

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 602**

21 Número de solicitud: 201400372

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/34** (2006.01)

**G01N 21/33** (2006.01)

**G01N 33/493** (2006.01)

12

ADICIÓN A LA PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22

Fecha de presentación:

**29.04.2014**

43

Fecha de publicación de la solicitud:

**29.10.2015**

Fecha de la concesión:

**09.03.2016**

45

Fecha de publicación de la concesión:

**16.03.2016**

61

Número y fecha presentación solicitud principal:

**P 201300722 30.07.2013**

73

Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA (100.0%)  
Pabellón de Brasil, Paseo de las Delicias s/n  
41013 Sevilla (Sevilla) ES**

72

Inventor/es:

**PRADO GOTOR , Rafael y  
CASTILLO HERNÁNDEZ , Paula Margarita**

54

Título: **Procedimiento para la detección colorimétrica de lisozima en orina por nanopartículas agregadas de oro**

57

Resumen:

Procedimiento para la detección colorimétrica de lisozima en orina por nanopartículas agregadas de oro. La presente invención tiene por objeto un procedimiento que permite detectar lisozima en orina, empleando nanopartículas de oro protegidas con iones citrato tras ser sometidas a un procedimiento de agregación.

Es una herramienta de diagnóstico médico eficaz que permitirá la detección de diversas patologías como algunos tipos de leucemia o enfermedades renales.

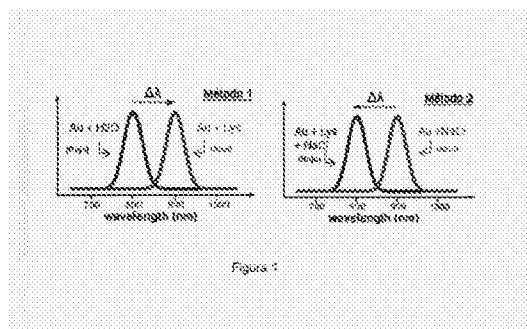


Figura 1

ES 2 549 602 B2

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la detección colorimétrica de lisozima en orina por nanopartículas agregadas de oro.

5 **Objeto de la invención**

La presente invención es una adición a la patente P201300722 de título "Procedimiento para la detección colorimétrica de lisozima por nanopartículas agregadas de oro", y tiene por objeto un procedimiento que permite detectar lisozima en orina, empleando para ello nanopartículas de oro protegidas con iones citrato siguiendo el procedimiento patentado previamente en disolución acuosa y que se presenta aquí extendido en orina y con algunas modificaciones.

10

Es una herramienta de diagnóstico médico eficaz que permitirá la detección en orina, de diversas patologías asociadas a variaciones en la concentración de lisozima como algunos tipos de leucemia y enfermedades renales.

15

**Estado de la técnica**

La lisozima es una proteína catiónica, de carácter fuertemente básico, descrita por primera vez por Fleming en 1922 (On remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. Fleming, A.. Proc. Roy. Soc., London, Series B, 93, 306 (1922)). Su principal propiedad es la de producir la lisis de la pared celular de ciertos tipos de bacterias, por lo que tiene una función relacionada con la respuesta inmunitaria del organismo, y se halla presente de forma natural en secreciones como las lágrimas. Sin embargo, pronto se encontró, una relación entre la presencia de lisozima y ciertas alteraciones del sistema inmunitario, encontrándose ésta particularmente ligada a los leucocitos al reportarse su presencia en pus de pacientes infectados con diversas afecciones, entre ellas tuberculosis (Observations on a bacteriolytic substance ("lysozyme") found in secretions and tissues. Fleming, A. Allison, V. D., , Brit. J. Exp. Path. 13, 252 (1922)).

30

La producción de un exceso de lisozima, detectable en orina y otros fluidos biológicos (tales como el suero sanguíneo) fue determinada como síntoma propio de la *leucemia monocítica* y *mielomonocítica* (ambas subtipos de la *leucemia mieloide aguda*) en la década de 1960, atribuyéndose su aparición en orina a su pequeño peso molecular (Serum and Urinary Lysozyme (muraminidase) in Monocytic and Monomyelocytic Leukemia. Osseman, E. F. Lawlor, D. The

35

Journal of Experimental Medicine 124, 921-951P. LAWL (1966)) (Leukocyte Lysozyme Activity in Myelocytic Leukemia. Noble, R.E. Fudenberg, H. H. Blood 30: 465-473 (1967)). Aunque se trata de un rasgo compartido con otros trastornos renales, tales como el síndrome nefrótico o ciertas infecciones del tracto urinario, se encontró que la producción de lisozima detectada en orina y en suero para casos de leucemia de tipo monocítico era marcadamente superior (25 – 420 µg/ml en orina frente a 10 – 30 µg/ml para otros trastornos de tipo no leucémico) siendo este fuerte exceso de lisozima, por tanto, un buen indicador de la presencia de la enfermedad (Serum and Urinary Lysozyme (muraminidase) in Monocytic and Monomyelocytic Leukemia. Ossermann, E. F. Lawlor, D. The Journal of Experimental Medicine 124, 921-951P. LAWL (1966)). A pesar de existir una fuerte vinculación entre este exceso de lisozima y una producción anormal de leucocitos, el estudio de otras enzimas presentes en los mismos tales como la fosfatasa, la β-glucuronidasa o la catepsina en orina no arrojó valores anormales para pacientes leucémicos; esto puede deberse o bien a que los leucocitos asociados a trastornos leucémicos generan una cantidad excesiva de lisozima con respecto a los leucocitos normales, o bien a que el resto de proteínas, debido a sus características fisicoquímicas, no se excretan de forma tan marcada en la orina. También se ha postulado que pueden existir alteraciones de la función renal aparejadas a estos tipos de leucemia, que causarían una disminución de la reabsorción de la lisozima en el riñón provocando lisozimuria (Serum and Urinary Proteins, Lysozyme (Muramidase), and Renal Dysfunction in Mono- and Myelomonocytic Leukemia. Pruzanski, W. Platts, M. E.. The Journal of Clinical Investigation, 49 1694-1708 (1970)).

25

Además, se han reportado alteraciones de los niveles normales de lisozima ligados a otros tipos de leucemias; por ejemplo, diversos estudios, describen que la *leucemia linfoblástica aguda*, que es considerada actualmente el principal tipo de leucemia infantil, causa una fuerte disminución de la concentración de lisozima en suero, habiéndose encontrado valores experimentales de alrededor de la mitad frente a los casos de control (Leukocyte Lysozyme Activity in Myelocytic Leukemia. Noble, R.E. Fudenberg, H. H.. Blood 30: 465-473 (1967)), (Biochemistry of Human Cancer. Bodansky, O., Academic Press Inc. Nueva York, , pgs 239-240(1975)), (Serum lysozyme activity in children with hematological and malignant disorders. Moe PJ, Haneberg B, Finne PH. Acta Paediatr Scand., 64(6):830-2. (1975))

35

(Recurso Web de la American Cancer Society, <http://www.cancer.org/cancer/leukemiachildren/index>, (2014)).

Los métodos de determinación de lisozima en muestras biológicas en la actualidad se basan, en su mayoría, en la actividad catalítica de la enzima; así, Smolelis y Hartsell (The Determination of Lysozyme. Smolelis, A. N. Hartsell, S. E., J Bacteriol., 58(6): 731–736 (1949)), describen un método general basado en una suspensión celular de *M. Lysodeikticus*, que se mezcla con la muestra problema de lisozima; tras un periodo de incubación de 20 minutos, se mide la transmitancia de la disolución y se determina la concentración de la muestra por comparación con una recta patrón.

Ossermann et al. desarrollaron un método para la detección de lisozima en orina empleando como indicador, de nuevo, preparaciones de *M. Lysodeikticus* sobre soporte de agar (Serum and Urinary Lysozyme (muraminidase) in Monocytic and Monomyelocytic Leukemia. Ossermann, E. F. Lawlor, D., The Journal of Experimental Medicine 124, 921-951P. LAWL (1966)). Por incubación durante 12-18 horas a temperatura ambiente, la enzima causa la aparición de “claros” en la preparación bacteriana al hidrolizar la pared celular; el diámetro de estas marcas se considera proporcional al logaritmo de la concentración de lisozima en la muestra. Selsted y Martínez describen en 1980 una variante del mismo método, adaptada para detectar concentraciones de hasta 5 pg/ml (A simple and ultrasensitive enzymatic assay for the quantitative determination of lysozyme in the picogram range. Selsted, M. E. Martínez, R. J., Analytical Biochemistry 109 1, 67–70 (1980)).

Actualmente no existe ningún procedimiento de detección de lisozima en orina, el Kit actualmente disponible es únicamente para muestras de suero sanguíneo, empleado en hospitales (Human Lysozyme ‘NL’ NANORID™ Radial Immunodiffusion Kit), sólo para uso hospitalario y diagnóstico *in Vitro*.

Además de la complicación relativa a la necesidad de la extracción y tratamiento para las muestras hospitalarias del método convencional, nuestro procedimiento aporta ventajas adicionales. Una importantísima, es el tiempo de respuesta. Con la metodología que proponemos la detección de lisozima es inmediata. Resultados muy recientes muestran además que se puede cuantificar

la proteína en orina sin problemas con la presencia de otros interferentes. El método existente en suero sanguíneo NANORID, se basa en las medidas de los diámetros de los aros de precipitado formados por la interacción del antígeno presente en una muestra y el anticuerpo suministrado en un gel de agarosa. El kit descrito, y el gel en concreto que contiene caros anticuerpos, requiere una conservación (limitada a 2-8°C) y una preparación exhaustiva que debe realizar personal cualificado. En el protocolo afirman que el método presenta problemas en la medida del aro de precipitado por lo que los resultados son variables y dependen del tiempo de incubación, temperatura y humedad. El método además presenta poca sensibilidad a bajas concentraciones y requiere la preparación de disoluciones y manipulación de reactivos potencialmente infecciosos, peligrosos y corrosivos.

Nuestro método (Figura 1) no requiere personal cualificado, pues la medida final se basa en la observación colorimétrica y posterior comparación con colores de referencia (Figura 2). Pese a utilizar oro, la concentración de éste metal noble es tan pequeña que con 1 euro se podría preparar la cantidad de nanopartículas requerida para 30 pruebas. Ninguno de los reactivos que contiene nuestro método son peligrosos, ni corrosivos. Nuestro método permite además determinación al menos micromolar de la proteína en orina, superando la sensibilidad del método en suero y permitiendo la detección precoz de enfermedad renal (Figura 3). El método es rápido pues se determina por observación directa y no requiere compleja preparación previa, tan solo la mezcla de los reactivos indicados y preparados. Los reactivos contenidos en nuestro procedimiento pueden conservarse a temperatura ambiente, siendo fácilmente transportable y por su sencillez de manipulación e interpretación, es asequible a un mayor número de personas.

Según todos los antecedentes descritos hay dos puntos fundamentales. El primero es la directa relación entre la presencia de lisozima en suero sanguíneo y orina en diferentes proporciones para pacientes sanos y enfermos con distintos tipos de leucemia. El segundo es que la medida de lisozima no se determina en hospitales por electroforesis capilar, a diferencia de otras muchas proteínas presentes en los anteriormente citados fluidos biológicos. Tal y como se ha descrito, los métodos para detectar la lisozima no son directos y requieren periodos de incubación relativamente largos. Así mismo, los kits comerciales

disponibles actualmente para detectar y determinar la concentración de lisozima en suero implican el uso de caros anticuerpos, requieren una temperatura de conservación limitada a 2-8°C y una preparación exhaustiva que debe realizar personal cualificado.

5

### Descripción de las figuras

**Figura 1.** Nuevo Modelo de detección de lisozima en orina (método 2) en comparación con el existente (método 1).

10 El método 1 indicado en la figura, está basado en el descrito en bibliografía (Colorimetric Detection of Lysozyme Based on Electrostatic Interaction with Human Serum Albumin-Modified Gold Nanoparticles. Yi-Ming Chen, Chen-Ju Yu, Tian-He Cheng and Wei-Luang Tseng. Langmuir 24, pp 3654-3660 (2008)) en el que, partiendo de nanopartículas sin agregar, se va añadiendo lisozima para estudiar  
15 mediante espectroscopía UV-vis los cambios en el plasmón de superficie ( $\Delta\lambda$ ) que se producen desde menores (línea negra) a mayores (línea gris) longitudes de onda. Este método sólo es sensible si se funcionalizan las nanopartículas. De hecho los autores las funcionalizan con la proteína HSA (human serum albumin). Si se emplean nanopartículas sin funcionalizar el comportamiento es el mismo que  
20 el descrito en la figura pero con una sensibilidad muy baja. En el método 2 propuesto por nosotros, el estudio de los cambios del plasmón de superficie de las nanopartículas se produce de forma inversa, de mayores (línea gris) a menores (línea negra) longitudes de onda Siguiendo el grado de no agregación cuando la lisozima está presente.

25

**Figura 2.** Resultado colorimétrico tras aplicar el método 2 a muestras en orina.

Fotografía en la que se presenta una muestra de nanopartículas de oro agregadas (color azul real, extremo izquierdo de la imagen) y NPs sin agregar (color rojo real, extremo izquierdo de la imagen) frente a varias muestras que contienen  
30 nanopartículas tratadas según el método descrito y que contienen orina con lisozima (muestras centrales, rango de colores entre rojo y azul).

**Figura 3.** Espectros UV-vis del método aplicado a muestras de orina

Espectros UV-vis para muestras de orina diluida tras aplicar el método descrito en  
35 la presente patente. Se representa el espectro de las NPs sin agregar (color rojo)

con un máximo de absorción a 521 nm (Figura 3, línea negra). Cuando estas se agregan por la adición de orina y sal, la muestra se torna azul y el espectro resultante se representa en la figura 3 en color gris continuo. La aplicación del método sobre dos muestras de orina con distinta concentración de lisozima provoca variaciones de color como se mostró en la figura anterior 2 y se representan aquí en las líneas discontinuas de los espectros.

### Descripción de la invención

10

El objeto de la invención es la adición a la patente "Procedimiento para la detección colorimétrica de lisozima por nanopartículas agregadas de oro", optimizada para muestras de orina.

Se trata de un procedimiento sencillo para la detección de lisozima en muestras de orina empleando nanopartículas aniónicas de oro previamente agregadas. El método que proponemos se basa en las propiedades ópticas del oro a escala nanométrica y en el desarrollo de una nueva ruta de detección que implica partir de nanopartículas agregadas previamente para seguir su desagregación cuando en la muestra problema de orina la lisozima está presente. Mediante el método aquí descrito se ha logrado la determinación al menos micromolar de esta proteína en orina superando la sensibilidad de métodos existentes.

20

Tal y como se ha descrito en el apartado del *estado de la técnica*, está demostrado que variaciones en la concentración de lisozima en orina están relacionadas con enfermedades renales y algunos tipos de leucemia, por lo que el método propuesto objeto de la invención trata de ser un procedimiento de diagnóstico precoz de este tipo de patologías y que puede ser empleado por el público en general.

25

A diferencia de todos los métodos anteriores, se parte de clústeres de oro agregados previamente mediante la adición de una sal inerte como el cloruro sódico. En los métodos descritos hasta ahora se controla el seguimiento del cambio de color de la dispersión del rojo al azul (de menor a mayor longitud de onda) y la fuerza iónica del medio influye notablemente como agente interferente o requieren complejas funcionalizaciones previas con el consiguiente gasto económico, tiempo y requerir personal cualificado (Improved turbidimetric assay

35

for lysozyme in urine. Houser, M.T. Clin. Chem., 29, pp 1488-1493 (1983))  
(Turbidimetric and HPLC assays for the determination of formulated lysozyme  
activity. Liao, Y.H.; Brown, M.B.; Martin, G.P.J. Pharm. Pharmacol. 53, pp 549-554  
(2001)). (Colorimetric Detection of Lysozyme Based on Electrostatic Interaction  
5 with Human Serum Albumin-Modified Gold Nanoparticles. Yi-Ming Chen, Chen-Ju  
Yu, Tian-He Cheng and Wei-Luang Tseng. Langmuir 24, pp 3654-3660 (2008)).

En este nuevo procedimiento que hemos desarrollado, partimos justo de  
la situación opuesta, tomando como referente el color azul de los nanosistemas  
10 agregados y siguiendo el cambio de color hacia el rojo cuando la lisozima está  
presente en disolución. En el método que proponemos es posible emplear  
nanopartículas comerciales, sin ningún tipo de sustancia adsorbida a la  
nanopartícula, sea polímero, proteína, etc.... Tan sólo es necesario partir  
previamente de las nanopartículas agregadas y tomar el color azul como punto de  
15 referencia. La vuelta hacia valores de longitudes de onda menores indica la  
presencia de la lisozima en disolución.

La presencia de proteína protege a las nanopartículas de la agregación por  
parte del electrolito inerte, produciéndose un desplazamiento de la banda de  
20 plasmones superficiales hacia longitudes de onda más corta que la  
correspondiente al sistema agregado. Se ha empleado el color azul de las  
suspensiones como referencia para detectar la posible presencia de lisozima en  
una disolución o muestra problema.

25 Se ha optimizado la concentración de oro, el tamaño de la nanopartícula, la  
concentración de sal, pretratamiento de la muestra de orina, orden de adición de  
los reactivos y tiempos de respuesta. El orden de adición de los reactivos resulta  
clave y la metodología de detección sólo es válida si los aditivos se añaden en un  
orden determinado.

30 El procedimiento presenta las siguientes ventajas: sensibilidad  
relativamente alta, sencillez (detección visual sin un diseño técnico complejo) y  
bajo coste instrumental. Otra ventaja es el tiempo de respuesta. Sólo unos pocos  
segundos se necesitan para obtener los nanoclusters agregados para ser  
35 utilizados como un sensor de lisozima en disolución y la protección de los  
nanoclusters por parte de la lisozima es prácticamente inmediata.



**Modo de realización de la invención**

Se ha tenido especial atención en el estudio de los interferentes presentes en las muestras de orina; debidos a HSA (human serum albumin) encontrando que ésta, junto con otras proteínas catiónicas como las inmunoglobulinas (IgG A y M), o globulinas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). Debido a que sus puntos isoeléctricos son inferiores o iguales a 7 (Direct Determination of Urinary Lysozyme Using Surface Plasmon Resonance Light-Scattering of Gold Nanoparticles. Xinyi Wang, Yao Xu, Xiao Xu et al. Talanta 82 pp 693-697 (2010)) (Immune globulin and its use in prophylaxis and therapy of infectious diseases. Polson A.. S.A. Medical Journal pp 1242-1244 (1957)), ninguna de éstas interfiere en la determinación de lisozima en el método presentado objeto de la invención debidos y basta una dilución con agua de la muestra de orina para observar el cambio colorimétrico.

Los experimentos de titulación se llevaron a cabo a una concentración fija de oro coloidal protegidos con iones citrato (casa Aldrich, diámetro de 10nm), [AuNPs] =  $7.5 \times 10^{-9}$  M, previamente agregadas con NaCl, y en un rango de concentración de lisozima de al menos  $10^{-6}$  M. Los volúmenes de oro, NaCl y muestra problema de orina con lisozima se mantienen constantes para cada medida en la cubeta. El volumen de proteína adicionado sobre la muestra de orina, ha sido variable en cada punto y se ha corregido con agua hasta alcanzar el volumen final constante en todas las muestras.

El orden y los tiempos de estabilización empleados han sido los siguientes:  
 1°AuNPs-2°H<sub>2</sub>O-3° Orina con Lisozima-(10 min estabilización)-4°NaCl (Más 1 minuto adicional de mezcla de reactivos y estabilización antes de medir).

El modo detallado de la realización del procedimiento de invención es el siguiente:

- a) Control de la agregación mediante la adición, sobre 200  $\mu$ l de oro coloidal ( $7.9 \times 10^{-9}$  M; 10 nm de tamaño), de 1600  $\mu$ l una muestra de orina y NaCl (200  $\mu$ l; 1 M) corrigiendo con agua hasta 2 ml.
- b) Seguimiento controlado de la agregación de las nanopartículas y determinación de la  $\lambda$  de máxima absorción del sistema ( $\lambda \sim 606$  nm).
- c) Fijación de este máximo de absorción correspondiente a un color azul de la disolución como punto de referencia del método.

- d) Para determinar la concentración de lisozima en una muestra de orina se procede como sigue:
- e) Preparación de una muestra de 200  $\mu\text{l}$  de oro coloidal  $7.9 \times 10^{-9} \text{M}$  de 10 nm
- 5 f) Adición de 1600  $\mu\text{l}$  de muestra problema de orina con lisozima sobre los 200  $\mu\text{l}$  de oro coloidal
- g) Diez minutos de espera para la estabilización tras agitación.
- h) Adición de una alícuota de 200  $\mu\text{l}$  de NaCl en agua de concentración tal que la final en la mezcla sea NaCl 0.1 M.
- i) Un minuto de espera para la estabilización tras agitación.
- 10 j) Determinación de la  $\lambda$  del máximo de absorción de la muestra problema y cálculo de  $\Delta\lambda$  con respecto al valor de  $\lambda$  en el apartado b).

15

20

25

30

35

## Reivindicaciones

- 1.- Procedimiento colorimétrico para la detección y/o cuantificación de lisozima en orina, que comprende:
- 5
- a) añadir un biosensor de color azul constituido por nanopartículas de oro protegidas con iones citrato (AuNPs) agregadas con NaCl, a una muestra problema de orina y
- 10
- b) determinar el grado de desagregación de las nanopartículas a simple vista o mediante espectroscopía UV-visible tras el estudio del desplazamiento que se produce hacia menores valores en la longitud de onda (color rojo) en la muestra de orina que contiene lisozima.
- 15
- 2.- Procedimiento colorimétrico para la detección y/o cuantificación de lisozima en orina de acuerdo a la reivindicación 1, en el que las nanopartículas de Au tienen un diámetro de 10 nm y han sido sintetizadas mediante la reducción en medio acuoso de una sal de oro con citrato sódico.
- 20
- 3.- Procedimiento colorimétrico para la detección y/o cuantificación de lisozima en orina, de acuerdo a las reivindicaciones anteriores caracterizado porque las nanopartículas de oro están en disolución acuosa.
- 25
- 4.- Procedimiento colorimétrico para la detección y/o cuantificación de lisozima en orina de acuerdo a las reivindicaciones anteriores caracterizado porque en el procedimiento de preparación del biosensor se toman como punto de referencia las nanopartículas de oro que han sido agregadas de forma controlada.
- 30
- 5.- Procedimiento colorimétrico para la detección y/o cuantificación de lisozima en orina de acuerdo a la reivindicación 4, caracterizado porque el punto de referencia se establece mediante la adición sobre las nanopartículas de oro, de NaCl a una concentración 0.1 M y 10 minutos de espera para la estabilización.
- 35
- 6.- Procedimiento colorimétrico para la detección y/o cuantificación de lisozima en orina de acuerdo a las reivindicaciones anteriores caracterizado porque la determinación de la concentración de lisozima de la muestra problema de orina

requiere, el valor obtenido en el punto de referencia según la reivindicación 5 y el valor obtenido para la muestra problema, logrado con un orden tiempos y concentración fijados.

5 7.- Procedimiento colorimétrico para la detección y/o cuantificación de lisozima en orina de acuerdo a la reivindicación 6, caracterizado porque el orden de adición fijado para obtener el valor de la muestra problema de lisozima es: primero las nanopartículas de oro ( $7.9 \times 10^{-9} \text{M}$ ), posteriormente la sal NaCl (0,1 M) y un tiempo de espera de 10 minutos para su estabilización.

10

8.- Procedimiento colorimétrico para la detección y/o cuantificación de lisozima en orina de acuerdo a las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la determinación de la concentración de lisozima en orina (al menos  $10^{-6} \text{M}$ ) se realiza a simple vista o calculada por diferencia, mediante espectroscopia UV-vis, tras el estudio del desplazamiento que se produce hacia menores valores en la longitud de onda en la muestra que contiene lisozima.

15

9.- Uso del procedimiento colorimétrico para la detección y/o cuantificación de lisozima en orina de acuerdo a las reivindicaciones 1-8, para detectar/cuantificar la presencia de lisozima en una muestra de orina.

20

25

30

35

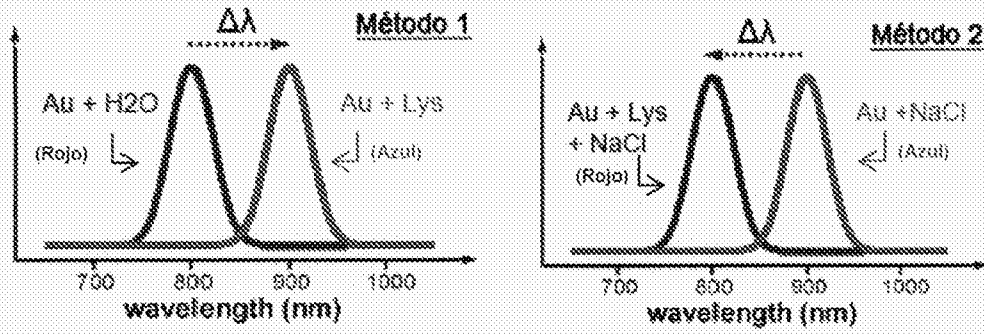


Figura 1



Figura 2



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201400372

22 Fecha de presentación de la solicitud: 29.04.2014

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

5 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CHEN, YM et al. "Colorimetric detection of lysozyme based on electrostatic interaction with human serum albumin-modified gold nanoparticles". LANGMUIR. 01.04.2008. Vol. 24, N° 7, páginas 3654-3660, todo el documento.	1-9
A	WANG, X. et al. "Direct determination of urinary lysozyme using surface plasmon resonance light-scattering of gold nanoparticles". TALANTA. 15.07.2010. Vol. 82, N° 2, páginas 693-697, todo el documento.	1-9
A	WANG, G. et al. "Optical limiting of gold nanoparticle aggregates induced by electrolites". J. PHYS. CHEM. B. 26.09.2006. Vol.110, N° 42, páginas 20901-20905, resultados y discusión.	1-9
A	LU, Y. et al. "Aptamer-based plasmonic sensor array for discrimination of proteins and cells with the naked eye". 25.06.2013. Vol. 85, N° 14, páginas 6571-6574, todo el documento.	1-9

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  
10.06.2015

Examinador  
M. Novoa Sanjurjo

Página  
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12Q1/34** (2006.01)

**G01N21/33** (2006.01)

**G01N33/493** (2006.01)

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

C12Q, 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, HCAPLUS, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 10.06.2015

#### Declaración

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-9	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-9	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

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

#### Base de la Opinión.-

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

#### Consideraciones:

La invención consiste en un procedimiento colorimétrico para determinar/cuantificar la presencia de lisozima en una muestra de orina, en el que se utiliza un biosensor que consiste en nanopartículas de oro, protegidas con iones citrato y agregadas con cloruro sódico. Las nanopartículas de oro agregadas, le proporcionan a la solución color azul, que se transforma en rojo al dispersarse la agregación cuando se añade la muestra de orina, si ésta contiene lisozima.



**1. Documentos considerados.-**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	CHEN, YM et al. "Colorimetric detection of lysozyme based on electrostatic interaction with human serum albumin-modified gold nanoparticles". LANGMUIR. 01.04.2008. Vol. 24, Nº 7, páginas 3654-3660, todo el documento.	
D02	WANG, X. et al. "Direct determination of urinary lysozyme using surface plasmon resonance light-scattering of gold nanoparticles". TALANTA. 15.07.2010. Vol. 82, Nº 2, páginas 693-697, todo el documento.	
D03	WANG, G. et al. "Optical limiting of gold nanoparticle aggregates induced by electrolites". J. PHYS. CHEM. B. 26.09.2006. Vol.110, Nº 42, páginas 20901-20905, resultados y discusión.	
D04	LU, Y. et al. "Aptamer-based plasmonic sensor array for discrimination of proteins and cells with the naked eye". 25.06.2013. Vol. 85, Nº 14, páginas 6571-6574, todo el documento.	

El documento D01, describe el uso de nanopartículas de oro (AuNPs), para detectar la presencia de lisozima en suero u orina. Las nanopartículas de oro se unen de forma covalente a seroalbúmina (HSA) y presentan en solución, color rojo al no estar agregadas. La agregación de HSA-AuNPs (color azul), se consigue añadiendo proteínas que tienen  $pI$  elevado. Para que la prueba sea selectiva para la determinación de lisozima, es importante ajustar el  $pH$  de la solución a 8.0.

El documento D02, describe un método colorimétrico para determinar lisozima en una muestra, derivado del hecho de que nanopartículas de Au cubiertas por iones citrato presentan cargas negativas en su superficie y tienden a agregar en presencia de moléculas con carga positiva. La lisozima, tiene un  $pI$  de 11 y a  $pH$  7 está cargada positivamente. Si se añade a una muestra de lisozima la solución anterior, se induce la agregación y puede determinarse la lisozima al cambiar el color del rojo (estado disperso) al azul (estado agregado).

El documento D03, presenta un estudio de las características ópticas de los agregados de nanopartículas de Au inducidos por electrolitos como KCl y NaCl.

El documento D04 describe un sensor colorimétrico que consiste en nanopartículas de Au protegidas con un aptámero de una proteína diana. Las nanopartículas protegidas en presencia de NaCl, presentan distintas pautas de agregación y este comportamiento se utiliza para distinguir entre varias proteínas diana diferentes presentes en la muestra.

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

**NOVEDAD y ACTIVIDAD INVENTIVA**

Reivindicaciones 1-9

No se ha encontrado descrito en el estado de la técnica, ningún método colorimétrico para determinar y cuantificar lisozima en orina, basado en un sensor de nanopartículas de oro agregadas por la presencia de una sal (color azul), que cambia al rojo cuando se dispersa la agregación al añadir la muestra de orina que se sospecha, contiene lisozima. Se considera que los documentos citados solo muestran el estado general de la técnica y no se consideran de particular relevancia, ya que para una persona experta en la materia no sería obvio aplicar las características de los documentos citados y llegar a la invención tal como se contempla en las reivindicaciones. Por lo tanto, las reivindicaciones 1-9 cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva de acuerdo con los Artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes 11/1986.