopartículas del primero al segundo; (C) tras limpiar los reactivos en exceso, las nanopartículas permanecen unidas al sustrato receptor (ii) mediante interacciones bioespecíficas (v).

60 **FIGURA 2.** Fabricación de depósitos de nanopartículas con diferentes % de PSS; (A) imágenes escaneadas de los depósitos antes (fila de arriba) y después (fila de abajo) de 3 lavados con 1 ml de PBST; (B) perfiles de intensidad de píxel (PI) a través de los depósitos; (C) señal colorimétrica (S) en el depósito antes (círculos) y después (cuadrados) de 3 lavados con PBST. Las barras de error son la desviación estándar ($n = 3$). Las líneas de tendencia son una
65 guía para la vista.

FIGURA 3. Fabricación de depósitos con el 30 % de PSS y diferentes concentraciones de nanopartículas decoradas con avidina; (A) imágenes escaneadas de los depósitos antes (fila de arriba) y después (fila de abajo) de 3 lavados con 1 ml de PBST; (B) perfiles de intensidad de píxel (PI) a través de los depósitos; (C) señal colorimétrica (S) en el depósito antes (círculos) y después (cuadrados) de 3 lavados con PBST. Las barras de error son la desviación estándar ($n = 3$). Las líneas de tendencia son una guía para la vista.

FIGURA 4. Transferencia de nanopartículas decoradas con avidina desde depósitos con diferentes % de PSS hasta sustratos receptores modificados con proteínas biotiniladas; (A) imágenes escaneadas de los sustratos receptores después de presionar los depósitos durante 4 minutos, retirarlos y lavarlos 3 veces con 1 ml de PBST; (B) perfiles de intensidad de píxel (PI) a través del sustrato receptor; (C) señal colorimétrica (S) en el sustrato de papel receptor. Las barras de error son la desviación estándar ($n = 3$). Las líneas de tendencia son una guía para la vista.

FIGURA 5. Transferencia dependiente del tiempo de nanopartículas decoradas con avidina desde depósitos que contienen un 30 % de PSS hasta sustratos receptores modificados con proteínas biotiniladas; (A) imágenes escaneadas de los sustratos receptores después de presionar los depósitos durante diferentes tiempos; (B) perfiles de intensidad de píxel (PI) a través del sustrato receptor; (C) señal colorimétrica (S) en el sustrato de papel receptor. Las líneas de tendencia son una guía para la vista.

FIGURA 6. Transferencia de nanopartículas decoradas con avidina almacenadas en diferentes concentraciones a sustratos de papel receptores con diferentes tamaños de poro (22, 11 y 3 mm en papel 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 (control); (B) señales colorimétricas en sustratos receptores hechos de papel Whatman #41 (triángulos), #6 (círculos) y #1 (cuadrados); los experimentos de control con ASB no biotinilada están indicados con líneas de puntos; (C) perfiles de intensidad de píxel (PI) a través de sustratos receptores hechos de papel Whatman #41. Las barras de error son la desviación estándar ($n = 3$). Las líneas de tendencia son una guía para la vista.

FIGURA 7. Variación de la señal colorimétrica (intensidad de píxel, PI) resultante de interacciones avidina-biotina bioespecíficas cuando se realiza el ensayo mediante el uso de depósitos secos de nanopartículas almacenados durante diferentes tiempos. El porcentaje de la señal se calculó con respecto a los depósitos almacenados durante 1 h. Las barras de error son la desviación estándar ($n = 3$).

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

FIGURA 9 Detección de *Pseudomonas aeruginosa* con nanopartículas decoradas con anticuerpos almacenadas en depósitos de papel (escala semilogarítmica). Las barras de error son la desviación estándar. La señal colorimétrica S es el número entero obtenido después de restar la intensidad de píxel del fondo de la intensidad de píxel de la región de interés.

FIGURA 10. Detección de IgG de conejo (puntos) y ASB (triángulos) en mascarillas de polipropileno con nanopartículas decoradas con anticuerpo anti-IgG de conejo almacenadas en depósitos de papel. Las barras de error son la desviación estándar. La señal colorimétrica S es el número entero obtenido después de restar la intensidad de píxel del fondo de la intensidad de píxel de la región de interés.

EJEMPLOS

Síntesis y modificación de nanopartículas de oro con polietilenglicol y avidina: Se sintetizaron nanopartículas de oro ocupadas en los extremos con citrato con un diámetro de aproximadamente 40 nm con 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 restos carboxilato (ácido polietilenglicol-2-mercaptoetil éter-acético, Mn 2100, Sigma) durante la noche. Se concentraron las nanopartículas pegiladas resultantes y se lavaron 5 veces con agua a través de centrifugación a 8000 rpm durante 6 min. Finalmente, se suspendieron las nanopartículas en ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES, Sigma) 0,5 M ajustado a pH 5,5. A continuación, se transformaron los restos carboxilato alrededor de las nanopartículas en ésteres de sulfo-NHS añadiendo 1 mg de clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC, Sigma) y 2 mg de sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS, Sigma) durante 20 min. Seguidamente, se sedimentaron las nanopartículas por medio de centrifugación y se substituyó el sobrenadante por una disolución que contenía 1 mg·ml⁻¹ de avidina en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4. Tras 1 h, se ocuparon en los extremos los ésteres de sulfo-NHS sin reaccionar con glicina 0,1 M y 10 mg·ml⁻¹ de albúmina sérica bovina (ASB) durante 30 min. Después, se lavaron las nanopartículas 5 veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía un 0,1 % de Tween-20 (PBST). Se mantuvieron las nanopartículas cubiertas con avidina resultantes a 4 °C hasta su uso. Se obtuvieron nanopartículas modificadas con anticuerpos mediante la incubación durante 1 h de anticuerpos biotinilados con las nanopartículas cubiertas con avidina, seguido por de la eliminación por lavado de los reactivos en exceso a través

de 3 etapas de centrifugación.

Densitometría: Las nanopartículas de oro sobre sustratos de papel generan señales colorimétricas dependientes de la concentración que pueden evaluarse con densitometría de la siguiente manera. En primer lugar, se escanearon los 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. En primer lugar, se midió la intensidad de píxel en escala de grises en un área circular dentro del área de interés con la función *Histogram* de ImageJ. Se tomó la señal colorimétrica S como el valor entero después de restar la señal de fondo. Obsérvese que la resta de la intensidad píxel del fondo produce señales invertidas en comparación con los datos sin procesar.

Fabricación de los depósitos de nanopartículas: Se usó papel de filtro Whatman números 41, 1 y 6 (diámetro de poro de 20-25, 11 y 3 mm, respectivamente). Se cortó el papel en cuadrados y se modificó con 50 ml de sulfonato de poliestireno (PSS, 30 %, Sigma) diluido con agua a un % (v/v) diferente cuando se requería. Tras el secado, se añadió 1 ml de nanopartículas de oro pegiladas modificadas con avidina, y se dejó secar a temperatura ambiente. Para estudiar la liberación de las nanopartículas de los depósitos, se colocaron los sustratos de papel secos modificados con nanopartículas encima de una pieza doblada de papel de filtro y se añadió 3 veces 1 ml de PBST. Se evaluó la presencia de nanopartículas tras esta etapa dejando secar el papel y midiendo con densitometría cualquier cambio de color en el depósito de nanopartículas.

Transferencia de nanopartículas y biorreconocimiento: la transferencia de nanopartículas del depósito al sustrato de papel receptor se estudió con el siguiente procedimiento. Se modificaron los sustratos de papel receptores con 2 ml de ASB biotinilada ($100 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ en PBS) o con antígenos en las diferentes concentraciones expuestas en la figura 8. Se obtuvo ASB biotinilada con un kit de biotinilación de sulfo-NHS EZ-Link™ (Thermo Scientific). Se realizaron experimentos de control con ABS no biotinilada para evaluar la contribución de las interacciones no específicas a la señal colorimétrica. Tras el secado, se añadió 1 ml de PBS suplementado con $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ de ASB (PBS-ASB). A continuación, se colocó el depósito encima del papel receptor húmedo y se facilitó la transferencia de nanopartículas mediante presión en el centro de la mancha durante 4 min. Posteriormente, se retiró el depósito y se lavó 3 veces el sustrato receptor con PBST para eliminar interacciones no específicas. Tras el secado, se evaluó la señal colorimétrica con densitometría tal 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 una alta eficiencia. Para estudiar esto, se cortó el papel de filtro en cuadrados y posteriormente se añadieron 50 ml de PSS en diferentes diluciones y se dejaron secar. Los sustratos de papel con un tamaño de poro de 22 mm (Whatman #41) permanecieron mayormente planos con todas las concentraciones de PSS, por lo que, posteriormente, se usaron para la fabricación de los depósitos de nanopartículas. Estos se obtuvieron pipeteando 1 ml 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 siguiendo el método de Turkevich, el cual las deja ocupa en los extremos con moléculas de citrato cargadas negativamente. Para evitar la agregación de nanopartículas en disoluciones que contienen cationes o proteínas altamente concentrados, se suelen sustituir las moléculas de citrato por moléculas 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 sólo evita la agregación de nanopartículas sino que también permite la introducción de grupos reactivos, como restos carboxilato, para una unión más covalente con biomoléculas. Con esto en mente, se ha estudiado la fabricación de depósitos que contienen sondas de nanopartículas pegiladas modificadas con avidina a través de la formación de enlaces amida. La figura 2A (fila de arriba) muestra imágenes de los depósitos 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 puede observarse en los perfiles de intensidad de píxel obtenidos a partir de estas imágenes 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 través del depósito se reduce al aumentar el % de PSS. El diámetro de la mancha sigue la misma tendencia. Esto indica que las nanopartículas se encuentran en concentraciones mayores y dentro de un volumen más pequeño en la matriz del papel al aumentar el % de PSS. Por tanto, la formación de estos depósitos de nanopartículas más pequeños y más concentrados está relacionada con una difusión más lenta de las nanopartículas dentro de la matriz de celulosa. Está bien establecido que la viscosidad de una disolución aumenta al aumentar la concentración de PSS (Boris y 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, un PSS altamente concentrado reduce la difusión radial y da como resultado manchas más pequeñas que contienen nanopartículas a una concentración mayor. Obsérvese que aunque el PSS proporciona 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 dentro del depósito. Por ejemplo, en la figura 2B la intensidad de píxel fuera del área de nanopartículas se reduce desde 254 hasta 234 debido a la modificación con el 30 % de PSS, pero se reduce mucho más en el centro del depósito, donde se encuentran las nanopartículas ($IP \approx 62$). Esto significa que la contribución principal a los cambios de color observados es una mayor concentración de nanopartículas en el depósito y no la adición de

PSS. En la figura 2B, también se observa que la intensidad de píxel es más baja en el borde del depósito que en el centro. Esto se atribuye a una mayor concentración de nanopartículas en el borde de las manchas debido a una distribución desigual de los solutos durante el procedimiento del secado (el denominado “efecto de 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 depósito, que es un requisito importante para la integración de depósitos en biosensores. Con este fin, se añadió a los depósitos 1 ml de PBST en 3 ocasiones. En la figura 2A (fila de abajo) el color no cambia en 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 progresivamente, lo cual indica que las nanopartículas salen del depósito más eficientemente cuando el % de PSS en el depósito es mayor. Estos experimentos demuestran que el PSS evita la formación de interacciones irreversibles entre las nanopartículas y la matriz de papel. En la figura 2C, la cuantificación de señales con densitometría muestra que no queda color en el depósito cuando el % de PSS usado para la fabricación del depósito es del 15 % o más, lo que sugiere, en estas condiciones, la liberación completa de nanopartículas modificadas con avidina. En resumen, los resultados mostrados en la figura 2 demuestran que es posible almacenar nanopartículas pegiladas modificadas con proteínas en una parte seca del papel modificado previamente con PSS y, que las nanopartículas pueden liberarse bajo demanda añadiendo simplemente una disolución acuosa.

A continuación, se ha demostrado que la concentración de nanopartículas tiene un impacto sobre la fabricación de un depósito basado en papel que contiene nanopartículas de oro modificadas con avidina. Con este fin, se pipetearon 1 ml 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 depósito observado en la figura 2 puede evitarse cuando las nanopartículas se dispensan 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). Para estudiar el efecto de la concentración de nanopartículas en la liberación del contenido de la matriz de celulosa modificada con PSS, se lavaron los depósitos con PBST como antes y se midió la señal colorimétrica que queda con densitometría. En la fila inferior de la figura 3A y en la figura 3C, la señal colorimétrica que queda es muy baja en todas las concentraciones sometidas a ensayo. Sólo puede detectarse un ligero aumento en el color en la concentración más alta de nanopartículas sometida a ensayo. Esto indica que un 30 % de PSS es efectivo para evitar las interacciones irreversibles con el papel incluso cuando los depósitos contienen una alta concentración de nanopartículas de oro. En resumen, los experimentos en la figura 3 indican que los mejores parámetros de fabricación para la obtención de depósitos con los métodos propuestos son un 30 % de PSS y nanopartículas de oro con una concentración de 140-210 nM. En estas condiciones, las nanopartículas dentro del depósito se distribuyen uniformemente (es decir, no hay anillos de café) y hay una liberación completa de coloides desde el depósito (no quedan restos de color en el depósito de papel).

Tras el estudio de las mejores condiciones para el almacenamiento y la liberación de nanopartículas en celulosa, se sometió a prueba la capacidad de transferencia de los coloides del depósito seco a un papel receptor húmedo mediante presión del primero contra el segundo (figura 1B). De manera simultánea, se sometió a prueba si la avidina de alrededor de las nanopartículas todavía podía unirse a las moléculas biotiniladas en el sustrato receptor. Dicho de otro modo, 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 depósitos secos se presionaron contra un sustrato de papel receptor modificado con ASB biotinilada y saturado con PBST. Esto transfirió líquido desde el papel receptor húmedo hasta el depósito de papel seco. La rehidratación resultante del depósito permitió que las nanopartículas se transfirieran desde el depósito hasta el sustrato receptor. Tras desprender el depósito, se evaluó la presencia de nanopartículas unidas al sustrato de papel receptor mediante interacciones avidina-biotina después de lavarlo 3 veces con PBST. La figura 4A muestra imágenes del sustrato receptor cuando el depósito estaba hecho con la misma concentración de nanopartículas (72 nM) pero diferente % de PSS. En estas imágenes, el color de la mancha se distribuye de manera más homogénea e intensa a medida que el % de PSS aumenta. De hecho, con un bajo % de PSS sólo se genera un anillo de nanopartículas, que se llena progresivamente para dar una mancha coloreada a 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 dentro de la región de interés. Se ha propuesto que podría haber dos mecanismos para la transferencia de nanopartículas que podrían dar lugar a la formación de un anillo. El primer mecanismo implica que, con un % de PSS bajo, las nanopartículas se difunden radialmente y se acumulan en los bordes tras ser transferidas, mientras que con un % de PSS alto, las nanopartículas se difunden radialmente en menor medida y se transfieren de manera homogénea al papel receptor. Esto podría dar como resultado nanopartículas más concentradas en el centro de la mancha al aumentar el % de PSS, de acuerdo con las observaciones en la figura 4. En la segunda hipótesis, las nanopartículas se transfieren preferiblemente desde los bordes del depósito al sustrato de papel receptor. Es decir, se genera en primer lugar un anillo que, posteriormente, se llena con más nanopartículas. Para discernir qué mecanismo gobierna sobre la transferencia de nanopartículas del depósito al papel receptor, se repitieron los mismos experimentos con depósitos hechos con la concentración más alta de PSS (30 %) pero con diferente tiempo de contacto entre las capas de papel. En la figura 5 A y B las nanopartículas se transfieren como un anillo cuando se aplican tiempos de transferencia cortos incluso cuando el % de PSS es alto. 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 depósito durante las primeras fases del procedimiento de nanopartículas. Por tanto, se ha propuesto que las nanopartículas y el PSS se transfieren preferiblemente desde los bordes del depósito. Esto genera una barrera de difusión que da como resultado la transferencia posterior de polímeros y nanomateriales en el área central del papel receptor, de acuerdo con la segunda hipótesis propuesta anteriormente. A continuación, se demuestra que la concentración de nanopartículas y el tipo de papel tienen un impacto sobre la generación de señales específicas y no específicas para las aplicaciones de biodetección.

La figura 6 muestra el efecto del tamaño de poro del papel receptor en la generación de señales colorimétricas cuando los depósitos se cargan con un 30 % de PSS y diferentes concentraciones de nanopartículas de oro inyectadas con avidina. Se evaluaron las interacciones no específicas con ASB no biotinilada (carriles en la fila inferior 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, el papel Whatman #6 y #1 da como resultado más interacciones no específicas en comparación con el papel 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 dentro de la señal colorimétrica se distribuye de manera homogénea (es decir, sin formación de anillos) cuando la concentración de nanopartículas en el depósito es de 140 nM o más en papel Whatman #41. Estos resultados, junto a los obtenidos en la figura 4, indican que los depósitos basados en papel y que contienen un 30 % de PSS y 140 nM de sondas de nanopartículas son los mejores candidatos para la generación homogénea y altamente intensa de señales plasmónicas en biosensores.

Además de ser capaces de transferir nanopartículas modificadas con biomoléculas, los depósitos que contienen nanosondas biomoleculares deberían ser capaces de almacenarlas en condiciones de sequedad durante largos periodos de tiempo. Esto es particularmente importante para la incorporación de los depósitos en biosensores destinados a aplicaciones en campo, ya que no siempre es posible almacenarlos en condiciones ideales (es decir, baja temperatura, condiciones de sequedad). Para someter a prueba la vida útil de los depósitos propuestos, se almacenaron durante hasta un mes sustratos de papel modificados con un 30 % de PSS y 140 nM de nanopartículas de oro modificadas con avidina. Se guardaron los depósitos en un sobre a temperatura ambiente. Con el objetivo de conservar las sondas, no se añadieron conservantes ni se tomaron medidas adicionales, tales como liofilización o almacenamiento con gel de sílice. Posteriormente, se realizaron experimentos tanto con ASB biotinilada como sin biotinilar para evaluar la capacidad de las nanopartículas para establecer interacciones bioespecíficas tras almacenarse en los depósitos de papel durante distintos periodos de tiempo. La figura 7 muestra el % de la señal colorimétrica que queda en comparación con depósitos usados en el plazo de 1 h después de su fabricación. En esta figura, la señal nunca baja del 85 % del original, lo cual demuestra que el método propuesto es útil para la fabricación de biosensores con una larga vida útil sin la necesidad de imponer unas condiciones de almacenamiento sujetas a temperatura o humedad estrictas.

Finalmente, se ha demostrado que los depósitos que contienen nanopartículas modificadas con anticuerpos podrían usarse para detectar específicamente antígenos inmovilizados en sustratos de papel con diferentes concentraciones. Con este fin, se modificó el sustrato de papel receptor con una gota de *E. coli* o bien de glicoproteína B y se dejó secar. Tras bloquear y añadir PBST, se colocaron los depósitos encima y se presionaron contra el sustrato receptor durante 5 min. Tras desprender y lavar el depósito, se calculó el aumento de la intensidad de píxel. En la figura 8, los gráficos de calibración muestran que la señal colorimétrica aumenta al aumentar la concentración de antígeno, lo cual demuestra que los depósitos propuestos pueden usarse para almacenar y liberar nanopartículas modificadas con anticuerpos, y que los anticuerpos retienen sus funciones de biorreconocimiento tras haber sido almacenados en el depósito. También se realizaron experimentos para detectar *Pseudomonas aeruginosa* con el mismo procedimiento pero usando nanopartículas modificadas con anticuerpos contra este patógeno. Los resultados se muestran en la figura 9. También se realizaron experimentos adicionales para demostrar que las nanopartículas decoradas con anticuerpos pueden transferirse desde depósitos de papel hasta sustratos que no están hechos de papel. Con este fin, se pulverizó un analito modelo (IgG de conejo) sobre una mascarilla de calidad clínica. Después se retiró la capa interna de polipropileno y se detectó la presencia de IgG de conejo con el mismo método usado para detectar *E. coli*, *P. aeruginosa* y glicoproteína B pero usando depósitos que contienen nanopartículas modificadas con anticuerpo anti-IgG de conejo. En la figura 10, las mascarillas que se pulverizaron con IgG de conejo producen señales dependientes de la dosis que son mayores que las obtenidas en experimentos de control realizados pulverizando ASB. Estos experimentos demuestran que las nanopartículas decoradas con anticuerpos pueden transferirse a mascarillas de polipropileno, donde son capaces de establecer interacciones anticuerpo-antígeno específicas.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la obtención de un depósito que comprende nanopartículas decoradas con proteína en sustratos de papel que comprende las etapas de:
 - i. tratamiento de un sustrato de papel con un polímero hidrófilo cargado negativamente sobre el sustrato de papel; y
 - ii. aplicación de nanopartículas decoradas con proteína sobre el sustrato de papel modificado con polímero hidrófilo cargado negativamente obtenido en la etapa (i).
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el polímero hidrófilo cargado negativamente es sulfonato de poliestireno (PSS).
3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la proteína es una proteína capaz de establecer interacciones biológicas.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que la proteína es avidina o un anticuerpo.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las nanopartículas son nanopartículas pegiladas.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el tratamiento de la etapa (i) se realiza depositando una gota de polímero sobre partes del sustrato de papel.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además la etapa (iii) de secar el papel después de la etapa (i).
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además la etapa (iv) de dejar secar el papel después de la etapa (ii).
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además la etapa (v) de liberar las nanopartículas del depósito.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que la etapa de liberación (v) es una etapa de transferencia a un sustrato receptor.
11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10, en el que la etapa de liberación (v) es una etapa de transferencia a un sustrato de papel receptor húmedo o a un sustrato receptor de polipropileno.
12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que la etapa de transferencia (v) se realiza mediante presión.
13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que la etapa de transferencia (v) se realiza mediante presión con un dedo, una prensa o una abrazadera.
14. Depósito que comprende nanopartículas decoradas con proteína en sustratos de papel obtenido mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
15. Uso del depósito de nanopartículas decoradas con proteína según la reivindicación 14 en la preparación de biosensores hechos de papel.

DIBUJOS

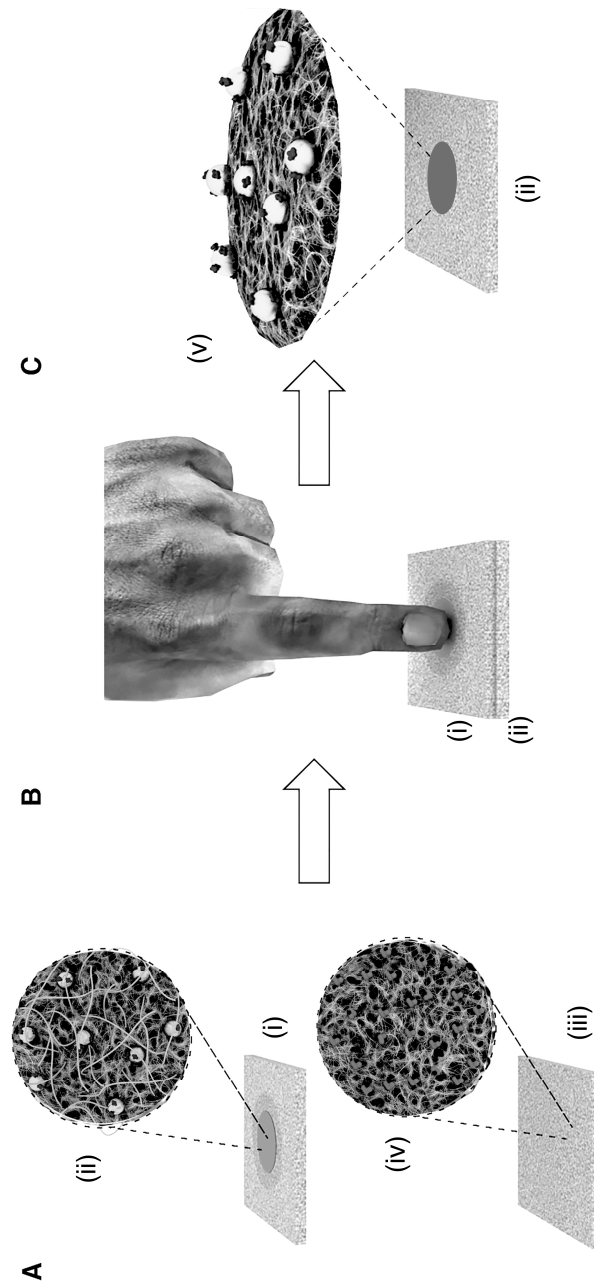


FIG. 1

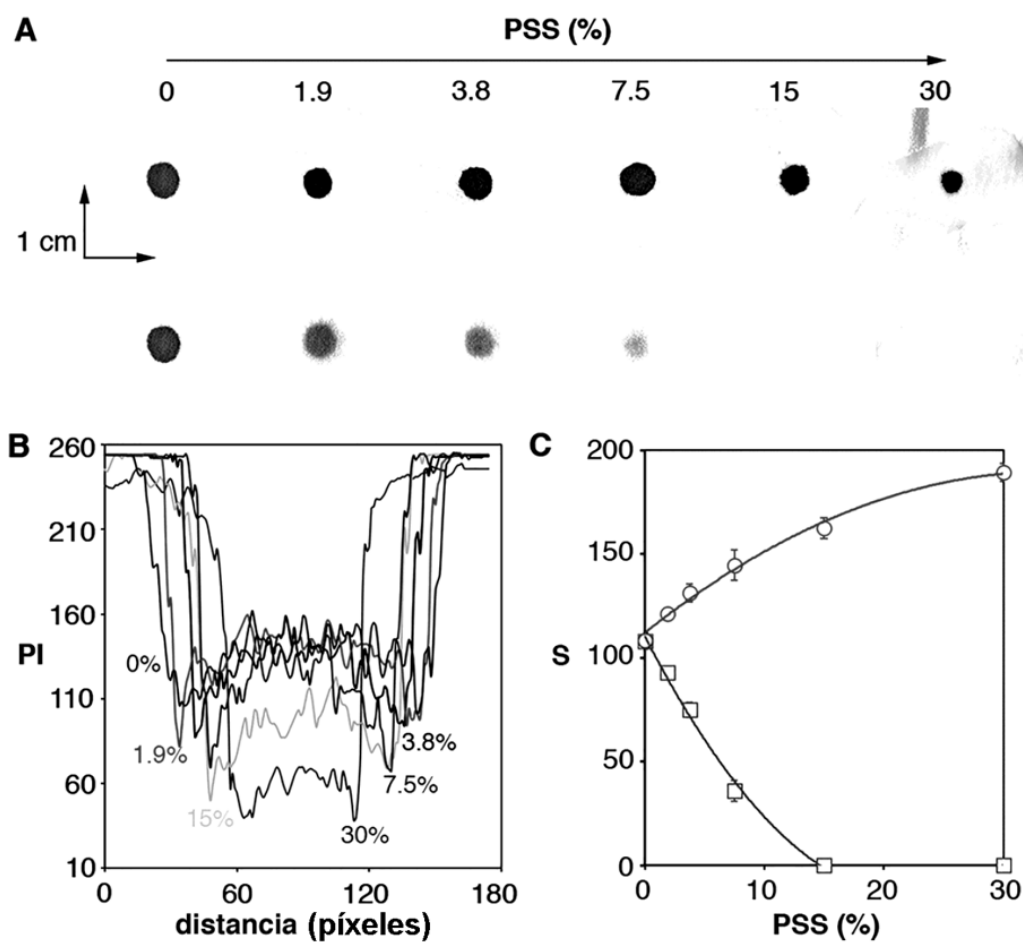


FIG. 2

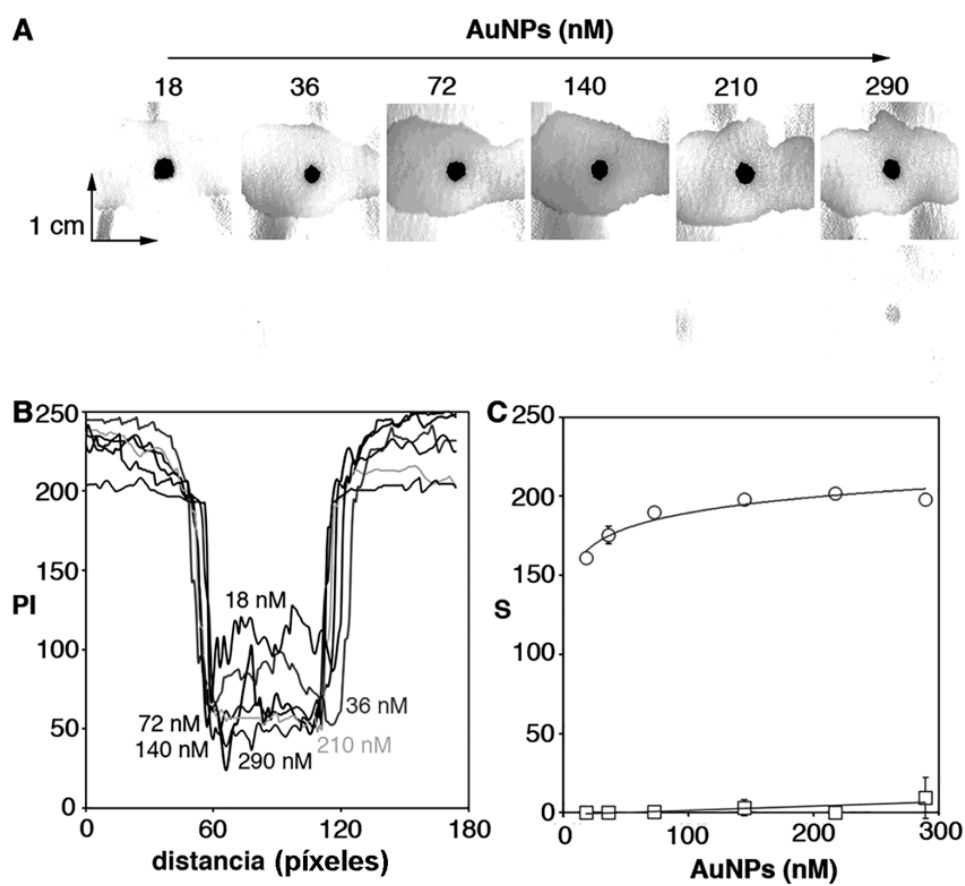


FIG. 3

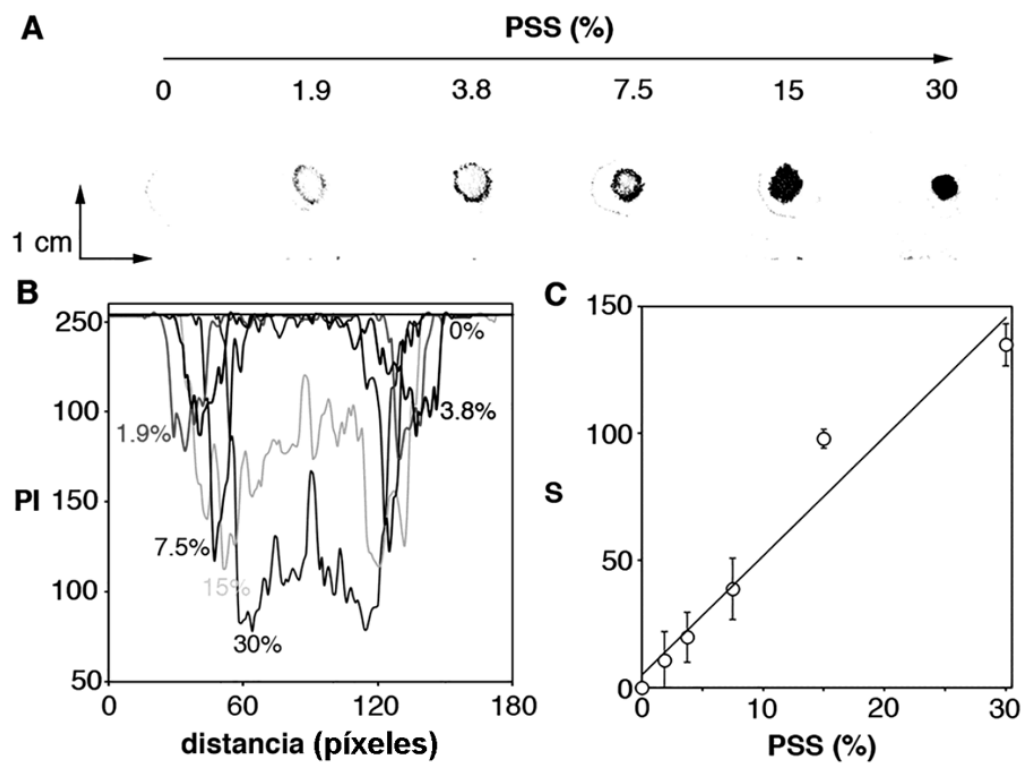


FIG. 4

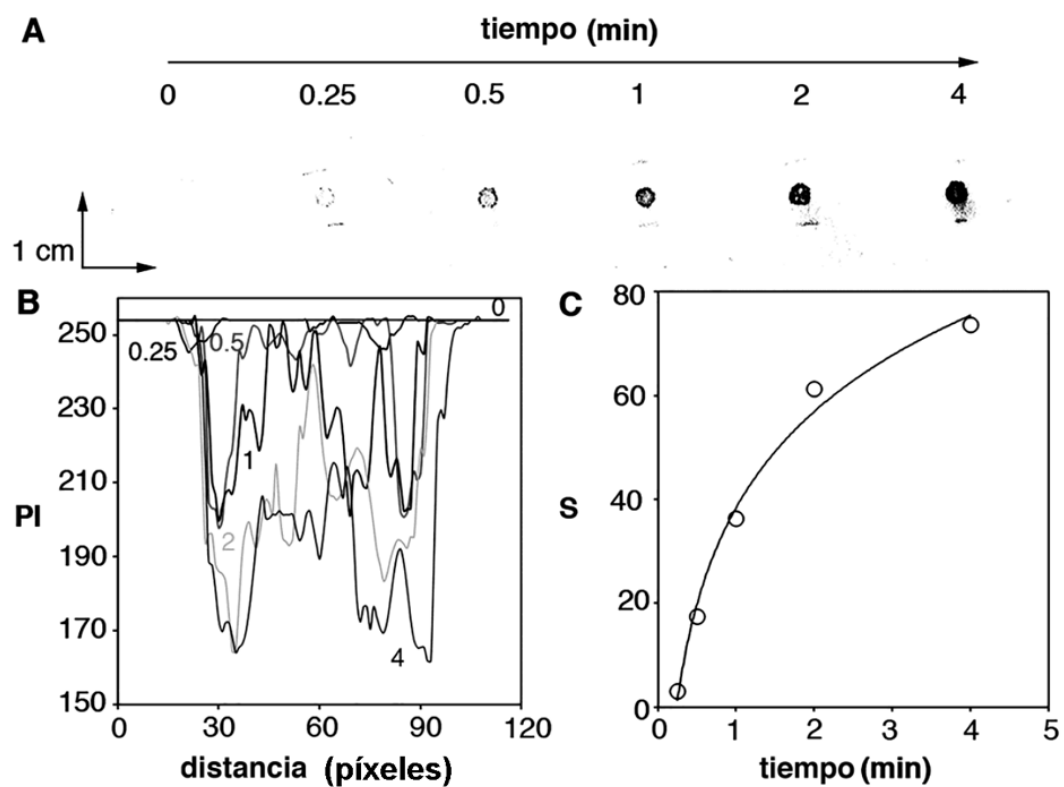


FIG. 5

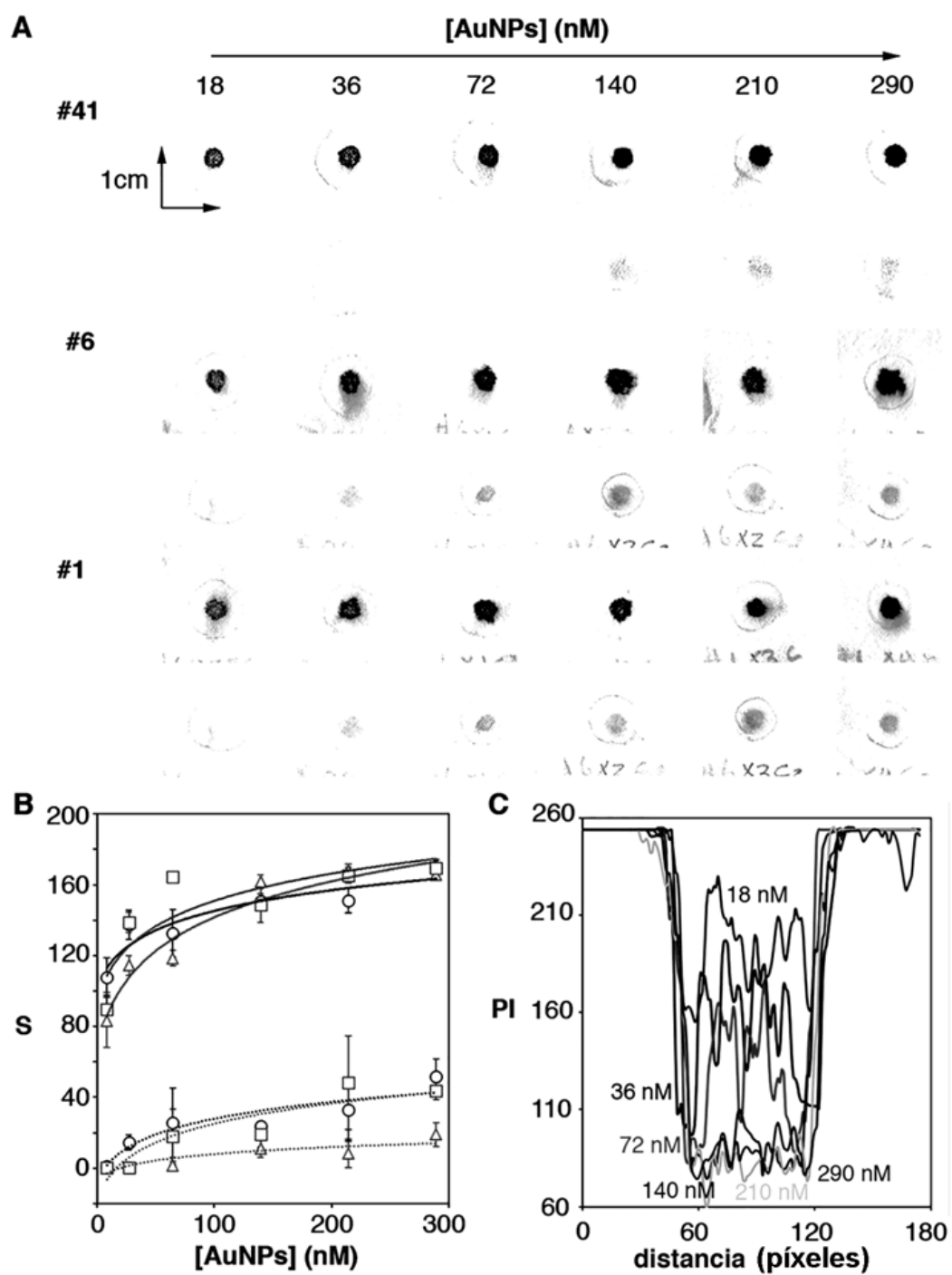


FIG. 6

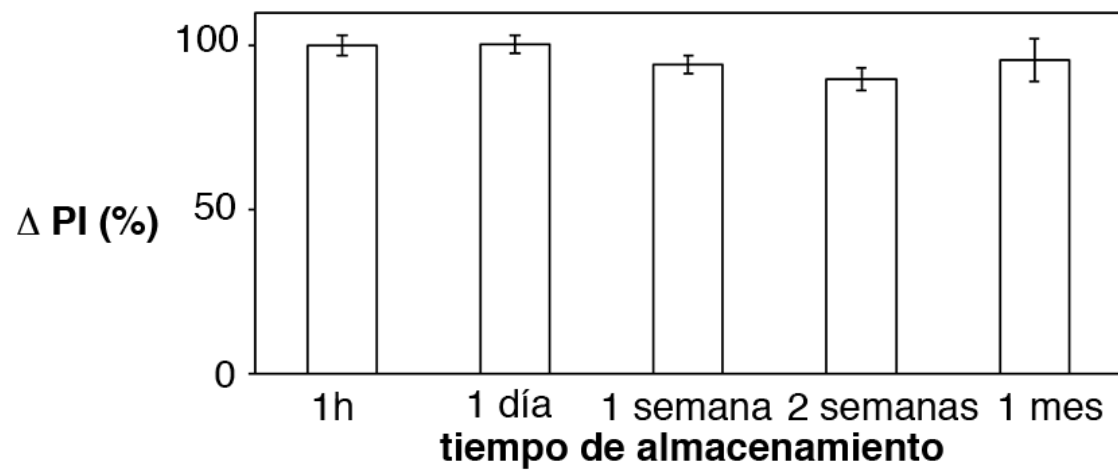


FIG.7

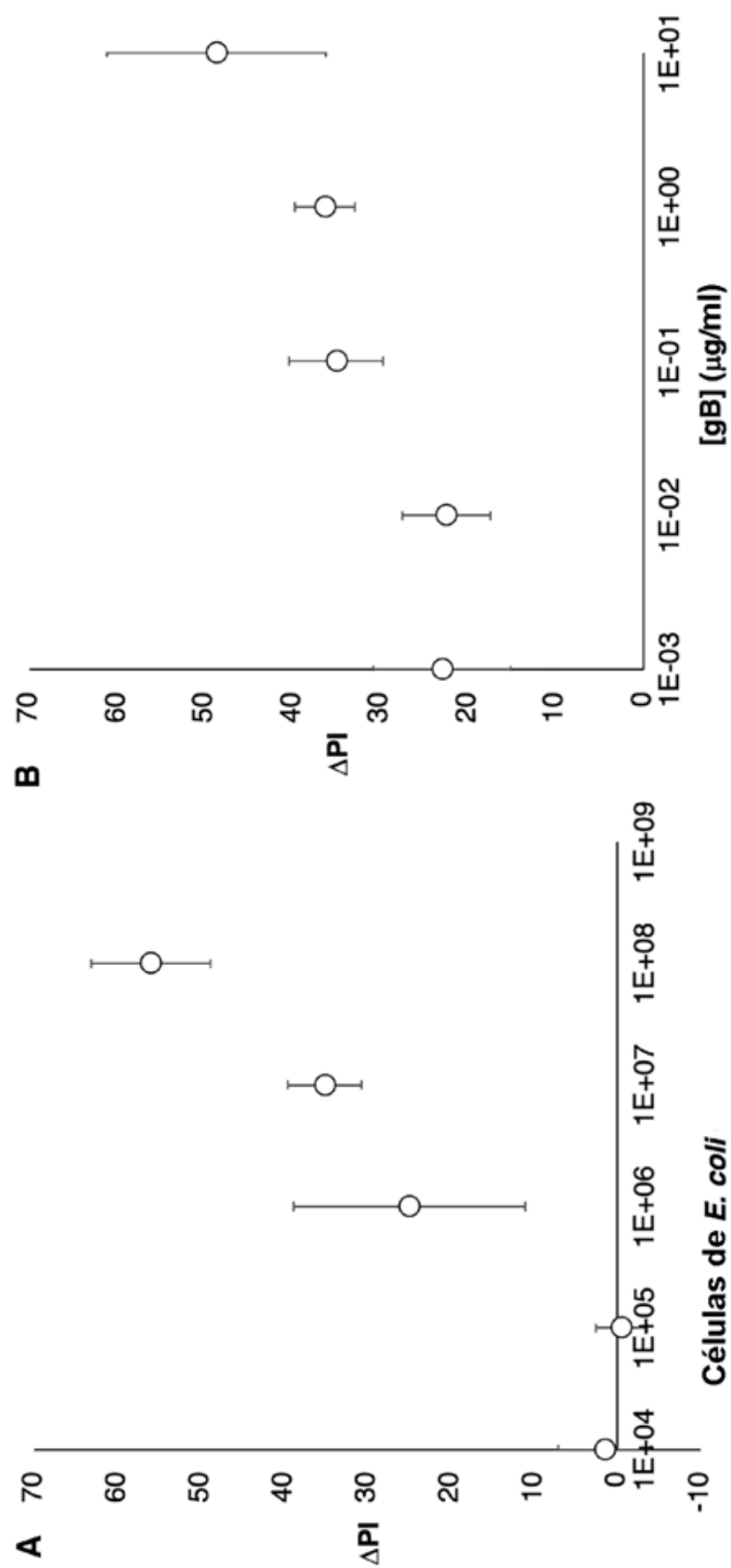


FIG. 8

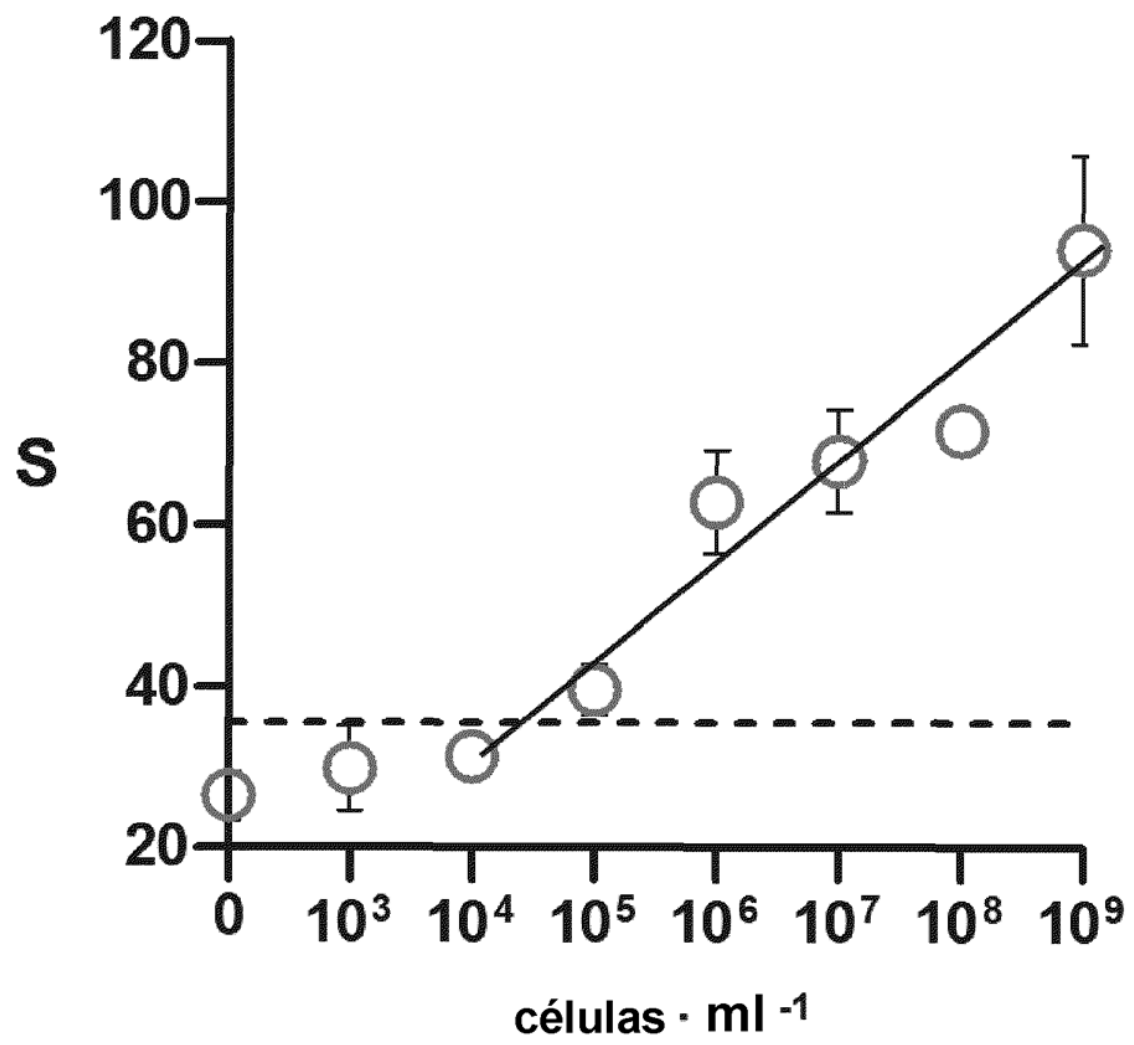


FIG. 9

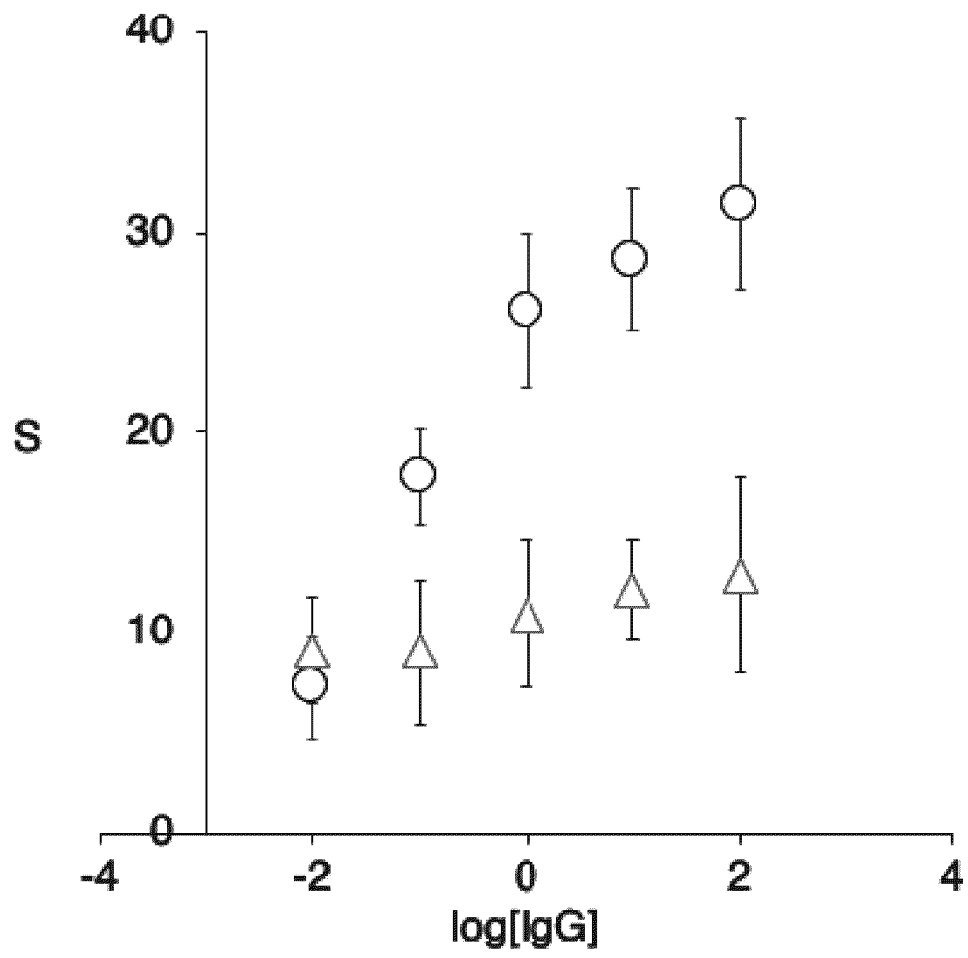


FIG. 10