



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 303 495**

⑫ Número de solicitud: **200800296**

⑮ Int. Cl.:

G01N 27/327 (2006.01)

C07K 14/825 (2006.01)

C08G 75/20 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑬ Fecha de presentación: **04.02.2008**

⑦① Solicitante/s: **Universitat Autònoma de Barcelona
Area I+D Edifici A - Campus Universitari, s/n
08193 Bellaterra, Barcelona, ES
Universitat de Barcelona**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.2008**

⑦② Inventor/es: **Fàbregas Martínez, Esteve;
Muñoz Tapia, María;
Capdevila Vidal, Mercè;
Atrian Ventura, Silvia y
González Bellavista, Anna**

⑬ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.08.2008

⑦④ Agente: **No consta**

⑮ Título: **Biosensor selectivo a metalotioneínas.**

⑮ Resumen:

Biosensor selectivo a metalotioneínas.

La presente invención se engloba dentro del campo de la electroquímica y se refiere, de forma general, a electrodos y sensores selectivos a iones, más específicamente, a electrodos selectivos a metalotioneínas, al método de construcción de dichos electrodos y al método que emplea dichos electrodos para la cuantificación de diferentes isoformas de metalotioneínas en muestras de origen biológico.

DESCRIPCIÓN

Biosensor selectivo a metalotioneínas.

5 La presente invención se engloba dentro del campo de la electroquímica y se refiere, de forma general, a electrodos y sensores selectivos a iones, más específicamente, a electrodos selectivos a metalotioneínas, al método de construcción de dichos electrodos y al método que emplea dichos electrodos para la cuantificación de diferentes isoformas de metalotioneínas en muestras de origen biológico.

10

Estado de la técnica

Las metalotioneínas (MTs) son proteínas de baja masa molecular (6 a 7 kDa), presentes en todos los organismos y capaces de unir metales pesados. Muestran un alto contenido de grupos tiol provenientes del aminoácido cisteína, que constituye el 33% de la molécula. Actualmente se han descrito más de 200 MTs pertenecientes a un centenar de organismos. En concreto, en mamífero, se han descrito cuatro isoformas de las MTs (numeradas del 1 al 4) y de MT1 hasta 13 subisoformas. La MT-1 y la MT-2 se sintetizan en casi todos los tejidos del organismo, siendo particularmente importante su presencia en órganos parenquimatosos como el hígado, riñón, intestino, testículos, pulmón, corazón y cerebro. La MT-3 se localiza predominantemente en cerebro y en menor cantidad en páncreas e intestino, tracto reproductor masculino y femenino, estómago, corazón y riñón. La MT-4 se detecta en epitelios escamosos estratificados.

20 Estudios de expresión génica han mostrado que estas proteínas se sintetizan en respuesta a una gran variedad de estímulos fisiológicos y químicos, como son: hormonas, citoquinas, especies reactivas de oxígeno, estrés y, de manera importante, metales. Recientemente se han relacionado con procesos de estrés inflamatorio, especialmente durante una respuesta de fase aguda, aunque su función en estos procesos aún está por definir.

25 La cuantificación de las metalotioneínas ha sido un reto que ha propiciado el desarrollo de un gran número de métodos para su determinación. La identificación y caracterización estructural de las MTs son procesos imprescindibles para esclarecer las funciones específicas que estas proteínas desarrollan en el organismo y el papel que juegan en relación con factores externos, como la presencia de metales pesados.

30 Hasta el momento se han desarrollado técnicas para la cuantificación total de MTs (*M. Sato, K.T. Suzuki, Biomed. Res. Trace Elements 6 (1995): 13*). Así, se han empleado técnicas electroanalíticas, espectrofotométricas UV-Vis, ensayos de saturación metálicos y métodos inmunológicos para la determinación de estas proteínas (Tabla 1).

40

(Tabla pasa a página siguiente)

45

50

55

60

65

TABLA 1

Técnicas para la determinación de las metalotioneínas. GFC-FPLC-ETAAS: cromatografía de filtración por gel; cromatografía líquida para separación rápida de proteínas; espectrometría de absorción atómica electrotérmica; IEC-ETAAS: cromatografía de intercambio iónico; espectrometría de absorción atómica electrotérmica; IE-HPLC-FAAS: cromatografía líquida de alta resolución de intercambio iónico; espectrometría de absorción atómica de llama; SPE-CAC-TDI gels-AAS: Extracción en fase sólida para cromatografía de afinidad covalente con intercambio tiolato-disulfuro; espectrometría de absorción atómica; HPLC: cromatografía líquida de alta resolución; DPP: Polarografía diferencial de pulsos; ELISA: enzimoinmunoanálisis

Técnica	LD (ng/100µL)	Determinación	Muestra	Referencia
GFC-FPLC-ETAAS		Total MT (indirecto)	Insecto <i>O. cincta</i>	P.J. Hensbergen, et al. <i>Biochem. Physiol. C</i> 125 (2000): 17.
IEC-ETAAS	2 ng/mg proteína	MT isoformas (indirecto)	Hígado de pescado	M. Lacorn, et al. <i>Environ. Toxicol. Chem.</i> 20 (2001): 140
IE-HPLC-FAAS	46 (MT-1) 31 (MT-2)	MT isoformas (indirecto)	Hígado de rata	K. Nöstelbacher, et al. <i>J. Chromatogr. B</i> 744 (2000): 273
SPE on CAC-TDI geles-AAS	0.9	Total MT (indirecto)	Leche materna humana (Cd-MT)	A.K. Kabzinski, <i>Biomed. Chromatogr.</i> 12 (1998): 217.
SPE CAC-TDI geles-AAS	0.7-0.9	Total MT (indirecto)	Fluidos biológicos (Zn-MT)	A.K. Kabzinski, <i>Biomed. Chromatogr.</i> 12 (1998): 281.
HPLC, detección por UV	400	Total MT (directo)	Tejido de hígado de rata	N. et al. <i>Ann. Biol. Clin.</i> 54 (1996): 87
HPLC, detección por UV	3.1	MT isoformas (directo)	Cultivo de células de hígado de humano	R. Studer, P.E. Hunziker, <i>J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.</i> 20 (1997): 617.
DPP	62	Total MT (directo)	Muestras comerciales (Cd, ZnMT)	A. Muñoz, A.R. Rodríguez, <i>Analyst</i> 120 (1995) 529
ELISA	0.2	Total MT (directo)	Orina de rata y humana	W. Tang, T. Kido, W.A. Gross, K. Nogawa, E. Sabbioni, A. Shaikh, <i>J. Anal. Toxicol.</i> 23 (1999) 153.
ELISA	0.8	Total MT (directo)	Orina de rata	Hirauchi, M. Okabe, T. Nagashima, T. Niioka, <i>Trace Elem. Electrolytes</i> 16 (1999): 177.

Existen dos tipos de aproximaciones: los métodos indirectos y los directos. El uso de métodos electroanalíticos para la cuantificación de las MTs se basa en las propiedades redox de los complejos formados por los grupos tiol de las proteínas con los iones metálicos. La capacidad de saturación de la molécula con iones metálicos ha sido aprovechada por los métodos de cuantificación indirectos de las MTs, como por ejemplo los ensayos de afinidad metálica.

Las propiedades colorimétricas de diferentes reactivos en combinación con los grupos tiolato de la proteína son la base de las determinaciones espectrofotométricas. De la misma manera, la inmunoreactividad con anticuerpos específicos ha sido usada por los métodos inmunológicos.

Un paso adelante en el análisis de las MTs consiste en la detección de las diferentes isoformas presentes en una misma muestra. Con este objetivo, se emplean técnicas de separación como la electroforesis capilar (CE) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), típicamente ligadas a detectores de elementos específicos, para la cuantificación indirecta de las MTs.

La heterogeneidad de las muestras provenientes de tejidos, fluidos biológicos o cultivos celulares, requiere estrategias que impliquen aproximaciones diferentes, adaptación de una metodología existente o el desarrollo de nuevos protocolos.

Los métodos comentados (Tabla 1) para la determinación de las MTs presentan dificultades que hacen que la cuantificación de éstas sea una tarea incómoda. Además, en los protocolos de la mayoría de los métodos, aparecen dos problemas implícitos en la naturaleza de la proteína: la oxidación de las MTs y el polimorfismo que presentan.

Los complejos metal-MT contenidos en muestras biológicas se pueden obtener después de procesos de aislamiento y purificación. Tanto si la proteína está totalmente saturada de metal como si no lo está, la elevada presencia de grupos tiol puede llevar, en condiciones aeróbicas, a la oxidación de éstos y, consecuentemente, de la proteína por formación de enlaces disulfuro intra o inter-moleculares durante el proceso de aislamiento o durante la manipulación de la muestra.

En relación con los problemas derivados del polimorfismo de las MTs, el gran número de isoformas y subisofomas de estas proteínas hace que la aplicación de las técnicas inmunológicas en muestras biológicas sea difícil. Para aumentar la sensibilidad y la selectividad de estos métodos, la especificidad de los anticuerpos es muy importante. La ausencia de muestras patrón de MT, dificulta la comparación de resultados entre diferentes laboratorios, porque cada uno tiene su propio método de aislamiento.

Descripción de la invención

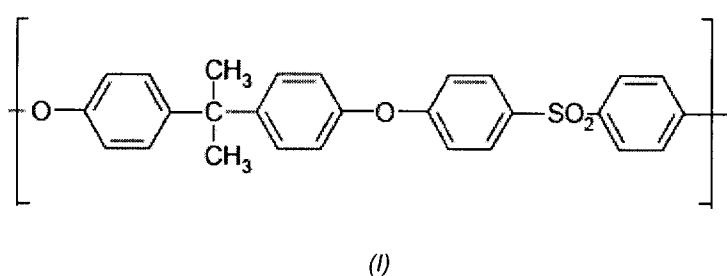
Con el objetivo de superar las dificultades asociadas a los métodos actualmente empleados, los autores de la presente invención han dirigido sus investigaciones al desarrollo de un electrodo selectivo a iones (ISE) para la cuantificación de MTs, ya que en la actualidad no existe ningún electrodo selectivo a estas metaloproteínas.

Los electrodos selectivos a iones son sensores electroquímicos que, gracias al potencial electrostático que adquiere la membrana selectiva a iones cuando ésta se pone en contacto con una disolución, permiten analizar cuantitativamente el analito al que es selectiva la membrana. Esta selectividad viene conferida por una especie química (ionóforo) que interacciona de forma selectiva con el analito a determinar.

Hasta ahora, el material polimérico más importante de los empleados como matriz en la elaboración de ISEs, era el PVC. Se han probado otros materiales alternativos como la goma de silicona, los epoxi-políuretanos y el PVC modificado (Moody, G.J. *et al. Analyst*, 112 (1987), p.1143 y Cha, S.G. *et al. Anal. Chem.*, 63 (1991), p.1666) para mejorar la adherencia sobre la superficie de los dispositivos de estado sólido o para reducir la adsorción de macromoléculas procedentes de muestras analíticas. A pesar de ello, el PVC sigue siendo el polímero más empleado en la preparación de membranas para ISEs.

Sin embargo, la incorporación de material biológico en membranas de PVC no es fácil debido, básicamente, al empleo de disolventes orgánicos (normalmente tetrahidrofurano), en los cuales las proteínas (enzimas, anticuerpos, etc) se disuelven pobremente, lo que suele alterar su actividad o propiedades (Cha, S.G. *et al. Anal. Chem.*, 63 (1991), p.1666).

Actualmente, el empleo de membranas de polisulfona, PS, (I) como matriz polimérica ha abierto grandes posibilidades en los electrodos de contacto sólido (G. Harsanyi, *Polymers Films in Sensor Applications*, TECHNOMIC publication, Lancaster 1995). La principal ventaja respecto al PVC es que la polisulfona permite incorporar, además de los ionóforos que dan la selectividad potenciométrica a la membrana, materiales biológicos (enzimas, anticuerpos, etc) desde una fase acuosa.



En la presente invención, la incorporación del material biológico a la membrana tiene lugar mediante la técnica de inversión de fase, es decir, el agua penetra en la polisulfona induciendo su precipitación por desplazamiento de la dimetilformamida (DMF) donde se disuelve (Prieto-Simón *et al. Biosens. Bioelectron.* 2006, 22, 131-137; Prieto-Simón *et al. Biosens. Bioelectron.* 2007, 22, 2663-2668; Prieto-Simón *et al. Talanta*, 2007, 71, 2102- 2107; Sánchez, S. *et al. Biosens. Bioelectron.*, 2007, 22, 965-972; Sánchez, S. *et al. Analyst*, 2007, 132, 142-147.; Sánchez, S. *et al. Biosens. Bioelectron.* 2007; Nunes, S.P. *et al. Membrane Technology in the Chemical Industry*; WILEY-VCH Verlag GMBH, D-69469, Weinheim, Germany, 2001).

65 Esta técnica de inmovilización mantiene las proteínas prácticamente intactas durante todo el proceso, ya que permanecen siempre en medio acuoso a un pH controlado. Además, mediante este procedimiento, la cantidad de proteína requerida se reduce de forma significativa, ya que permanece unida principalmente a las capas externas de la membrana.

Durante los últimos años y en base a sus características coordinantes, se han empleado algunas MTs y otros polipéptidos que interaccionan con metales para la construcción de biosensores de iones metálicos, pero siempre

limitándose a sensores de capacitancia (*Bontidean, I. et al. Biosens. Bioelectron. 2003, 18, 547-553; Bontidean, I. et al. Anal. Chem. 1998, 70, 4162-4169; Corbisier, P. et al. Anal. Chim. Acta 1999, 387, 235-244*). Éstos muestran una baja selectividad y requieren regeneración con EDTA tras cada uso. Por otra parte, en el documento de patente WO2006045103, se describe un dispositivo basado en el empleo de MTs sobre un soporte sólido con el objetivo de 5 eliminar selectivamente metales pesados de muestras líquidas contaminadas. En esta aplicación, las MTs se incorporan en una membrana comercial por adsorción (Pall biodyne).

Ahora, los autores de la presente invención, han desarrollado electrodos potenciométricos selectivos a MTs basados 10 en una membrana de polisulfona que incorpora diferentes metalotioneínas que actúan como ionóforos. Estos electrodos son selectivos a isoformas concretas de metalotioneína, en función de la molécula elegida como ionóforo. Asimismo, estos electrodos permiten la cuantificación de diferentes isoformas de metalotioneína y su empleo en una amplia variedad de muestras que no requieren un tratamiento previo especial.

Estos dispositivos, además de ser de medida directa para las MTs, presentan ventajas muy significativas en cuanto 15 a tiempo de análisis con respecto a los métodos descritos en el estado de la técnica. Presentan una buena selectividad y no requieren ni incubación ni procesos de regeneración.

Emplean una instrumentación muy sencilla, lo que permite realizar mediciones de campo, así como la construcción 20 de microelectrodos para la cuantificación de MTs en células individuales. Además, el electrodo de la presente invención puede almacenarse en seco y muestra un largo tiempo de vida.

Finalmente, el electrodo desarrollado presenta las siguientes ventajas, propias de los sensores químicos, frente a los equipos de laboratorio empleados actualmente en la determinación de MTs:

- 25 - dispositivos pequeños y robustos,
- respuesta rápida,
- producción masiva a bajo coste,
- 30 - integración del procedimiento analítico,
- permite la monitorización de parámetros y aplicaciones *in situ*, y
- 35 - portabilidad. Esta es una ventaja especialmente destacable ya que permite efectuar medidas de campo sin necesidad de trasladar la muestra a un laboratorio (evitando la posible alteración de las muestras).

En primer lugar, la presente invención contempla un electrodo selectivo a metalotioneínas (MTs) que comprende 40 una metalotioneína, que actúa como ionóforo, incorporada en el interior de una membrana de polisulfona (PS).

Es también objeto de la invención un método para la construcción de dicho electrodo selectivo a metalotioneínas.

Finalmente, es objeto de la invención un método para la cuantificación de diferentes isoformas de metalotioneínas 45 en muestras de origen biológico.

En un aspecto de la presente invención se contempla un electrodo selectivo a metalotioneínas (MTs) que comprende una metalotioneína, que actúa como ionóforo, incorporada en el interior de una membrana de polisulfona (PS), que permite incorporar material biológico en su interior.

50 Las metalotioneínas se caracterizan por su bajo peso molecular y su alta capacidad de unión a iones de metales pesados a través del alto contenido en cisteína (33%) de su estructura primaria. Los electrodos contemplados en la presente invención utilizan metalotioneínas como ionóforos, resultando éstas selectivas a ellas mismas, incluso con capacidad para diferenciar entre las diferentes isoformas de MT de un mismo organismo.

55 En una realización particular, el ionóforo empleado comprende un complejo metálico de dicha metalotioneína (P_n -MT), donde P es un metal pesado, preferiblemente zinc.

En una realización preferida, el electrodo presenta selectividad a la isoforma MT1 de mamífero. En este caso el 60 ionóforo empleado es el complejo metálico Zn_7 -MT1. Dicho electrodo permite cuantificar la MT1 de una determinada muestra aunque estén presentes otras isoformas de mamífero (como MT2, MT3 y MT4) que podrían interferir en la medida.

En otro aspecto de la invención se contempla el método para la construcción de los electrodos selectivos a metalotioneínas objeto de la invención que comprende las siguientes etapas:

- 65 a) preparación de una disolución de PS y N,N'-dimetilformamida (DMF);
- b) preparación de una disolución de la especie que actuará como ionóforo;

- c) deposición de la solución de PS/DMF preparada en a) sobre la superficie del cuerpo del electrodo; y
d) incorporación del ionóforo en la membrana de PS mediante la inmersión del electrodo en la disolución preparada en b) para que mediante la técnica de inversión de fase de lugar a la biomembrana final.

5 Gracias a la técnica de inversión de fase, los ionóforos se incorporan a la membrana de PS sin manipularlos, sumergiendo directamente el electrodo en la solución proteica de la MT considerada. Los electrodos así construidos no requieren ninguna etapa de acondicionamiento con ninguna disolución. La disolución de proteína puede ser escasa y/o cara por lo que la ausencia de una etapa de acondicionamiento supone ventajas económicas.

10 En una realización particular, la concentración de la disolución obtenida en a) está comprendida entre 50 y 150 mg de PS por mL de DMF, preferiblemente entre 75 y 125 mg PS/mL DMF.

15 En otra realización particular, la especie empleada como ionóforo en la disolución de la etapa b) es la molécula $Zn_7\text{-MT1}$, a una concentración comprendida entre 10^{-7} y 10^{-3} mol/L, preferiblemente entre $5 \cdot 10^{-5}$ y $5 \cdot 10^{-4}$ mol/L.

19 Los electrodos descritos, pueden cuantificar diferentes isoformas de metalotioneína en muestras de origen biológico, operación que comprende las siguientes etapas:

- 20 i. Calibrar el electrodo con disoluciones patrón;
ii. Poner en contacto la muestra a analizar con el electrodo, y,
iii. Cuantificar la metalotioneína presente en la muestra problema mediante medidas potenciométricas.

25 En una realización particular, la calibración del electrodo puede llevarse a cabo por un procedimiento que comprende:

- 30 (1) sumergir el electrodo de trabajo y el de referencia en un volumen conocido de H_2O ;
(2) efectuar microadiciones de una disolución de concentración conocida del complejo $P_n\text{-MT}$ (siendo P un metal pesado) de la metalotioneína a cuantificar (en función del electrodo que estemos calibrando) que permita obtener lecturas en un intervalo de concentraciones que incluya la de la muestra problema; y
35 (3) representar el potencial (en mV) suministrado por la celda electroquímica al variar la concentración de $P_n\text{-MT}$ de la disolución utilizando una regresión lineal (fundamentada en la ecuación de Nernst ($E = A_1 + B_1 \cdot \log C$) para ajustar los valores de potencial obtenidos respecto al logaritmo de la concentración de $P_n\text{-MT}$.

40 La Figura 1 muestra una curva de calibración típica para aniones.

45 Una vez calibrado el electrodo y construida la curva de calibración, al poner el electrodo en contacto con la muestra problema se obtiene una señal analítica (potencial, mV) que se interpola en la recta de calibración para obtener la concentración de la metalotioneína que se quiere cuantificar.

50 Dado que las metalotioneínas se encuentran en las células de todos los organismos de los reinos animal y vegetal, cualquier tipo de muestra de origen biológico (que provenga de estos organismos, vivos o muertos) es potencialmente válida para ser cuantificada mediante el método propuesto. De especial interés son:

- 55 - Organismos (acuáticos o terrestres) que puedan actuar como biomarcadores de contaminación metálica por la acumulación de dichos metales en sus tejidos (moluscos, algunos peces, etc).
- Tejido del sistema nervioso central implicado en patologías como el Alzheimer y algunos tipos de esclerosis.
- Tejido de hígado y riñón relacionado con intoxicaciones por metales.
- Tejidos de una amplia variedad de órganos como marcadores tumorales.

60 Breve descripción de las figuras

65 Figura 1. Curva de calibración y parámetros clave de la caracterización de un electrodo selectivo a aniones. LD: Límite de detección; LIRL: Límite inferior de respuesta lineal. Log C: Logaritmo de la concentración de analito. (1) Zona de respuesta nula; (2) Zona no lineal o subnernstiana; (3) Zona lineal o nernstiana.

70 Figura 2. Construcción del cuerpo de los electrodos selectivos a iones de configuración convencional: (A) Conector y placa de cobre; (B) Soldadura perpendicular de la placa de cobre al conector; (C) Inserción del conector dentro del tubo de PVC; (D) Llenado con resina conductora. (E) Esquema final del electrodo construido.

Figura 3. Procedimiento de deposición de las membranas de polisulfona en los electrodos selectivos a MTs. (A) Cuerpo del electrodo con la superficie conductora. (B) Deposición de la disolución de PS/DMF (C) Inmersión del electrodo en la disolución del ionóforo (D) Membrana de polisulfona depositada sobre la superficie del electrodo; (1) Gota de PS/DMF (2) Ionóforo.

5 Figura 4. Calibración de un electrodo selectivo a la isoforma MT1 de mamífero en agua.

Figura 5. Calibración de un electrodo selectivo a la isoforma MT1 de mamífero en agua y en una disolución acuosa de MT4 de mamífero de concentración constante. (A) Calibración en agua (B) Calibración en presencia de MT4.

10 **Descripción detallada de realizaciones particulares**

15 *Materiales*

20 Se empleó polisulfona (PS) BASF 3010 natur (Frankfurt, Germany) como matriz polimérica y se escogió N,N-dimetilformamida (DMF) de Panreac (Barcelona, España). Todos los demás reactivos empleados fueron de grado analítico y se obtuvieron de Merck (Darmstadt Germany). Se empleó Milli-Q (Bedford, MA, USA) durante todo el ensayo. Para la preparación del electrodo, se obtuvo polvo de grafito de Merck, epoxy resin ARALDIT M de Uneco (Badalona, España) y el endurecedor HY 5162 de VANTICO (Barcelona, España).

25 *Biosíntesis de las metalotioneínas*

30 Se utilizó MT1 recombinante de mamífero sintetizada a partir de una construcción de DNA que permite su producción en la bacteria *Escherichia coli*. Los cultivos de bacterias transformadas con esta construcción produjeron una proteína de fusión MT-GST (MT-Glutatión-S-Transferasa), que fue recuperada y digerida con trombina, procedimiento que permitió la posterior purificación de las metalotioneínas como proteínas independientes. El suplemento de un determinado metal en el medio de cultivo bacteriano permitió la recuperación directa de la MT en forma del correspondiente complejo metálico.

35 *Métodos*

40 *Construcción del cuerpo del electrodo selectivo a iones de configuración convencional*

45 En un cuerpo cilíndrico de PVC, de 20 mm de largo y 6 mm de diámetro interno (Figura 2.C), se acopló una conexión hembra (2 mm) a la cual le había soldado perpendicularmente una placa de cobre (2,5 mm de radio) (Figuras 2.A y 2.B). El tornillo metálico que llevaba enroscada la conexión permitió que ésta quedase fijada en el interior del tubo de PVC. La cavidad que quedó al descubierto entre la placa y el cuerpo del electrodo, se llenó de pasta conductora epoxi-grafito (1:1), (epoxi: Araldit M- endurecedor HR (1:0.4)) (Figura 2.D), evitándose la formación de burbujas de aire. Se dejó secar en la estufa a 40°C durante 24 horas. Posteriormente, se pulió la superficie produciendo una depresión de 0,3 mm donde se depositaría la membrana.

50 *Construcción de los electrodos selectivos a metalotioneínas*

55 Se construyó un electrodo selectivo a la isoforma MT1 de mamífero. El ISE selectivo a MT1 incorporaba la especie Zn₇-MT1 en el interior de la membrana de PS actuando como ionóforo.

60 Para la preparación de la membrana selectiva a MT1, se disolvieron en un vial 100 mg de PS por mL de DMF. En otro vial, se diluyó la disolución proteica (disolución del ionóforo) a una concentración de 5·10⁻⁵ M (Tabla 2). Se depositó una gota de solución de PS/DMF preparada sobre la superficie del cuerpo del electrodo construido que precipitó inmediatamente al sumergirlo en la solución de proteína (Figura 3).

TABLA 2

65 *Composición de la membrana del biosensor selectivo a MT1*

	MT1-ISE
Ionóforo	Zn ₇ -MT1
Concentración	5.0·10 ⁻⁵ mol/L
mg PS/mL DMF	100 mg/mL

65 *Mediciones.* Las mediciones potenciométricas se llevaron a cabo empleado un potenciómetro digital, Crison pH 2002, con ± 0.1 mV de resolución (Alella, Spain) Las lecturas se controlaron por ordenador, empleando una línea de

comunicación serial (RS232C) conectada a un Pentium 4 con un software especialmente desarrollado. El software fue desarrollado por TMI (Alella, Spain). Como electrodo de referencia, se empleó un electrodo de doble unión Ag/AgCl de Orion Termo.

5 Los parámetros de calibración se obtuvieron de la construcción de la curva de calibrado en el rango $5.0 \cdot 10^{-8}$ - $5.7 \cdot 10^{-6}$ de MT1. (Figura 4). Los datos obtenidos se representaron como potencial frente al logaritmo de la concentración de MT1.

10 Una vez calibrado el electrodo, al ponerlo en contacto con la muestra problema, se obtuvo una señal analítica (potencial, en mV) que se interpoló en una curva de calibración para obtener la concentración de la isoforma MT1 ($3.1 \cdot 10^{-7}$ mol/L de MT1).

15 En el estudio de interferencias, es decir, al calibrar el electrodo en presencia de otra metalotioneína (en este caso la isoforma MT4 de mamífero) se observó que ésta afectaba de forma poco significativa al comportamiento del ISE selectivo a MT1. Esto puede verse en la Figura 5, donde se muestran las dos curvas de calibrado (con y sin presencia de interferente).

Las características analíticas de respuesta del electrodo selectivo a MT1 observadas fueron:

- 20 1) Límite de detección: se puede detectar MT1 por encima de $1.0 \cdot 10^{-7}$ M,
- 2) Límite de cuantificación: se puede cuantificar MT1 por encima de $1.0 \cdot 10^{-6}$ M,
- 25 3) La sensibilidad del electrodo es de -52 mV/dec,
- 4) El tiempo de respuesta del electrodo es de pocos segundos,
- 30 5) El tiempo de vida del electrodo es de como mínimo 1 mes,
- 6) El rango de pH en el cual el electrodo es capaz de detectar y cuantificar MT1 es amplio (2-7),
- 35 7) Los resultados en el estudio de interferencias indican que el electrodo es capaz de detectar MT1 en presencia de MT4 (que actúa como interferente) incluso si la concentración de MT4 es el doble que la de MT1, y
- 8) El electrodo se guarda en seco y a 4°C.

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Electrodo selectivo a metalotioneínas (MTs) que comprende una metalotioneína, que actúa como ionóforo, incorporada en el interior de una membrana de polisulfona (PS).
- 10 2. Electrodo, según la reivindicación 1, donde el ionóforo empleado comprende un complejo metálico de dicha metalotioneína (P_n -MT), siendo P un metal pesado.
- 15 3. Electrodo, según la reivindicación 2, donde el metal pesado es Zn.
4. Electrodo, según la reivindicación 2, donde la metalotioneína MT es MT1 de mamífero.
- 15 5. Electrodo, según reivindicación 2, que es selectivo a la metalotioneína MT1 de mamífero, y donde el ionóforo empleado comprende el complejo de zinc de dicha metalotioneína (Zn_7 -MT1).
- 20 6. Método para la construcción del electrodo definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende las siguientes etapas:
 - a) preparación de una disolución de PS y DMF;
 - b) preparación de una disolución de la especie P_n -MT que actuará como ionóforo;
 - c) deposición de la solución de PS/DMF preparada en a) sobre la superficie conductora del cuerpo del electrodo; y
 - 25 d) incorporación del ionóforo en la membrana de PS mediante la introducción del electrodo en la disolución preparada en b).
- 30 7. Método, según la reivindicación 6, donde la concentración de la disolución de PS/DMF obtenida en a) está comprendida entre 50 y 150 mg/mL.
8. Método, según la reivindicación 7, donde la concentración de la disolución de PS/DMF está comprendida entre 75 y 125 mg/mL.
- 35 9. Método, según la reivindicación 6, donde la concentración de la disolución de P_n -MT obtenida en b) está comprendida entre 10^{-7} y 10^{-3} mol/L.
- 40 10. Método, según la reivindicación 9, donde la concentración de la disolución de P_n -MT está comprendida entre $5 \cdot 10^{-5}$ y $5 \cdot 10^{-4}$ mol/L.
11. Método para la cuantificación de diferentes isoformas de metalotioneínas en muestras de origen biológico que comprende las siguientes etapas:
 - i. calibrar el electrodo de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, mediante disoluciones patrón,
 - 45 ii. poner en contacto la muestra a analizar con el electrodo, y
 - iii. cuantificar la metalotioneína presente en la muestra mediante mediciones potenciométricas.

50

55

60

65

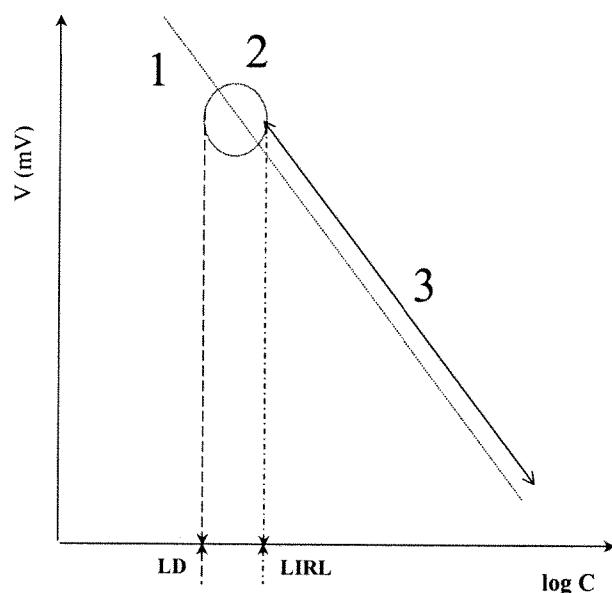


FIGURA 1

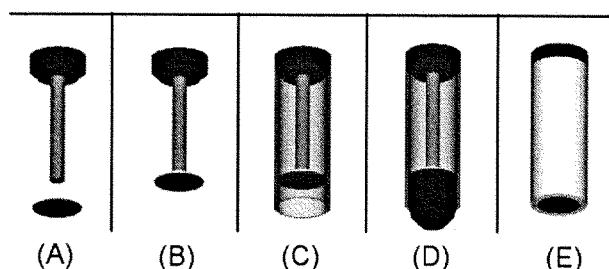


FIGURA 2

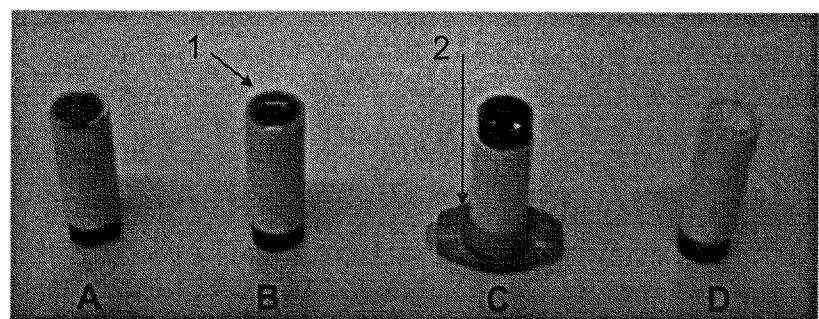


FIGURA 3

ES 2 303 495 A1

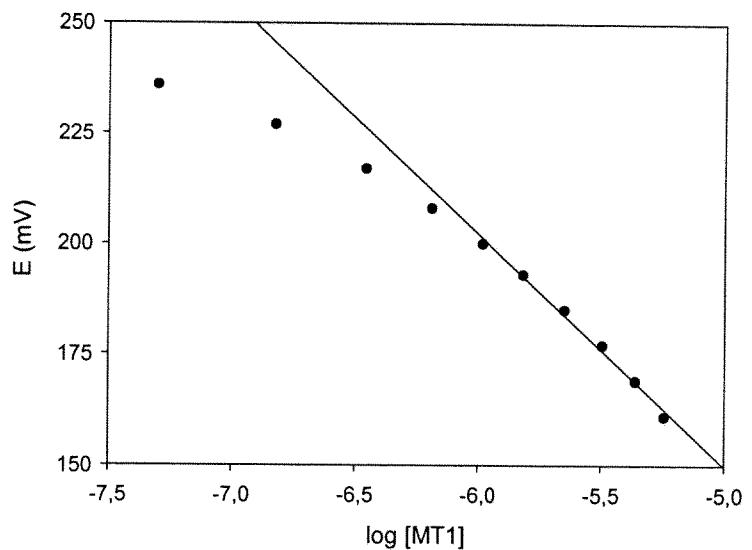


FIGURA 4

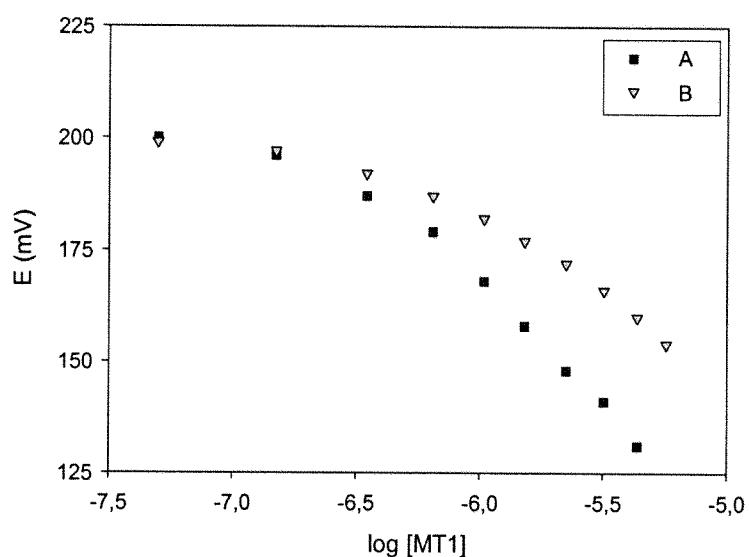


FIGURA 5



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 20070259452 A1 (SCHLENOFF J.B.) 8.11.2007, página 17, reivindicación 12; página 12, columna 1, líneas 15-24.	1-11
A	WO 2006045103 A2 (MGP BIOTECHNOLOGIES, LLC) 27.04.2006, reivindicación 1.	1-11
A	SANCHEZ-ORDÓÑEZ, S. & FÀBREGAS, E. "New antibodies immobilization system into a graphite-polysulfone membrane for amperometric immunosensors". Biosensors and Bioelectronics, 2007, Volumen 22, páginas 965-972. Ver resumen.	1-11
A	PETRLOVA, J. et al. "Cisplatin electrochemical biosensor". Electrochimica Acta, 2006, Volumen 51, páginas 5169-5173. Ver página 5171, columna 1, apartado 3.	1-11
A	DABRIO, M. & RODRIGUEZ, A. R. "Electrochemical study of human foetal liver methallothionein: influence of the additions of cadmium and zinc". Analytica Chimica Acta, 2000, Volumen 406, páginas 171-181. Ver resumen.	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

O: referido a divulgación no escrita

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

A: refleja el estado de la técnica

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 19.06.2008	Examinador N. Martín Laso	Página 1/2
--	------------------------------	---------------

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N 27/327 (2006.01)

C07K 14/825 (2006.01)

C08G 75/20 (2006.01)