

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 742**

21 Número de solicitud: 201130233

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/52** (2006.01)

**C12N 15/10** (2006.01)

**B82Y 5/00** (2011.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

**23.02.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**29.11.2012**

Fecha de la concesión:

**11.07.2013**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**23.07.2013**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
PABELLÓN DE BRASIL, PASEO DE LAS  
DELICIAS, S/N  
41012 SEVILLA (Sevilla) ES**

72 Inventor/es:

**PRADO GOTOR, Rafael**

74 Agente/Representante:

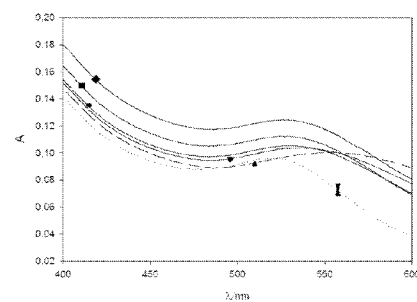
**TEMIÑO CENICEROS, Ignacio**

54 Título: **MÉTODO PARA LA DETECCIÓN Y/O CUANTIFICACIÓN DE POLIELECTROLITOS ANIÓNICOS.**

57 Resumen:

La presente solicitud de patente se refiere a un método calorimétrico y kit para la detección y cuantificación de receptores aniónicos de alta carga, como ADN de doble cadena y micelas aniónicas de SDS, mediante agregados de nanopartículas de oro protegidas con iones citrato (AuNPs).

Fig. 2



ES 2 391 742 B2

## DESCRIPCIÓN

Método para la detección y/o cuantificación de polielectrolitos aniónicos.

**Campo de la invención**

5 La presente invención se encuadra en general en el campo de la analítica y en particular se refiere a un método y kit para la detección y cuantificación de receptores aniónicos de alta carga.

**Estado de la técnica**

10 La naturaleza y la fuerza de las interacciones del ADN y de sus componentes (bases y nucleósidos) con nanopartículas metálicas son un tema de gran interés para los investigadores en las interdisciplinas de la nanobiotecnología. Los modos de unión y conformación del ADN y sus componentes en las superficies metálicas sugieren que la interacción ADN-metal es compleja y altamente dependiente de la secuencia. En los últimos años, las nanopartículas metálicas solubles en agua y biocompatibles han recibido una gran atención debido a los posibles beneficios de su aplicación en la biología y la medicina.

15 Sus propiedades únicas, ópticas y magnéticas, hacen que estos sistemas sean interesantes para las aplicaciones de diagnóstico e imagen. Entre ellos, las nanopartículas de oro se han utilizado ampliamente para la detección colorimétrica de la hibridación de ADN (J. Liu, Y. Lu, J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 12677-12683). Los ensayos de biodetección utilizando nanopartículas de oro funcionalizadas con ADN implican estrategias de lectura colorimétrica. Estos procedimientos se inspiran en la transición del color de la agregación inducida de rojo a azul, debido al desplazamiento de la banda de resonancia de plasmones de superficie de las nanopartículas (SPB) (S. J. Hurst, A. K. R. Lytton-Jean and C. A. Mirkin, Anal. Chem. 2006, 78, 8313-8318).

20 El ADN de cadena simple (ssDNA) y doble (dsDNA) tienen inclinaciones diferentes para absorberse a las nanopartículas de oro aniónicas (AuNPs), debido a sus diferentes interacciones electrostáticas con éstas. El ssDNA se sabe que es capaz de adsorberse sobre las AuNPs y estabilizar suspensiones coloidales en concentraciones salinas (X. Su and R. Kanjanawarut, ACSNano 2009, 3, 2751-2759). El ssDNA se puede desenrollar lo suficiente como para exponer a sus bases. Por su parte, el dsDNA se caracteriza por su poca afinidad con las AuNPs de carga negativa debido a su estable hebra ADN-ADN de doble hélice, con una geometría tal que siempre tiene aisladas sus bases nitrogenadas y presenta la espina dorsal de fosfatos con carga negativa hacia el exterior. Por esta razón, ADN de doble cadena no puede proteger AuNPs de una agregación inducida por la presencia de sales en el medio, en comparación con el ADN de cadena simple. Esta agregación es perceptible en el cambio de color de la solución coloidal dándose un corrimiento hacia el rojo del pico de la banda SPB.

30 Así,

Se ha desarrollado un ensayo colorimétrico para la detección de DNA de cadena simple basado en la agregación de nanopartículas metálicas sin modificaciones (nanopartículas aniónicas con iones citrato) (R. Kanjanawarut and X. Su, Anal. Chem. 2009, 81, 6122-6129). El método es válido para ADN de cadena simple, y para los ácidos nucleicos peptídicos (ANP), que son análogos de ADN en el que se sustituye la columna vertebral de todo el contenido de azúcar-fosfato por una columna vertebral de poliamida de carga neutra.

40 El ADN de doble cadena no se absorbe debido a la repulsión entre la espina dorsal del fosfato cargado del ADN de doble cadena y los iones citrato adsorbidos. Por el contrario, gracias a su flexibilidad, ssDNA, puede parcialmente desenrollar sus bases, para que puedan estar expuestas a las nanopartículas de oro. En estas condiciones, la carga negativa de la columna vertebral se encuentra a una distancia suficiente de las AuNPs dándose fuerzas atractivas de van der Waals entre las bases y las nanopartículas de oro, suficientes para lograr que el ADN de cadena simple se una al oro. Este mecanismo no es operativo con ADN de doble cadena, porque la estructura de doble cadena no permite el desenrollamiento necesario para exponer las bases. Esto permite la determinación de si ssDNA está presente o no en una disolución. Mientras que los cambios de color de una disolución provocados por la adición de aditivos tales como NaCl son retrasados si la solución contiene ssDNA (impide la agregación de las nanopartículas por la sal), la alteración del color no se ve retardada cuando la solución contiene ADN de doble cadena. (S. Rho, S. J. Kim, S. C. Lee, J. H. Chang, H. G. Kang and J. Choi, Curr. Appl. Phys. 2009, 9, 534-537).

45 La detección de ADN de cadena simple solo es posible a través de un mecanismo de agregación con las nanopartículas (cross-linking). Los métodos clásicos no son válidos para la detección de ADN de doble cadena ya que la doble hebra no se adsorbe sobre el nanocluster.

50 Existe pues la necesidad de proporcionar un método de alta sensibilidad, sencillez y con un tiempo corto de respuesta que permita la detección de ADN de cadena doble.

### Explicación de la invención

Así pues, la presente invención en un primer aspecto se refiere a un método colorimétrico para la detección y/o cuantificación de polielectrolitos aniónicos de alta carga que comprende:

- 5 a) añadir nanopartículas de oro protegidas con iones citrato (AuNPs) a una muestra problema.  
 b) determinar el grado de desagregación de las nanopartículas mediante la medida de la relación de absorbancia a 520nm y 560 nm.

donde la desagregación de las nanopartículas es indicativa de la presencia de polielectrolito aniónico en la muestra.

En un aspecto más en particular de la presente invención, previamente al paso a), hay un paso de inducción de la agregación de las nanopartículas de oro protegidas con iones citrato (AuNPs) mediante la adición de un electrolito.

- 10 En un aspecto más en particular de la presente invención, el polielectrolito aniónico de alta carga es ADN de cadena doble.

En otro aspecto más en particular de la presente invención el polielectrolito aniónico de alta carga son micelas aniónicas, más en particular, son micelas aniónicas de SDS.

En un aspecto más en particular de la presente invención, las nanopartículas se agregan con NaCl.

- 15 En un aspecto más en particular de la presente invención, el tamaño de las nanopartículas de oro protegidas con iones citrato tienen un tamaño comprendido entre 3-20 nm.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un kit para la detección y/o cuantificación de polielectrolitos aniónicos de alta carga que comprende los reactivos necesarios para llevar a cabo el método descrito anteriormente.

En un aspecto más en particular de la presente invención, el kit comprende

- 20 - Nanopartículas de oro  
 - Cloruro sódico

En un aspecto más en particular, el kit además comprende citrato.

En otro aspecto en particular, el kit de la presente invención comprende nanopartículas de oro protegidas con iones citrato (AuNPs) y cloruro sódico.

- 25 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso de un kit según se ha descrito anteriormente, para la detección y/o cuantificación de polielectrolitos aniónicos de alta carga.

### Descripción de las figuras

Figura 1: Muestra los modelos de detección de ADN de doble cadena: AuNPs agregadas (B) y no agregadas (A).

- 30 Figura 2: Muestra UV-VIS de absorción de las AuNPs (5nm de diámetro) en presencia de diferentes concentraciones de ADNds y a una concentración de NaCl de 0.5 M. Las curvas corresponden a ▲: AuNPs con sal, ▼: AuNPs 0.54 μM, ● AuNPs 215 μM, ■: AuNPs 1x10<sup>-3</sup> M y ◆: 1.7x10<sup>-3</sup> M (4) de dsDNA. [AuNPs] = 7.5x10<sup>-9</sup> M en cada caso, la línea de puntos se corresponde a las AuNPs sin sal.

- 35 Figura 3. Muestra el grado de desagregación (medido como A520/A560) frente a las concentraciones de ADN de doble cadena. Puntos circulares corresponden a los puntos de NaCl 0,5 M. Puntos triangulares corresponden a NaCl 1M. A medida que aumenta la concentración de sal, se necesita más cantidad de ADN de doble cadena para que la SPB recupere su posición inicial.

Figura 4. (A) Muestra la absorbancia (a 560 nm) frente al tiempo para la agregación de las partículas de oro por NaCl 1M. (B) Muestra la absorción (a 560 nm) para la desagregación de nanopartículas de oro por ADN de doble cadena.

- 40 Figura 5. Muestra la alteración del color de la solución y su correspondiente análisis de espectroscopia de absorción. (A) [AuNPs] = 5.6x10<sup>-9</sup> M (B) [AuNPs] = 5.6x10<sup>-9</sup> M, [NaCl] = 0.1 M (C) [AuNPs] = 5.6x10<sup>-9</sup> M, [NaCl] = 0.1 M, [SDS] = 0.0375 M.

- 45 Figura 6. Muestra los espectros UV-VIS de AuNPs (5 nm de diámetro) en presencia de concentraciones de SDS diferentes y NaCl 0,1 M. La curva (▲) corresponde a las nanopartículas sin sal, no agregadas. La curva (▲) corresponde las AuNPs agregadas por NaCl 0.1 M y las sólidas a las nanopartículas en presencia de NaCl 0.1 M y diferentes concentraciones de SDS: ●: 0.0375 M, ◆: 0,05 M, ■: 0,075 M y ▼: 0,15 M de SDS. [AuNPs] = 5.6x10<sup>-9</sup> M en cada caso.

Figura 7. Muestra la relación  $\Delta\psi$  / mV frente a [SDS] / M ( $r = 0,995$ ).

### Explicación detallada de la invención

#### Ejemplo 1: detección de ADN de doble hebra.

5 Se tomaron 200 microlitros de una disolución comercial de oro coloidal protegido con iones citrato (AuNPs), de tamaño 5nm (casa Aldrich: G1402 gold colloid). La concentración de nanopartículas en el bote comercial fue de  $7.5 \times 10^{-8}$  M. Los 200 microlitros de la disolución de oro coloidal se añadieron a una cubeta de 1cm de paso de luz que contenía 1800 microlitros de agua con NaCl a una concentración tal que el volumen final de 2 mililitros en la cubeta se correspondió con una concentración 0.5 M en NaCl y  $[\text{AuNPs}] = 7.5 \times 10^{-9}$ . Aunque la agregación de los nanoclusters en presencia de la sal tuvo lugar de forma casi inmediata (en segundos), se agitó durante unos segundos suavemente. Se registró el espectro de absorción entre 400 y 600 nm. La agregación de las nanopartículas dio lugar a un desplazamiento del máximo de la banda de surface plasmon desde 520 nm a unos 560 nm. Transcurridos cinco minutos se añadió la muestra problema que contenía ADN de doble hebra. Para estas concentraciones y volúmenes de mezcla, no se añadieron más de 200 microlitros de la muestra problema, a fin de no provocar la desagregación de las nanopartículas por un simple proceso de dilución. Se agitó durante unos segundos suavemente. Transcurridos diez minutos se registró el espectro de absorción entre 400 y 600 nm. El espectro mostró un desplazamiento del pico de resonancia de plasmón de 560 nm de longitud de onda hasta valores próximos a 520 nm. El límite de detección fue de de 0,02  $\mu\text{M}$  con un límite inferior de cuantificación de 0,06 mM.

20 Estos datos sugirieron que la posible presencia de ADN de doble hebra en la muestra problema permitió alterar la agregación de partículas de forma significativa. Al agregar ADN de doble cadena poco a poco las AuNPs se desagregaron (tuvo lugar un corrimiento al azul). De tal forma que si la muestra problema contenía ADN de doble hebra se observará un aumento de la absorbancia a 520nm y un desplazamiento del máximo de la banda hacia 520nm. La medida del grado de desagregación (medida como la relación de absorbancia a 520 nm y 560,  $A_{520}/A_{560}$ ) mostró que, aunque el ADN de doble cadena no pudo ser fácilmente adsorbido en nanopartículas de oro, gracias a su gran carga, el polielectrolito fue capaz de atrapar iones sodio de los agregados de clúster a través de la neutralización de las cargas de los grupos fosfato.

#### Ejemplo 2: detección de SDS.

30 Se tomaron 150 microlitros de una disolución comercial de oro coloidal protegido con iones citrato (AuNPs), de tamaño 5nm (referencia casa Aldrich: G1402 gold colloid). La concentración aproximada de nanopartículas en el bote comercial fue de  $7.5 \times 10^{-8}$  M. Los 150 microlitros se añadieron a una cubeta de 1cm de paso de luz que contenía previamente 1800 microlitros de agua con NaCl a una concentración tal que el volumen final de 2 mililitros en la cubeta se correspondió con una concentración 0.1 M en NaCl y  $[\text{AuNPs}] = 5.6 \times 10^{-9}$ . Aunque la agregación de los nanoclusters en presencia de la sal tuvo lugar de forma casi inmediata (en segundos) se agitó durante unos segundos suavemente. Se registró el espectro de absorción entre 400 y 600 nm. La agregación de las nanopartículas dio lugar a un desplazamiento del máximo de la banda de surface plasmon desde 520 nm a unos 560 nm. Transcurridos cinco minutos se añadió la muestra problema que contenía SDS en disolución. Para estas concentraciones y volúmenes de mezcla, no se añadieron más de 200 microlitros de la muestra problema, para no provocar la desagregación de las nanopartículas por un simple proceso de dilución. Se agitó durante unos segundos suavemente. Transcurridos diez minutos se registró el espectro de absorción entre 400 y 600 nm. La presencia de SDS en la muestra problema alteró la agregación de partículas de forma significativa. Al agregar SDS poco a poco las AuNPs se desagregaron (corrimiento al azul). Como la muestra problema contenía SDS se observó un aumento de la absorbancia a 520nm y un desplazamiento del máximo de la banda hacia 520nm.

**REIVINDICACIONES**

1. Método colorimétrico para la detección y/o cuantificación de polielectrolitos aniónicos de alta carga que comprende:
- c) añadir nanopartículas de oro protegidas con iones citrato (AuNPs) agregadas a una muestra problema
  - d) determinar el grado de desagregación de las nanopartículas mediante la medida de la relación de absorbancia a 520nm y 560 nm.
- 5
- donde la desagregación de las nanopartículas es indicativo de la presencia de polielectrolito aniónico en la muestra.
2. Método según la reivindicación 1, donde previamente al paso a), se induce la agregación de las nanopartículas de oro protegidas con iones citrato (AuNPs) mediante la adición de un electrolito.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el polielectrolito aniónico de alta carga es ADN de cadena doble.
- 10
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el polielectrolito aniónico de alta carga son micelas aniónicas
5. Método según la reivindicación 4, donde las micelas son micelas aniónicas de SDS.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el electrolito es NaCl.
- 15
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el tamaño de las nanopartículas de oro protegidas con iones citrato tienen un tamaño comprendido entre 3-20 nm.
8. Kit para la detección y/o cuantificación de polielectrolitos aniónicos de alta carga que comprende los reactivos necesarios para llevar a cabo el método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
9. Kit según la reivindicación 8, que comprende
- Nanopartículas de oro
  - Cloruro sódico
- 20
10. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, que comprende citrato.
11. Kit según la reivindicación 8, que comprende nanopartículas de oro protegidas con iones citrato (AuNPs) y cloruro sódico.
- 25
12. Uso de un kit según las reivindicaciones 8-11 para la detección y/o cuantificación de polielectrolitos aniónicos de alta carga.

Fig. 1

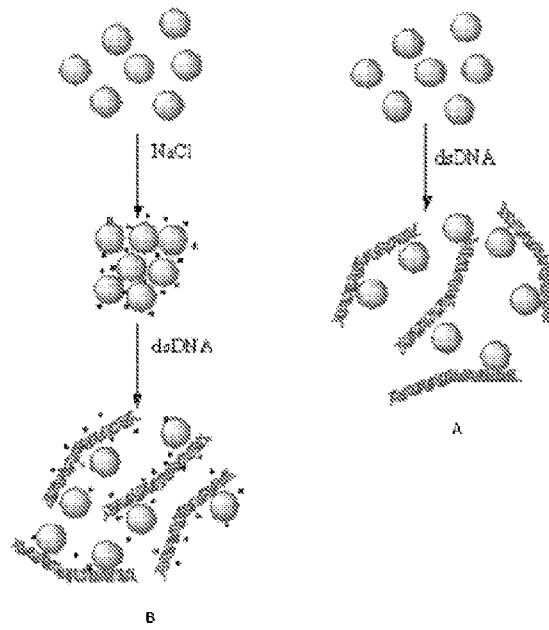


Fig. 2

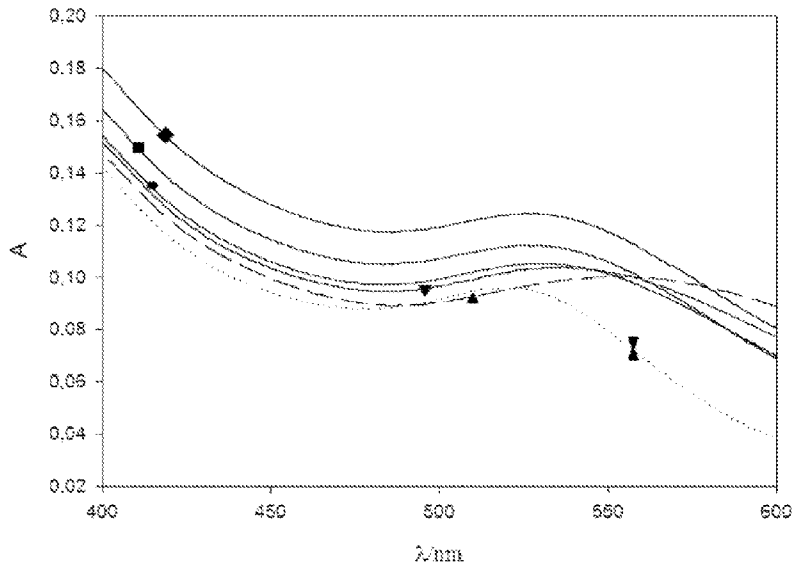


Fig. 3

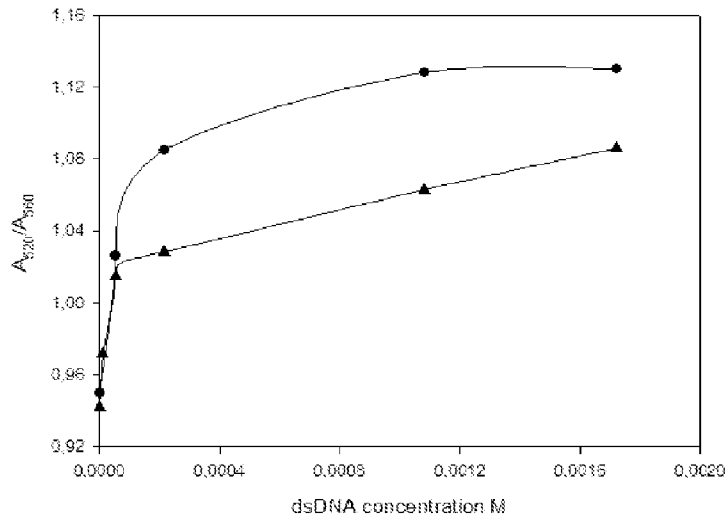


Fig. 4

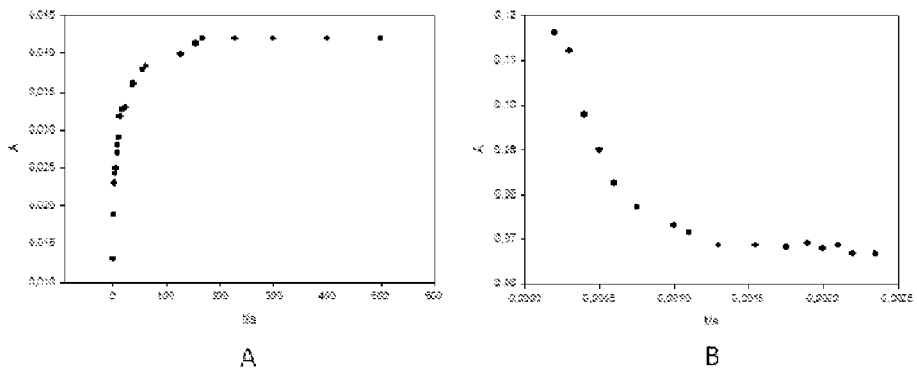


Fig. 5

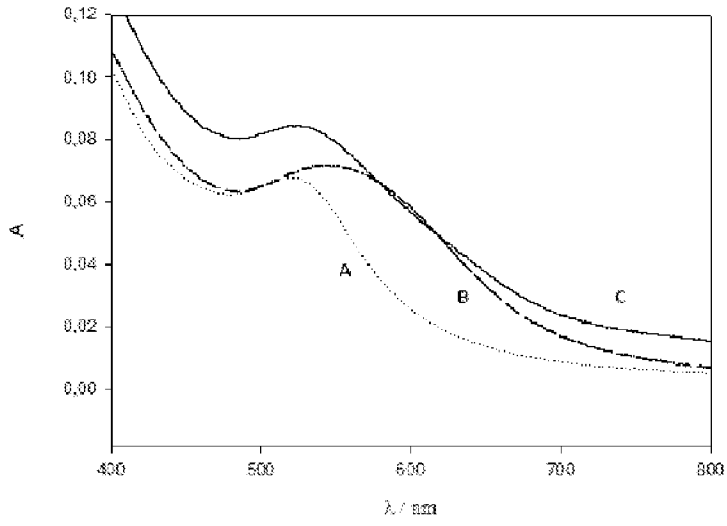


Fig. 6

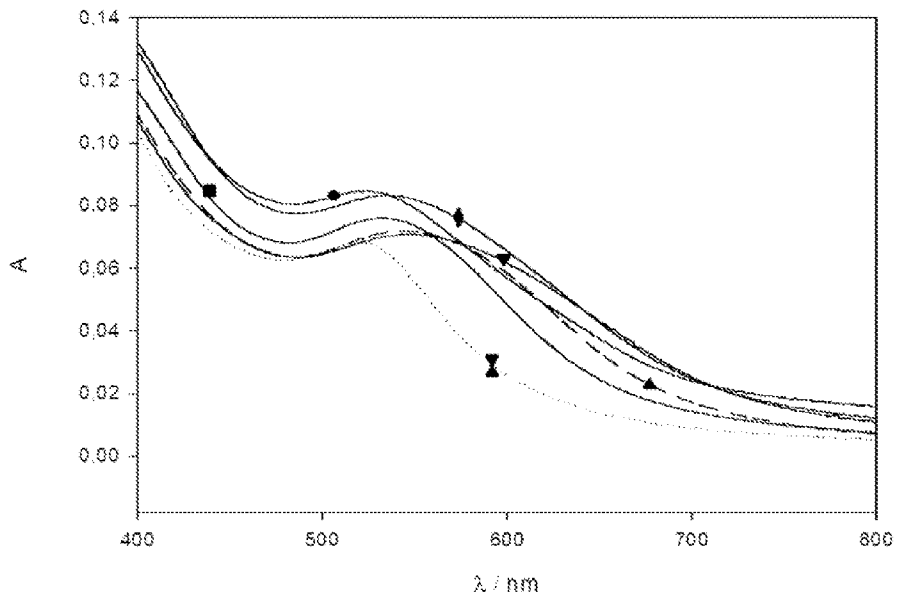
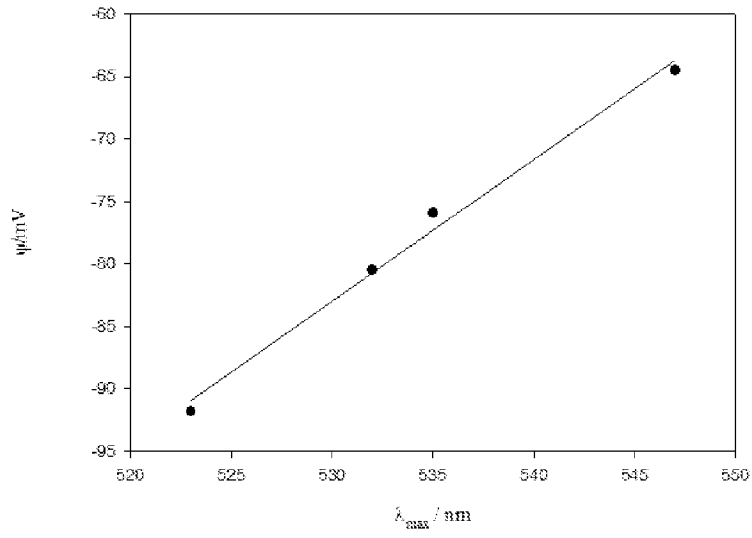




Fig. 7





OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②<sup>1</sup> N.º solicitud: 201130233

②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 23.02.2011

③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ <sup>1</sup> Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	HUIXIANG LI y LEWIS ROTHBERG. Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA. Vol 101, no. 39, 2004, páginas 14036-14039. Páginas 14037 y 14038.	1-12
A	XIAODI SU y ROEJAREK KANJANAWARUT. Control of metal nanoparticles aggregation and dispersion by PNA and PNA-DNA complexes, and its application for colorimetric DNA detection. AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. Vol. 3, no. 9, 2009, páginas 2751-2759. Páginas 2751 y 2752.	1-12
A	QIU DAI et al. A one-step highly sensitive method for DNA detection using dynamic light scattering. AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. Vol 130, 2008, páginas 8138-8139.	1-12

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

13.11.2012

Examinador

S. González Peñalba

Página

1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12Q1/68** (2006.01)  
**G01N33/52** (2006.01)  
**C12N15/10** (2006.01)  
**B82Y5/00** (2011.01)

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

C12Q, G01N, C12N, B82Y

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, EMBASE, NPL, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 13.11.2012

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-12	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-12	<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.

**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	Numero Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	HUIXIANG LI y LEWIS ROTHBERG. Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA. Vol 101, no. 39, 2004, páginas 14036-14039. Páginas 14037 y 14038.	
D02	XIAODI SU y ROEJAREK KANJANAWARUT. Control of metal nanoparticles aggregation and dispersion by PNA and PNA-DNA complexes, and its application for colorimetric DNA detection. AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. Vol. 3, no. 9, 2009, páginas 2751-2759. Páginas 2751 y 2752.	
D03	QIU DAI et al. A one-step highly sensitive method for DNA detection using dynamic light scattering. AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. Vol 130, 2008, páginas 8138-8139.	

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

La presente solicitud de patente, tal y como ha sido redactada, hace referencia a un método colorimétrico para la detección y/o cuantificación de polielectrolitos aniónicos de alta carga, que comprende: añadir nanopartículas de oro protegidas con iones citrato (AuNPs) agregadas, a una muestra problema y determinar el grado de desagregación de las nanopartículas mediante la medida de la relación de absorbancia a 520 nm y 560 nm, donde la desagregación de las nanopartículas es indicativo de la presencia de polielectrolito aniónico en la muestra (reivindicación 1). Se induce, previamente, la agregación de las nanopartículas de oro protegidas con iones citrato, mediante la adición de un electrolito (reivindicación 2). El polielectrolito aniónico de alta carga es ADN de cadena doble (reivindicación 3) y micelas aniónicas (reivindicación 4), donde las micelas aniónicas son micelas de SDS (reivindicación 5). El electrolito es NaCl (reivindicación 6). El tamaño de las partículas de oro protegidas con iones citrato se encuentra comprendido entre 3-20 nm (reivindicación 7). Y por último, se reivindica también el kit para llevar a cabo dicho método colorimétrico (reivindicaciones 8-11) y el uso de dicho kit para la detección y/o cuantificación de polielectrolitos aniónicos de alta carga (reivindicación 12).

**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA ARTS. 6 Y 8 DE LA LP**

El documento D01 se refiere a un método colorimétrico de detección de DNA basado en las interacciones electrostáticas de éste con nanopartículas de oro. El dsDNA y ssDNA tienen diferentes propiedades electrostáticas, esta diferencia es la que hace que el ssDNA sea capaz de adsorberse sobre las nanopartículas de oro mientras que dsDNA no lo es (véase página 14036). La adsorción del ssDNA sobre las nanopartículas de oro estabiliza las partículas de oro coloidal contra la agregación cuando se introduce una sal. De este modo, soluciones con cantidades adecuadas de ssDNA previenen la agregación y el coloide de oro mantiene su color rosa, mientras que soluciones con dsDNA no afectan a la agregación y las soluciones se vuelven de color azul (véase páginas 14037 y 14038).

El documento D02 trata sobre un método colorimétrico para la detección de DNA que utiliza ácidos nucleicos peptídicos (PNA). Se ha observado que la utilización de estos PNA puede conducir a la agregación inmediata de nanopartículas de oro y plata (AuNPs y AgNPs) y cuya agregación puede verse interrumpida por la hibridación de PNA a un ADN específico (véase páginas 2751-2752). Se utiliza PNA como un coagulante para alterar la estabilidad intrínseca de AuNPs (y AgNPs) y no se requiere el uso de una sal para inducir la agregación de las partículas.

El documento D03 describe como las nanopartículas de oro (AuNPs) para la detección de ADN han sido ampliamente utilizadas en una gran variedad de métodos y como a pesar de ello siguen teniendo dichos métodos una baja sensibilidad para la detección de DNA, por lo que se propone un método altamente sensible de una sola etapa para la detección de DNA utilizando dispersión de luz dinámica (véase páginas 8138-8139).

Por lo tanto, ninguno de los documentos citados anteriormente, solos o en combinación, revelan el método colorimétrico para la detección y/o cuantificación de polielectrolitos aniónicos de alta carga de la presente solicitud de patente, ni tampoco existen sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en las reivindicaciones 1-12. Por lo que las reivindicaciones 1-12 cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la LP.