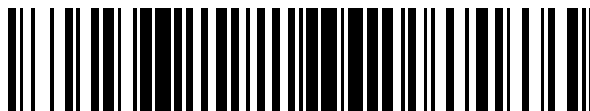


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 999**

21 Número de solicitud: 201731069

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

05.09.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

06.03.2019

71 Solicitantes:

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
(64.0%)
CAMINO DE VERA, S/N
46022 VALENCIA ES;
CONSORCIO CENTRO DE INVESTIGACION
BIOMEDICA EN RED, M.P. (16.0%);
INSTITUTO DE INVESTIGACION SANITARIA LA
FE-FUNDACION PARA LA INVESTIGACION DEL
HOSPITAL UNIVERSITARIO Y POLITECNICO LA
FE DE LA COMUNIDAD VALENCIANA (10.0%) y
UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI (10.0%)**

72 Inventor/es:

**RIBES MONPARLER , Àngela ;
AZNAR GIMENO, Elena ;
MARTÍNEZ MÁÑEZ , Ramón ;
SANCENÓN GALARZA, Félix ;
MARCOS MARTÍNEZ, María Dolores;
TORMO MAS , María Ángeles;
PEMÁN GARCÍA , Javier ;
MARSAL GARVI, Lluís Francisco y
XIFRÉ PÉREZ , Elisabet**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge;

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **Material poroso para la detección de Candida albicans, método de diagnóstico que lo utiliza y método de preparación del mismo**

57 Resumen:

Material poroso para la detección de Candida albicans, método de diagnóstico que lo utiliza y método de preparación del mismo.

Concretamente, la invención describe la obtención de un nuevo material poroso preparado para el reconocimiento de ADN del microorganismo patógeno Candida albicans, así como su utilización en un método de diagnóstico in vitro rápido y de gran sensibilidad.

ES 2 702 999 A1

DESCRIPCIÓN**Material poroso para la detección de *Candida albicans*, método de diagnóstico que lo utiliza y método de preparación del mismo**Campo de la invención

5

La presente invención se encuentra dentro del campo de los nuevos materiales con aplicaciones en la detección de especies de interés biológico, farmacológico y médico, los cuales pueden ser aplicados en métodos de diagnóstico *in situ*. Concretamente, se divulga la obtención de un nuevo material poroso preparado para el reconocimiento de ADN del microorganismo patógeno *Candida albicans*, así como su utilización en un método de diagnóstico *in vitro* rápido y de gran sensibilidad.

10

Antecedentes de la invención

15 En los últimos años se ha producido un auge importante en el desarrollo de materiales híbridos orgánico-inorgánicos con múltiples aplicaciones en diferentes campos científicos y tecnológicos. Dentro de estos materiales híbridos han despuntado, por sus posibles aplicaciones en procesos de liberación controlada y de reconocimiento molecular, aquellos que se han desarrollado teniendo en cuenta el concepto de "puerta molecular". Un material

20 híbrido funcionalizado con "puertas moleculares" está compuesto por un soporte poroso, que está capacitado para almacenar cierto tipo de moléculas/especies en sus poros interiores, y además posee una agrupación orgánica o inorgánica, que puede ser de naturaleza molecular o supramolecular, anclada en la superficie externa del mismo, donde dicha agrupación es capaz de modular, mediante la aplicación de un estímulo externo, la liberación de las

25 moléculas almacenadas en sus poros interiores, conocida como carga del soporte. Estos materiales representan una tecnología muy prometedora y han sido intensamente investigados en los últimos años en campos como la bioingeniería, biodetección y bionanotecnología abriendo así nuevos horizontes.^{1,2} Los estímulos externos más comúnmente empleados para controlar la apertura/cierre de las "puertas moleculares" se

30 pueden clasificar en: fotoquímicos, electroquímicos, iónicos (cambios de pH, presencia de determinados cationes y aniones), cambios de temperatura, cambios de polaridad, o la presencia de ciertas moléculas o biomoléculas (enzimas, sistemas antígeno-anticuerpo, hebras simples de ADN, etc.).³⁻⁵ Mediante la aplicación de estos estímulos externos se puede inducir la liberación de una especie indicadora (colorantes, fluoróforos, sustancias con

35 actividad redox, con resonancia plasmónica o biológicamente activas como agentes citotóxicos, proteínas, pequeñas biomoléculas, enzimas o fragmentos de ácidos nucleicos),

en el lugar y momento adecuado y de una forma controlada.⁶⁻¹² Aunque esta aplicación es muy importante, se han descrito pocos ejemplos de la aplicación de materiales híbridos orgánico-inorgánicos funcionalizados con “puertas moleculares” en protocolos de reconocimiento y detección.^{13-15a y 15b}

5

Para aplicar materiales híbridos con “puertas moleculares” en procedimientos de detección, habitualmente se cargan los poros del soporte inorgánico con una especie indicadora y se funcionaliza la superficie externa del sólido con (bio)moléculas, supramoléculas o partículas inorgánicas. La funcionalización del soporte se refiere a la unión o el anclaje sobre la superficie exterior del soporte de determinadas (bio)moléculas, supramoléculas o partículas inorgánicas, que interaccionarán con un analito diana determinado, induciendo un cambio espacial en la entrada de los poros del soporte; por tanto, en ausencia del analito diana, la “puerta molecular” estará cerrada, ya que las biomoléculas, supramoléculas o partículas inorgánicas ancladas en la superficie exterior del soporte, impiden o inhiben la liberación de las moléculas contenidas en los poros interiores. Sin embargo, en presencia del analito diana, este inducirá cambios en las estructuras/conformaciones de las (bio)moléculas, supramoléculas o partículas inorgánicas, que actúan de “puerta molecular”, y se llevará a cabo la liberación de la carga de los poros interiores. Esta liberación a la disolución se va a reflejar en un cambio físico, químico o biológico (por ejemplo, de color o fluorescencia) que puede ser cuantificado de forma fácil.^{16,17} Este nuevo concepto de detección difiere del sistema clásico supramolecular “subunidad coordinante-subunidad indicadora” ya que se desliga el proceso de reconocimiento del proceso de señalización.¹⁸⁻²⁴ Además, otra ventaja de este nuevo protocolo es la amplificación de la señal. Por ejemplo, en estos materiales se ha descrito que la presencia de pocas moléculas de analito puede inducir la liberación de grandes cantidades de especie indicadora del interior de los poros del soporte.²⁵

25

Por otra parte, en las últimas décadas, los casos por infecciones nosocomiales producidas por levaduras, como la candidiasis, han aumentado en los pacientes hospitalizados.²⁶ Existen varias cepas de *Candida* potencialmente peligrosas, aunque las infecciones más invasivas son las producidas por *Candida albicans*. Es pues muy importante y tiene gran interés diagnosticar, de forma rápida e inequívoca, los casos de infección producida por esta especie. Además, también es importante poder diferenciar entre *Candida albicans* y otras especies debido a los distintos tratamientos que se deben seguir para cada caso. De hecho, *Candida albicans* presenta una resistencia intrínseca al antimicrobiano más comúnmente utilizado, el fluconazol.²⁷ En la actualidad, existen métodos fiables que permiten la detección de *Candida*

35

albicans, sin embargo, son lentos, costosos y dependen de laboratorios especializados dotados de personal con formación específica.²⁸⁻³⁰

Referencias

- 5
1. E. Katz et al, *Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: synthesis, properties, and applications*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004, 43, 6042–6108.
 2. F. Wang, et al, *DNA switches: from principles to applications*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015, 54, 1098–1129.
 - 10 3. A. Bernardos, et al, *Enzyme-responsive intracellular controlled release using nanometric silica mesoporous supports capped with "saccharides"*, *ACS Nano*, 2010, 4(11), 6353–6368.
 - 4 A. Bernardos, et al, *Enzyme-responsive controlled release using mesoporous silica supports capped with lactose*, *Angew Chem Int Ed Engl.* 2009; 48(32): 5884–5887.
 5. N. Mas, et al, *Enhanced antifungal efficacy of tebuconazole using gated pH-driven mesoporous nanoparticles*, *Int. J. Nanomedicine.* 2014, 9, 2597–2606.
 - 15 6. E. Aznar, *Gated Materials for On-Command Release of Guest Molecules*, *Chem. Rev.*, 2016, 116, 561-718.
 7. A. B. Descalzo, et al, *The supramolecular chemistry of organic-inorganic hybrid materials*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, 45, 5924.
 - 20 8. R. Casasús, et al, *Dual Aperture Control on pH- and Anion-Driven Supramolecular Nanoscopic Hybrid Gate-like Ensembles*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 140, 1903-1917.
 9. S. Angelos, et al, *pH-responsive supramolecular nanovalves based on cucurbit[6]uril pseudorotaxanes*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, 47, 2222-2226.
 10. C. Park, et al, *Controlled Release of Guest Molecules from Mesoporous Silica Particles Based on a pH-Responsive Polypseudorotaxane Motif*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, 46, 1455-1457.
 - 25 11. M. Vallet-Regi, et al, *A New Property of MCM-41: Drug Delivery System*, *J. Chem. Mater.*, 2001, 13, 308–311.
 - 12 M. Vallet-Regi, et al, *Arcos, Mesoporous materials for drug delivery*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 46, 7548–7558.
 - 30 13. F. Sancenón, et al, *Gated Silica Mesoporous Materials in Sensing Applications*, *ChemistryOpen*, 2015, 4, 418 – 437.
 14. Y. Salinas, et al, *Chromo-Fluorogenic Detection of Nitroaromatic Explosives by Using Silica Mesoporous Supports Gated with Tetrathiafulvalene Derivatives*, *Chem. Eur., J.* 2014, 20, 855 – 866.
 - 35

- 15a E. Climent, et al, *Controlled Delivery Using Oligonucleotide-Capped Mesoporous Silica Nanoparticles*, *Angew. Chem.* 2010, 122, 7439–7441.
- 15b LI. Pascual, et al, *Oligonucleotide-capped mesoporous silica nanoparticles as DNA-responsive dye delivery systems for genomic DNA detection*, *Chem. Commun.*, 2015, 51, 1414-1416.
- 5 16. C. Coll, et al, *Gated Silica Mesoporous Supports for Controlled Release and Signaling Applications*, *Acc. Chem. Res.*, 2013, 46, 339–349.
17. E.Climent, et al, *Selective, Highly Sensitive, and Rapid Detection of Genomic DNA by Using Gated Materials: Mycoplasma Detection*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52, 8938 - 8942.
- 10 18. L. E. Santos-Figueroa, et al, *Chromogenic and fluorogenic chemosensors and reagents for anions. A comprehensive review of the years 2010–2011*, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, 42, 3489–3613.
19. M. E. Moragues, et al, *Chromogenic and fluorogenic chemosensors and reagents for anions. A comprehensive review of the year 2009*, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, 40, 2593–2643.
- 15 20. Y. Salinas, et al, *Optical chemosensors and reagents to detect explosives*, *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41, 1261–1296.
21. S. K. Kim, et al, *Chemosensors for pyrophosphate*, *Acc. Chem. Res.*, 2009, 42, 23-31.
22. X. Chen, et al, *Fluorescent and colorimetric probes for detection of thiols*, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, 39, 2120 - 2135.
- 20 23. A. P. de Silva, et al, *Signaling Recognition Events with Fluorescent Sensors and Switches*, *Chem. Rev.*, 1997, 97, 1515 - 1566.
24. R. Martínez-Máñez et al, *Fluorogenic and Chromogenic Chemosensors and Reagents for Anions*, *Chem. Rev.* 2003, 103, 4419 - 4476.
- 25 25. M. Hecht, et al, *Gated hybrid delivery systems: En route to sensory materials with inherent signal amplification*, *Coord. Chem. Rev.*, 2013, 257, 2589 -2606.
26. S.K. Fridkin, *The changing face of fungal infections in health care settings*, *Healthcare Epidemiology*, 2005, 41, 1455-1460.
27. A. Vahidnia, et al, *High throughput multiplex-PCR for direct detection and diagnosis of dermatophyte species, Candida albicans and Candida parapsilosis in clinical specimen*, *J. Microbiol. Methods*, 2015, 113, 38 - 40.
- 30 28. Y. Guo, et al, *A Real-Time PCR Assay Based on 5.8S rRNA Gene (5.8S rDNA) for Rapid Detection of Candida from Whole Blood Samples*, *Mycopathologia*, 2016, 181, 405-413.
29. J. Kim, et al, *Evaluation of the Punch-it™ NA-Sample kit for detecting microbial DNA in blood culture bottles using PCR-reverse blot hybridization assay*, *J. Microbiol. meth*, 2016, 35 128, 24-30.

30. X. Jiang, et al, *Rapid Detection of Candida albicans by Polymerase Spiral Reaction Assay in Clinical Blood Samples*, Front. Microbiol., 2016, 7, 916.

31. Y. H. Lim and D. H. Lee, *Rapid PCR Method for Detecting Candida albicans Using Primers Derived from the Integrin-like Protein Gene α INT1 of Candida albicans*, J. Microbiol, 2000, 38, 105-108.

32. E. P. Barrett, et al, *The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms*, J. Am. Chem. Soc. 1951, 73, 373-380.

33. S. Brunauer, et al, *Adsorption of Gases in Multimolecular Layers*, J. Am. Chem. Soc. 1938, 60, 309-319.

Descripción general de la invención

Los autores de la presente invención han obtenido un nuevo material poroso para la detección de *Candida albicans*, han desarrollado un método de preparación del mismo, así como un método de diagnóstico *in vitro* que lo utiliza.

Un primer aspecto de la presente invención está relacionado con un soporte de tipo material poroso para la detección de *Candida albicans* que comprende en los poros interiores una especie indicadora y en su superficie exterior fijada al menos una secuencia de ADN complementario a un fragmento del genoma de *Candida albicans*, donde la secuencia de ADN complementario bloquea la salida de la especie indicadora de los poros interiores del soporte.

La secuencia de ADN complementario a un fragmento del genoma de *Candida albicans* que se fija en la superficie exterior del material poroso y bloquea la salida de la especie indicadora de los poros interiores de dicho material junto con las estructuras orgánicas (grupos orgánicos neutros ó catiónicos) que la unen al material poroso, constituyen en la presente invención, lo que se conoce actualmente como “puertas moleculares”. Dada la estructura tridimensional y la conformación que posee la secuencia de ADN complementario, esta secuencia bloquea los poros del material poroso, impidiendo por tanto la salida de la especie indicadora.

Dichas secuencias de ADN son complementarias a una secuencia seleccionada del genoma de *Candida albicans*. En una realización particular de la presente invención, la secuencia de ADN complementario que bloquea los poros es complementaria a una secuencia del gen α INT1 de *Candida albicans*.³¹

En una realización particular de la presente invención, la secuencia de ADN complementario se une a la superficie exterior del soporte mediante un grupo orgánico neutro y un oligonucleótido de unión que hibrida con el ADN complementario de *Candida albicans*. En una realización más particular, la secuencia de ADN complementario que hibrida con el oligonucleótido de unión es el oligonucleótido O2 (SEQ No. 2) que es complementario a una secuencia del gen α INT1 de *Candida albicans*. En una realización más particular, el oligonucleótido de unión es el oligonucleótido O1 (SEQ No. 1). En una realización más particular, el oligonucleótido O1 (SEQ No. 1) se une a la superficie exterior del soporte mediante un grupo orgánico neutro. En una realización aún más particular el grupo orgánico neutro se selecciona de entre ácido carboxílico (-COOH), alcohol (-OH), aldehído (-CHO), alqueno, alquino, amina (-NH₂ ó -NR'R''), amida (-C(O)NR'R''), azida (-N₃), cetona (-C=O), ester (-COOR'), éter (R'-O-R''), halógeno, imina (RR'C=NR''), isocianato (-NCO), isotiocianato (-N=C=S), nitrilo (-C≡N), nitro (-NO₂) o tiol (-SH). En una realización preferida el grupo orgánico neutro es un grupo isocianato (-NCO).

En otra realización particular de la presente invención, la secuencia de ADN complementario se une a la superficie exterior del soporte mediante un grupo orgánico catiónico. En una realización más particular, la secuencia de ADN complementario que se une al grupo orgánico catiónico es el oligonucleótido O3 (SEQ No. 3) que es complementario a una secuencia del gen α INT1 de *Candida albicans*. En una realización más particular, el grupo orgánico catiónico se selecciona de entre aminas, grupos guanidinio (H-N=(NHR)NH₂), fosfonio (PH₄⁺) o de amonio cuaternario (NR₄⁺). R se selecciona de entre alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado y cicloalquilo C₃-C₆.

En una realización de la presente invención la secuencia de ADN se selecciona de entre:

Oligonucleótido O1- 5'-AAA AAA CCC CCC-3' (SEQ No. 1)

Oligonucleótido O2- 5'- TTT TGG GGG GTT GAG AAG GAT CTT TCC ATT GAT GGG GGG GTT TT-3' (SEQ No. 2)

Oligonucleótido O3- 5'-TTG AGA AGG ATC TTT CCA TTG ATG-3' (SEQ No. 3).

En una realización más particular de la presente invención la secuencia de ADN complementario se selecciona de entre:

Oligonucleótido 2- 5'- TTT TGG GGG GTT GAG AAG GAT CTT TCC ATT GAT GGG GGG GTT TT-3' (SEQ No. 2)

Oligonucleótido 3- 5'-TTG AGA AGG ATC TTT CCA TTG ATG-3' (SEQ No. 3).

En la presente invención, el material poroso se selecciona de entre dióxido de sílice mesoporoso en forma de nanopartículas, también conocido como nanopartículas mesoporosas de sílice (MSNs) o alúmina anodizada nanoporosa (AAN) en forma de film o placa. Más particularmente, el material poroso de la presente invención tiene una superficie
 5 específica de entre 200-1400 m²g⁻¹.

En una realización particular de la presente invención, el método de preparación del material poroso comprende las siguientes etapas:

- 10 a) Preparación de un soporte de dióxido de sílice poroso o de alúmina anodizada nanoporosa,
- b) Introducción de la especie indicadora en los poros interiores del sustrato preparado en la etapa a),
- c) Funcionalización del sustrato cargado obtenido en la etapa b) mediante la unión
 15 de un grupo orgánico neutro o catiónico a la superficie de dicho sustrato,
- d) Si es necesario, derivatización del sustrato con un oligonucleótido de unión unido al grupo orgánico neutro,
- e) Adición de una secuencia de ADN complementario a un fragmento del genoma de *Candida albicans* al soporte inorgánico poroso obtenido en la etapa c) o d).

20

En otra realización particular de la presente invención, el método de diagnóstico *in vitro* para la detección de *Candida albicans* comprende:

- 25 a) poner en contacto el soporte de tipo material poroso con la muestra de ADN a analizar, en una solución acuosa,
- b) incubar la mezcla del paso a) para que se produzca la reacción de hibridación,
- c) medir la cantidad de especie indicadora liberada a la fase acuosa de la mezcla.

Cuando se ponen en contacto el material poroso con una muestra que contiene el ADN
 30 genómico de *Candida albicans*, en una solución acuosa, se producirá la hibridación de éste con la secuencia de ADN que se emplea como “puerta molecular”, con la consiguiente apertura o desbloqueo de los poros y la liberación de la especie indicadora albergada en el interior de dicho material poroso. Estos materiales van a ser capaces de detectar selectivamente la presencia de *Candida albicans* constituyendo un sistema sensor rápido,
 35 sencillo y altamente sensible.

Este nuevo material poroso para el diagnóstico *in vitro* de la infección producida por *Candida albicans* posee una alta sensibilidad y especificidad, su coste de fabricación es bajo y permite una detección rápida de la infección en la misma consulta médica en la que se toma la muestra del paciente, minimizando así la dependencia de laboratorios especializados y de personal de laboratorio con formación específica.

Adicionalmente, es posible plantear las siguientes ventajas:

- Facilitar el diagnóstico y toma de decisiones médicas, mediante el empleo de una potente y rápida herramienta de detección (método de diagnóstico *in vitro*) de la infección de *Candida albicans*.
- Reducir el tiempo de diagnóstico desde los 3-4 días a 10-15 minutos.
- Disminuir el coste de la prueba diagnóstica hasta 5 veces su valor actual.
- Limitar la dependencia de laboratorios especializados para detectar la presencia de *Candida albicans* en una muestra de paciente.
- Diagnosticar *Candida albicans* en la misma consulta en la que se toma la muestra del paciente.
- Aplicar conceptos y conocimientos de química supramolecular en el diseño de dispositivos nanoscópicos encaminados a dar respuesta a las necesidades clínicas de los pacientes.
- Aportar al mercado nacional e internacional una tecnología innovadora capaz de revolucionar el sector sanitario con un material sonda para la detección de *Candida albicans*, responsable de un elevado porcentaje de infecciones en el mundo.

En la presente invención el término “funcionalizado”, tal y como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se refiere a la modificación química del soporte poroso con grupos funcionales neutros o catiónicos, tal y como se ha mencionado anteriormente.

En la presente invención el término “método de diagnóstico *in vitro*”, tal y como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se refiere a un protocolo para la detección sensible y selectiva de *Candida albicans*.

En la presente invención el término “cargado”, tal y como se utiliza en la descripción se refiere a la incorporación de la especie indicadora en el interior de los poros del soporte poroso mediante un proceso de difusión o de impregnación.

En la presente invención el término “especie indicadora” se refiere a cualquier especie susceptible de ser cuantificada como pueden ser colorantes, fluoróforos, sustancias con actividad redox, con resonancia plasmónica o biológicamente activas como agentes citotóxicos, proteínas, pequeñas biomoléculas, enzimas o fragmentos de ácidos nucleicos.

5

En la presente invención el término “derivatización” se refiere a la modificación del grupo orgánico anclado a la superficie porosa con el oligonucleótido de unión mediante la formación de un enlace químico.

10 Aplicabilidad industrial

El nuevo método de diagnóstico *in vitro* de la infección producida por *Candida albicans* constituye una sólida propuesta que mejora potencialmente el posicionamiento del sector de la Tecnología Sanitaria y el de sus empresas, creando nuevas oportunidades en el sector.

15 Gracias al uso de esta nueva herramienta de detección se podrían reducir considerablemente los costes y recursos que a día de hoy dedican a la detección de esta infección.

Breve descripción de las figuras

20 La Figura 1 muestra el esquema del material S1. En este caso, el material poroso está cargado con la especie indicadora (colorante/fluoróforo) y funcionalizado con un grupo orgánico neutro.

La Figura 2 muestra el esquema del material S2. En este caso, el material poroso está cargado con la especie indicadora (colorante/fluoróforo), funcionalizado con un grupo orgánico neutro, 25 y donde el oligonucleótido O1 (SEQ No. 1) está anclado covalentemente mediante un grupo funcional urea.

La Figura 3 muestra el esquema del material S3. En este caso, el material poroso está cargado con un colorante/fluoróforo, y funcionalizado con el oligonucleótido O1 (SEQ No. 1) sobre el 30 que hibrida el oligonucleótido O2 (SEQ No. 2).

La Figura 4 muestra el esquema del material S4. En este caso, el material poroso está cargado con un colorante/fluoróforo y la superficie externa está funcionalizada con un grupo orgánico catiónico.

35

La Figura 5 muestra el esquema del material S5. En este caso, el material poroso está cargado con un colorante/fluoróforo, y funcionalizado con el oligonucleótido O3 (SEQ No. 3).

La Figura 6 muestra:

5

- I) difractograma de rayos X en polvo para: a) MSNs sin calcinar, b) MSNs calcinada, c) S1 (que es igual al S4), d) material S2, y e) material S3 (igual al S5).
- II) imágenes de microscopía de transmisión electrónica para: A) MSNs calcinada y B) material S3,S5 mostrando la morfología esférica típica de las nanopartículas.

10

La Figura 7 muestra imágenes de microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) de:

a) alúmina porosa sin funcionalizar, y

15

B) alúmina porosa funcionalizada con oligonucleótidos (que pueden estar anclados en el soporte mediante enlaces covalentes (S8) o interacciones electrostáticas (S10). En ambas imágenes se puede apreciar el sistema desordenado de poros de la matriz inorgánica.

20

La Figura 8 (A y B) muestra el esquema del funcionamiento de los materiales S3 y S5 en presencia de ADN genómico de *Candida albicans*.

25

La Figura 9 muestra las curvas de liberación del colorante/fluoróforo (medidas mediante la emisión de fluorescencia típica de la rodamina B a 575 nm excitando a 555 nm) desde el interior de los poros de los materiales S3 (a) y S5 (b) en ausencia (I) y en presencia (II) de ADN genómico de *Candida albicans*.

30

La Figura 10 muestra las curvas de liberación del colorante/fluoróforo (medidas mediante la emisión de fluorescencia típica de la rodamina B a 575 nm excitando a 555 nm) desde el interior de los poros de los materiales S8 (a) y S10 (b) en ausencia (I) y en presencia (II) de ADN genómico de *Candida Albicans*.

35

La Figura 11 muestra la fluorescencia (medida a 575 nm) de la rodamina B liberada del material S8 en presencia de ADN genómico de *Candida albicans* en muestra reales de pacientes infectados (Líquido cerebroespinal A, Líquido peritoneal B).

La Figura 12 muestra la selectividad del material S8. Se presenta la intensidad de fluorescencia de la rodamina B liberada desde S8 en presencia de diferentes patógenos y otras cepas de *Candida*.

- 5 La presente invención se ilustrará adicionalmente por los siguientes ejemplos. Los ejemplos tienen carácter ilustrativo y no limitan el ámbito de la invención en modo alguno.

Materiales e Instrumentación

10 Para la preparación de los materiales porosos se empleó un agitador magnético y material de vidrio y plástico habitual. Para la separación de los materiales cuando éstos estaban en suspensión se empleó una centrífuga Rotina 35 (Hettich zentrifugen). Todos los reactivos utilizados para la preparación de los materiales se emplearon tal cual se recibieron de las casas comerciales sin ninguna purificación extra.

15 Los materiales obtenidos se caracterizaron mediante difracción de rayos X en polvo, microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM), isotermas de adsorción-desorción de N₂, tamaño de partícula mediante dispersión dinámica de la luz (DLS), espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR), análisis termogravimétrico y espectroscopia de fluorescencia. En las medidas de rayos x en polvo se utilizó un difractómetro D8 Advance, empleando la radiación CuK α (Philips, Amsterdam, Holanda). Las imágenes de TEM se obtuvieron con un microscopio 100kV CM10 (Philips). Las imágenes de FESEM se obtuvieron con un microscopio ULTRA 55 (Zeiss). Para las medidas de adsorción-desorción isoterma de nitrógeno se empleó un
20 analizador automático de adsorción ASAP 2010 (Micromeritics, Norcross, GA, USA).

Las muestras fueron desgasificadas a 120°C a vacío durante toda una noche. La superficie específica fue calculada a partir de los datos obtenidos de la adsorción en el rango de baja presión, utilizando el modelo de Brunauer, Emmett y Teller (BET).³² El tamaño de poro se
30 determinó siguiendo el método de Barret, Joyner y Halenda (BJH).³³ La distribución del tamaño de partícula de los diferentes sólidos se obtuvo empleando un equipo Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Malvern, UK). Para estas medidas, las muestras se dispersaron en agua desionizada. Los análisis de datos se basaron en la teoría de Mie, utilizando índices de refracción de 1.33 y 1.45 para el dispersante y para las nanopartículas, respectivamente. Para
35 todas las muestras se utilizó un valor de adsorción de 0.001. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

Los espectros de infrarrojo fueron adquiridos con un espectrofotómetro Bruker tensor II Platinum ATR. En los análisis de termogravimetría se utilizó una balanza TGA/SDTA 851e (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA) usando una atmosfera oxidante (aire, 80 mL/min) con un programa de temperatura que consistía en un gradiente de 393-1273K a 10°C/min, seguida de una isoterma a 1273K durante 30 min. Las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo en un fluorímetro Felix 32 Analysis version 1.2 (Build 56, Photon Technology International, Birmingham, NJ, USA).

10 **Ejemplos de realización**

Ejemplo 1: Síntesis de nanopartículas mesoporosas de sílice (MSNs)

Las nanopartículas mesoporosas de sílice (MSNs) se sintetizaron empleando un tensioactivo (bromuro de hexadeciltrimetilamonio, CTABr) y una fuente de sílice (tetraetoxisilano, TEOS). Para ello el CTABr (1,00 g, 2,74 mmol) se disolvió primero en 480 mL de agua desionizada. Posteriormente, se añadió a la anterior disolución NaOH (2,00 M, 3,50 mL) y se ajustó la temperatura a 80°C. A continuación, se añadió TEOS (5,00 mL, 25,7 mmol) gota a gota a la solución del anterior. La mezcla se dejó en agitación durante 2 h, obteniéndose un precipitado blanco. El polvo resultante se centrifugó y se lavó con agua desionizada. Finalmente, el sólido se secó a 60°C. Para preparar el soporte poroso final, el material se calcinó a 550 °C usando una atmósfera oxidante durante 5 h con el fin de eliminar el tensioactivo.

Ejemplo 2: Síntesis del material S1

25 200 µg de MSNs calcinadas (50-150 nm de diámetro, 1200 m²/g de superficie total) se suspendieron en una disolución que contenía 766,4 mg (0,16 mmol) de rodamina B en 10 mL de acetonitrilo, dejando la mezcla en agitación a temperatura ambiente durante 24 h. A continuación, se añadieron 247 µL (1 mmol) de (3-isocianatopropil)tri-etoxisilano, y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 5,5 h. Seguidamente se filtró a vacío la mezcla, se lavó con acetonitrilo y se secó en estufa a 65°C. El sólido obtenido se caracterizó mediante las técnicas de termogravimetría, TEM y difracción de rayos X en polvo y se identificó como material S1. La Figura 1 muestra la matriz inorgánica mesoporosa (1) obtenida, la cual está cargada con un colorante/fluoróforo (rodamina B) (2) y funcionalizada con un grupo orgánico neutro.

Ejemplo 3: Síntesis del material S2

1 mg del material S1 se suspendió en 700 μL de una disolución de acetonitrilo con rodamina B (1 mM), y se añadió el oligonucleótido O1 (SEQ No. 1) ($\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-5'-AAA AAA CCC CCC-3'}$) en concentración 1 nmol/mg sólido. A esta mezcla se le adicionó 2 μL de trietilamina y se dejó agitar a temperatura ambiente durante 3 h. A continuación, se centrifugó la suspensión durante 2 min a 12000 rpm y se separó el líquido, lavando el sólido con 1 mL de una disolución acuosa tamponada a pH 7,5 (MgCl_2 37,5 mM, Tris-HCl 20 mM). Esta suspensión se separó nuevamente por centrifugación, obteniendo así el material S2. La Figura 2 representa el sólido obtenido, el cual se caracterizó mediante las técnicas de termogravimetría, TEM y difracción de rayos X en polvo. Tal y como se muestra en dicha Figura 2, el material poroso (1) está cargado con un colorante/fluoróforo (rodamina B) (2) y funcionalizado con el oligonucleótido O1 (SEQ No. 1) (3), el cual está anclado covalentemente mediante un grupo funcional urea. La concentración del oligonucleótido O1 en el material S2 es de 1 nmoles /mg sólido.

15

Ejemplo 4: Síntesis del material S3

100 μg del material S2 se suspendieron en 297,5 μL de una disolución acuosa tamponada a pH 7,5 (MgCl_2 37,5 mM, Tris-HCl 20 mM) conteniendo el oligonucleótido O2 (SEQ No. 2) ($5'\text{-TTT TGG GGG GTT GAG AAG GAT CTT TCC ATT GAT GGG GGG GTT TT-3'}$) en concentración $2,50 \times 10^{-6}$ nmol/mg sólido y se dejó agitar a temperatura ambiente durante 2 h. A continuación, se centrifugó la suspensión durante 2 min a 12000 rpm y se separó el líquido, lavando el sólido con 500 μL de la disolución acuosa tamponada a pH 7,5 (MgCl_2 37,5 mM, Tris-HCl 20 mM). Esta suspensión se separó nuevamente por centrifugación, obteniendo así el material S3. La Figura 3 muestra el esquema de dicho material S3, el cual se caracterizó mediante las técnicas de termogravimetría, TEM y difracción de rayos X en polvo. Como se ha indicado anteriormente, para la preparación de este material S3 se partió del material S2 cargado con un colorante/fluoróforo (rodamina B)(2) y funcionalizado con el oligonucleótido O1 (SEQ No. 1) (3), sobre el que hibrida el oligonucleótido O2 (SEQ No. 2: $5'\text{-TTT TGG GGG GTT GAG AAG GAT CTT TCC ATT GAT GGG GGG GTT TT-3'}$) (4). Como consecuencia de la hibridación, dada la estructura y conformación tridimensional de los oligonucleótidos O1-O2 hibridados, se produce el bloqueo de los poros del soporte de tipo material poroso. La concentración del oligonucleótido O2 en el sólido S3 es de $2,5 \times 10^{-6}$ nmoles /mg sólido.

Ejemplo 5: Síntesis del material S4

35

200 µg de MSNs y calcinada (50-150 nm de diámetro, 1200 m²/g de área total), obtenidas en el ejemplo 1, se suspenden en una disolución que contiene 766,4 mg (0,16 mmol) de rodamina B en 10 mL de acetonitrilo, dejando la mezcla en agitación a temperatura ambiente durante 24 h. A continuación, se añadieron 293 µL (1,25 mmol) de (3-aminopropil)triethoxisilano, y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 5,5 h. Seguidamente, se filtró a vacío la mezcla, se lavó con acetonitrilo y se secó en estufa a 65°C. El sólido obtenido se caracterizó mediante las técnicas de termogravimetría y análisis elemental y se identificó como S4. La Figura 4 muestra el material S4, donde se aprecia que dicho material poroso está conformado por una matriz inorgánica porosa (1), de sílice de la familia MCM-41, cargada con un colorante/fluoróforo (rodamina B) (2) y con la superficie externa funcionalizada con un grupo orgánico catiónico (7), como es 3-aminopropil)triethoxisilano.

Ejemplo 6: Síntesis del material S5

500 µg del material S4 se suspendieron en 500 µL de una disolución acuosa tamponada a pH 7,5 (MgCl₂ 37,5 mM, Tris-HCl 20 mM) conteniendo el oligonucleótido O3 (SEQ No. 3: 5'-TTG AGA AGG ATC TTT CCA TTG ATG-3') en concentración 2,00 x 10⁻⁶ nmol/mg sólido) y se dejó agitar a 37°C durante 30 min. A continuación, se centrifugó la suspensión durante 2 min a 12000 rpm y se separó el líquido, lavando el sólido con 1 mL de la disolución acuosa tamponada. Esta suspensión se separó nuevamente por centrifugación, obteniendo así el material S5, el cual se caracterizó mediante las técnicas de termogravimetría, TEM y difracción de rayos X en polvo. La Figura 5 muestra el material S4 (1), el cual está cargado con un colorante/fluoróforo como rodamina B (2), y donde los poros se bloquean mediante la adición del oligonucleótido O3 (SEQ No. 3: 5'-TTG AGA AGG ATC TTT CCA TTG ATG-3') (5), dando lugar a dicho material S5. La concentración del oligonucleótido O3 en el sólido S5 es de 2,00 x 10⁻⁶ nmoles /mg sólido.

Ejemplo 7: Síntesis del soporte de alúmina anodizada nanoporosa

Las placas de alúmina mesoporosa fueron sintetizadas por anodización electroquímica a partir de placas de aluminio de elevada pureza (99.99%). Previamente a la anodización, las placas de aluminio fueron electropulidas en una mezcla de etanol y ácido perclórico (4:1, v:v) a 20 V durante 4 min para eliminar la parte rugosa de la superficie del metal. Después fueron lavadas con abundante agua y etanol, secándose finalmente con aire para evitar cualquier residuo del ácido. Las placas ya electropulidas fueron anodizadas con el correspondiente electrolito empleando un proceso de anodización en dos pasos.^{9,10}. La primera anodización fue llevada

a cabo durante 20 h a 40 V con ácido oxálico y a 10 V con ácido sulfúrico. La temperatura de los electrolitos fue de 2°C en ambos casos. El material resultante es una placa porosa nanoestructurada de alúmina con poros desordenados, algunos de ellos interconectados. Esta placa inicial de alúmina fue disuelta mediante una mezcla de ácido fosfórico (0.4 M) y ácido crómico (0,2 M) a 70 °C durante 3 h obteniendo una placa de aluminio con la superficie marcada. La segunda anodización se realizó en las mismas condiciones de voltaje y temperatura que la primera, obteniendo una capa porosa nanoestructurada de alúmina con poros no conectados entre sí. La distribución de los poros es ordenada o desordenada en función de si el electrolito utilizado es ácido oxálico o ácido sulfúrico respectivamente, tal y como se muestra en la Figura 7 a y b respectivamente.

Ejemplo 8: Síntesis del material S6

Una placa de alúmina porosa de unos 2 cm de diámetro y 8 µm de profundidad de poro se sumergió en una disolución que contenía 766,4 mg (0.16 mmol) de rodamina B en 10 mL de acetonitrilo, dejando la mezcla en agitación a temperatura ambiente durante 24 h. A continuación, se añadieron 247 µL (1 mmol) de (3-isocianatopropil)triethoxisilano, y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 5,5 h. Seguidamente se sacó la placa y se dejó secar. Una vez seca esta placa se dividió en 8 trozos de 2 mm de diámetro aproximadamente. De esta forma se obtuvo el material S6, el cual se caracterizó mediante la técnica de termogravimetría. El material S6 es similar al material S1, pero como se ha indicado anteriormente, para su obtención se ha empleado alúmina porosa en lugar de sílice mesoporoso.

Ejemplo 9: Síntesis del material S7

El material S6 se sumergió en 700 µL de una disolución de acetonitrilo con rodamina B (1 mM) y se añadió el oligonucleótido O1 (NH₂-(CH₂)₆-5'-AAA AAA CCC CCC-3') en concentración 1 nmol/placa. A esta mezcla se le adicionó 2 µL de trietilamina y se dejó agitar a temperatura ambiente durante 3 h. A continuación, se sacó el material y se dejó secar a temperatura ambiente, obteniendo así el material S7, el cual se caracterizó mediante la técnica de termogravimetría. El material S7 es similar al material S2, pero como se ha indicado anteriormente, para su obtención se ha empleado alúmina porosa en lugar de sílice mesoporoso.

35

Ejemplo 10: Síntesis del material S8

El material S7 se sumergió en 297,5 μL de una disolución acuosa tamponada a pH 7,5 (MgCl_2 37,5 mM, Tris-HCl 20 mM) conteniendo el oligonucleótido O2 (5'- TTT TGG GGG GTT GAG AAG GAT CTT TCC ATT GAT GGG GGG GTT TT-3') en concentración $2,50 \times 10^{-6}$ nmoles/placa y se dejó agitar a temperatura ambiente durante 2 h. A continuación, se lavó con unas gotas de la disolución acuosa tamponada a pH 7,5 (MgCl_2 37,5 mM, Tris-HCl 20 mM) y se dejó secar a temperatura ambiente, obteniendo así el material S8, el cual se caracterizó mediante las técnicas de termogravimetría y FESEM. El material S8 es similar al material S3, pero como se ha indicado anteriormente, para su obtención se ha empleado alúmina porosa en lugar de sílice mesoporoso.

Ejemplo 11: Síntesis del material S9

Una placa de alúmina porosa de unos 2 cm de diámetro y 8 μm de profundidad de poro se sumergió en una disolución que contenía 766,4 mg (0.16 mmol) de rodamina B en 10 mL de acetonitrilo, dejando la mezcla en agitación a temperatura ambiente durante 24 h. A continuación, se añadieron 293 μL (1,25 mmol) de (3-aminopropil) trietoxisilano, y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 5,5 h. Seguidamente se sacó la placa y se dejó secar. Una vez seca esta placa se dividió en 8 trozos de 2 mm de diámetro aproximadamente. De esta forma se obtuvo el material S9, el cual se caracterizó mediante la técnica de termogravimetría.

Ejemplo 12: Síntesis del material S10

El sólido S9 se sumergió en 297,5 μL de una disolución acuosa tamponada a pH 7.5 (MgCl_2 37.5 mM, Tris-HCl 20 mM) conteniendo el oligonucleótido O3 (5'-TTG AGA AGG ATC TTT CCA TTG ATG-3') en concentración 2.00×10^{-6} nmoles/placa) y se dejó agitar a 37°C durante 30 min. A continuación, se lavó con unas gotas de la disolución acuosa tamponada a pH 7,5 (MgCl_2 37,5 mM, Tris-HCl 20 mM) y se dejó secar a temperatura ambiente, obteniendo así el sólido S10, el cual se caracterizó mediante las técnicas de termogravimetría y FESEM.

Ejemplo 13: Caracterización de los materiales obtenidos

Los materiales sintetizados se caracterizaron usando procedimientos estándar. La Figura 6 muestra la caracterización realizada a los diferentes materiales obtenidos. Concretamente se muestra difractograma de rayos X en polvo para: a) MSNs sin calcinar, b) MSNs calcinada, c)

material S1 (que es igual al S4), d) material S2, y e) material S3 (igual al S5), y II) muestra imágenes de microscopía de transmisión electrónica para: A) MSNs calcinada y B) material S3,S5 mostrando la morfología esférica típica de las nanopartículas. El soporte MSNs sin calcinar muestra las 4 reflexiones típicas de los materiales de tipo MCM-41 correspondientes a las direcciones en el plano (100), (110), (200) y (210). En el difractograma de MSNs calcinado se observa un desplazamiento del pico (100), correspondiente a una contracción de celda de unos 7 Å. Por último, en los siguientes difractogramas (materiales S1, S2, S3, S4 y S5) el valor de la intensidad del pico (100) evidencia que el proceso de llenado de los poros con la especie indicadora, en estos casos el colorante/fluoróforo, y la funcionalización de la superficie del sólido mesoporoso no destruyen la estructura tridimensional del material MSNs. Mediante microscopía electrónica de transmisión puede visualizarse la morfología esférica de los materiales preparados (ver también Figura 6). El contenido de materia orgánica (3-isocianatopropil, 3-aminopropil, rodamina B y oligonucleótidos) correspondientes presentes en los distintos materiales fue determinado mediante análisis termogravimétrico. Los valores obtenidos en mmol/mg SiO₂ se presentan en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1

	3-isocianatopropil	rodamina B	O1	O2
S1	$3,05 \times 10^{-2}$	$9,84 \times 10^{-1}$	-	-
S2	$3,05 \times 10^{-2}$	$3,16 \times 10^{-1}$	$3,18 \times 10^{-2}$	-
S3	$3,05 \times 10^{-2}$	$3,17 \times 10^{-2}$	$3,18 \times 10^{-2}$	$5,04 \times 10^{-5}$

Tabla 2

	3- aminopropil	rodamina B	O3
S4	$1,23 \times 10^{-1}$	$4,44 \times 10^{-4}$	-
S5	$1,23 \times 10^{-1}$	$3,79 \times 10^{-4}$	$3,32 \times 10^{-4}$

Los sólidos sintetizados S6-S10, se caracterizaron por técnicas habituales para este tipo de sistemas. La Figura 7, muestra la imagen de FESEM (Field Emission Scanning electron Microscopy) para el soporte de alúmina anódica nanoporosa de partida y para el sólido S8. El contenido de materia orgánica (3-isocianatopropil, 3-aminopropil, rodamina B y oligonucleótidos) correspondientes presentes en los distintos materiales fue determinado mediante análisis termogravimétrico. Los valores obtenidos en mmol/mg AlO₂ se presentan en las Tablas 3 y 4.

Tabla 3

	3-isocianatopropil	rodamina B	O1	O2
S6	$1,1 \times 10^{-2}$	$6,7 \times 10^{-1}$		
S7	$1,1 \times 10^{-2}$	25×10^{-1}	$1,0 \times 10^{-1}$	
S8	$1,1 \times 10^{-2}$	$2,4 \times 10^{-1}$	$1,0 \times 10^{-1}$	$1,1 \times 10^{-1}$

Tabla 4

	3- aminopropil	rodamina B	O3
S9	$1,2 \times 10^{-1}$	$5,47 \times 10^{-2}$	-
S10	$1,2 \times 10^{-1}$	$3,79 \times 10^{-2}$	$4,52 \times 10^{-2}$

5 **Ejemplo 14: Comportamiento de los materiales S3 y S5 en presencia del ADN genómico de *Candida albicans*.**

La Figura 8a) muestra el mecanismo de funcionamiento del material S3 (1). 100 µg del material S3 se suspendieron en 400 µL de la disolución tampón a pH 7,5 (MgCl₂ 37,5 mM, Tris-HCl 20 mM). De esta suspensión se pipetearon 200 µL y se le añadieron 800 µL de la disolución acuosa tamponada. No se observó liberación de la especie indicadora (colorante/fluoróforo) (2) en función del tiempo. En cambio, al repetir esta experiencia en presencia del ADN genómico de *Candida albicans* (6) (en concentración 2.5×10^{-5} nmol/mg sólido) se observó una liberación de la especie indicadora (colorante/fluoróforo) (2), tal y como se recoge la Figura 9a.

En presencia del ADN genómico de *Candida albicans* (2×10^{-5} y 4×10^{-6} nmoles / mg sólido para S3 (8a) y S5 (8b) respectivamente) en una disolución tamponada a pH 7,5 (MgCl₂ 37,5 mM, Tris-HCl 20 mM) se produce la apertura de las “puertas moleculares” con la consiguiente liberación del colorante/fluoróforo (2). Los materiales S8 y S10 tienen un comportamiento similar.

Igualmente, la Figura 8b muestra el mecanismo de funcionamiento del material S5. En este experimento, 500 µg del material S5 (1) se suspendieron en 400 µL de la disolución tampón a pH 7,5 (MgCl₂ 37,5 mM, Tris-HCl 20 mM). De esta suspensión se pipetearon 200 µL y se le añadieron 800 µL de la disolución tampón, no observándose liberación de la especie indicadora (colorante/fluoróforo) (2) en función del tiempo a 37°C. (ver Figura 8B). En cambio,

al repetir esta experiencia en presencia del ADN genómico de *Candida albicans* (en concentración 4×10^{-6} nmol/mg sólido) (6) se observó una liberación de la especie indicadora (colorante/fluoróforo) (2), tal y como se recoge en la Figura 9b.

5 Como se ha comprobado anteriormente, la liberación masiva del colorante/fluoróforo (rodamina B) se produce debido a la apertura de la “puerta molecular”, al hibridarse los oligonucleótidos (O2 y O3) situados sobre los diferentes materiales, con el ADN genómico de *Candida albicans* presente en la muestra estudiada.

10 **Ejemplo 15: Comportamiento de los materiales S8 y S10 en presencia del ADN genómico de *Candida albicans*.**

El material S8 fue sumergido en 1 mL de la disolución tampón, no observándose liberación de la especie indicadora con el tiempo a temperatura ambiente. En cambio, al repetir esta
15 experiencia en presencia de ADN genómico de *Candida albicans* (en concentración 2.5×10^{-5} nmol/sólido), se observó una liberación de la especie indicadora, tal y como se recoge en la Figura 10a.

Igualmente, el material S10 se sumergió en 1 mL de la disolución tampón, no observándose
20 ninguna liberación de la especie indicadora en función del tiempo a 37°C, al contrario de lo que se observó cuando estaba presente el ADN genómico de *Candida albicans* (en concentración 4×10^{-6} nmol/sólido). En este caso se observó una liberación marcada de la especie indicadora (colorante fluoróforo) como muestra la Figura 10b.

25 Como se puede observar, ambos materiales son incapaces de liberar colorante fluoróforo (rodamina B) en ausencia de ADN genómico de *Candida albicans*. Por el contrario, cuando el ADN genómico está presente se observa una liberación masiva de rodamina B debido a la apertura de la “puerta molecular” al hibridarse los oligonucleótidos (O2 y O3) situados sobre los diferentes materiales, con el ADN genómico aportado por *Candida albicans*.

30

Ejemplo 16: Comportamiento del material S8 en presencia de muestras infectadas por *Candida albicans* de pacientes enfermos.

Como se puede observar en la Figura 11, el material S8 en presencia de *Candida albicans* en
35 muestra reales de pacientes infectados en distintos medios competitivos (liquido cerebroespinal (A) y liquido peritoneal (B)) es capaz de liberar el colorante/fluoróforo

(rodamina B), dando una intensidad de fluorescencia significativa. Por el contrario, en ausencia de *Candida albicans* no se observa liberación de la rodamina B.

Ejemplo 17: Comportamiento del material S8 en presencia de ADN de otras cepas de

5 Candida y de otros patógenos infecciosos

La Figura 12 muestra la rodamina B liberada del material S8 en presencia de diferentes patógenos y otras cepas de *Candida*. Como se puede observar solo se produce liberación de rodamina B en presencia *Candida albicans*. Esta experiencia demuestra la alta selectividad
10 que se alcanza con el material S8.

REIVINDICACIONES

- 1- Material poroso para la detección de *Candida albicans* que comprende en los poros interiores una especie indicadora y en su superficie exterior fijada al menos una secuencia de ADN complementario a un fragmento del genoma de *Candida albicans*, donde la secuencia de ADN complementario bloquea la salida de la especie indicadora de los poros interiores del soporte.
- 2- Material poroso según la reivindicación 1 donde la secuencia de ADN complementario se une a la superficie exterior del soporte mediante un grupo orgánico neutro y un oligonucleótido de unión.
- 3- Material poroso según la reivindicación 2 donde el grupo orgánico neutro se selecciona de entre ácido carboxílico (-COOH), alcohol (-OH), aldehído (-CHO), alqueno, alquino, amina (-NH₂ ó -NR'R''), amida (-C(O)NR'R''), azida (-N₃), cetona (-C=O), ester (-COOR'), éter (R'-O-R''), halógeno, imina (RR'C=NR''), isocianato (-NCO), isotiocianato (-N=C=S), nitrilo (-C≡N), nitro (-NO₂) o tiol (-SH).
- 4- Material poroso según la reivindicación 3 donde el oligonucleótido de unión es el oligonucleótido O1 (SEQ No. 1).
- 5- Material poroso según la reivindicación 4 donde el oligonucleótido O1 (SEQ No. 1) está hibridado con el oligonucleótido O2 (SEQ No. 2).
- 6- Material poroso según la reivindicación 1 donde la secuencia de ADN complementario se une a la superficie exterior del soporte mediante un grupo orgánico catiónico.
- 7- Material poroso según la reivindicación 6 donde el grupo orgánico catiónico se selecciona de entre aminas, grupos guanidinio (H-N=(NHR)NH₂), fosfonio (PH₄⁺) o de amonio cuaternario (NR₄⁺).
- 8- Material poroso según la reivindicación 7 donde la secuencia de ADN complementario es el oligonucleótido O3 (SEQ No. 3).

9- Material poroso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 caracterizado porque está constituido por dióxido de sílice mesoporoso con una superficie específica de entre 200-1400 m²g⁻¹.

5 10- Material poroso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 caracterizado porque está constituido por un film o placa de alúmina anodizada nanoporosa.

11- Método de diagnóstico *in vitro* para la detección de *Candida albicans* que comprende:

- 10 a) poner en contacto el material poroso de la reivindicación 1 con la muestra de ADN a analizar, en una solución acuosa,
b) incubar la mezcla del paso a) para que se produzca la reacción de hibridación,
c) medir la cantidad de especie indicadora liberada a la fase acuosa de la mezcla.

12- Método de preparación del material poroso de la reivindicación 1 caracterizado porque
15 comprende las siguientes etapas:

- a) Preparación de un soporte de dióxido de sílice poroso o de alúmina anodizada nanoporosa,
b) Introducción de la especie indicadora en los poros interiores del sustrato preparado en la etapa a),
20 c) Funcionalización del sustrato cargado obtenido en la etapa b) mediante la unión de un grupo orgánico neutro o catiónico a la superficie de dicho sustrato,
d) Si es necesario, derivatización del sustrato con un oligonucleótido de unión unido al grupo orgánico neutro,
e) Adición de una secuencia de ADN complementario a un fragmento del genoma de
25 *Candida albicans* al soporte inorgánico poroso obtenido en la etapa c) o d).

13- Método de preparación del material poroso según la reivindicación 12 caracterizado porque al soporte obtenido en la etapa e) se le adiciona una secuencia de ADN que hibrida con la secuencia de ADN complementario a un fragmento del genoma de *Candida albicans*.

30

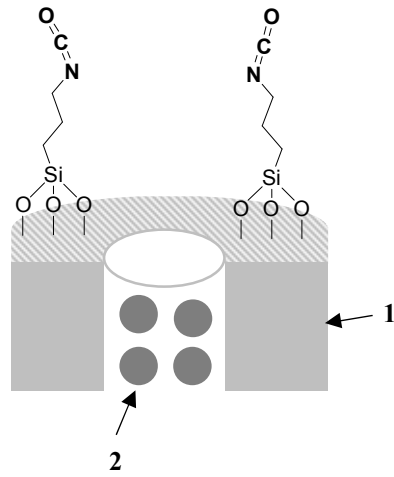


FIG. 1

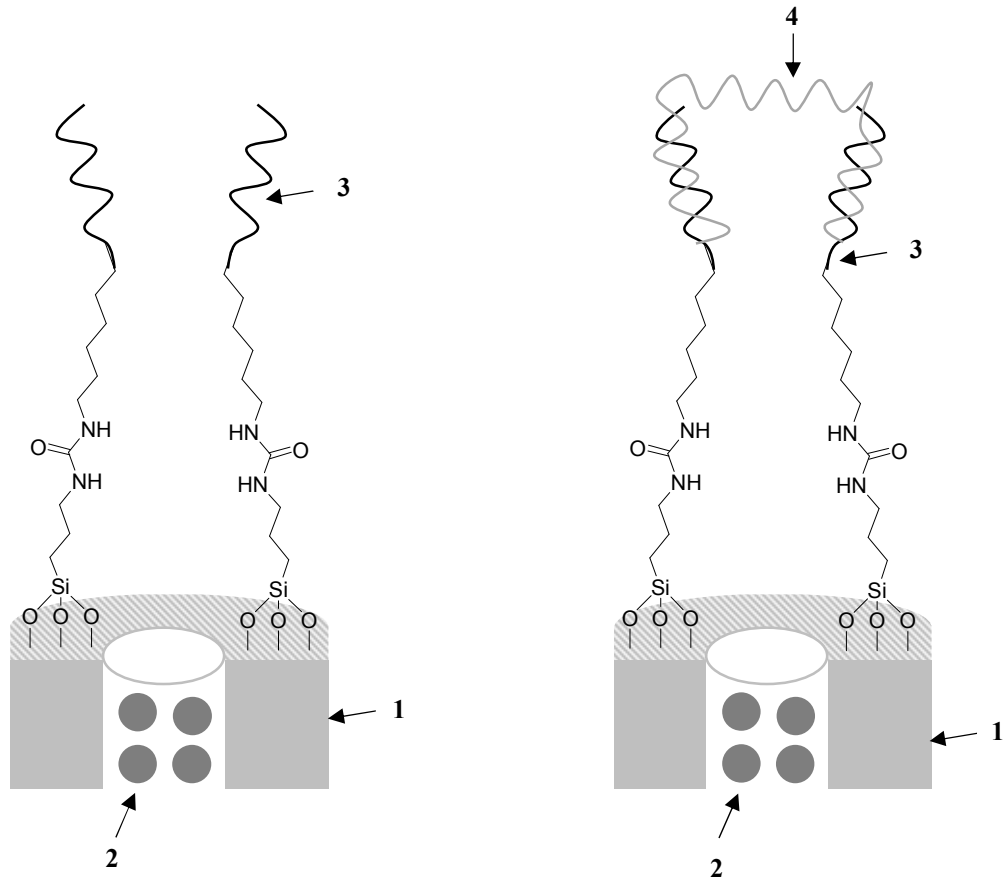


FIG. 2

FIG. 3

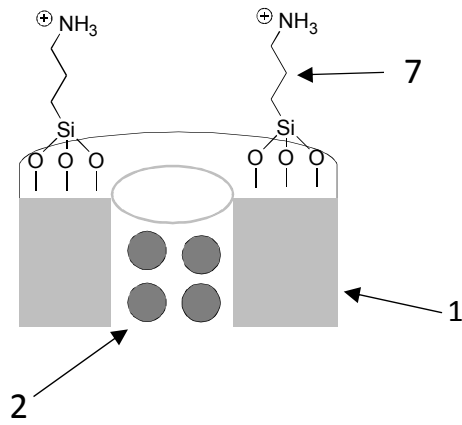


FIG. 4

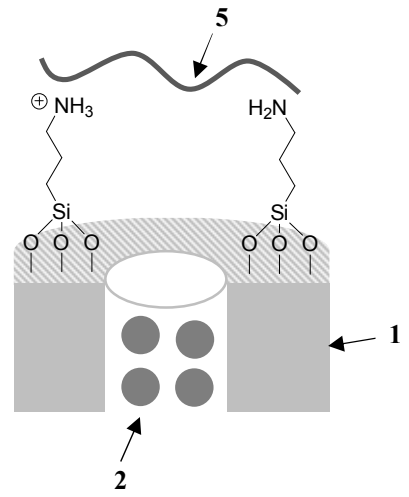


FIG. 5

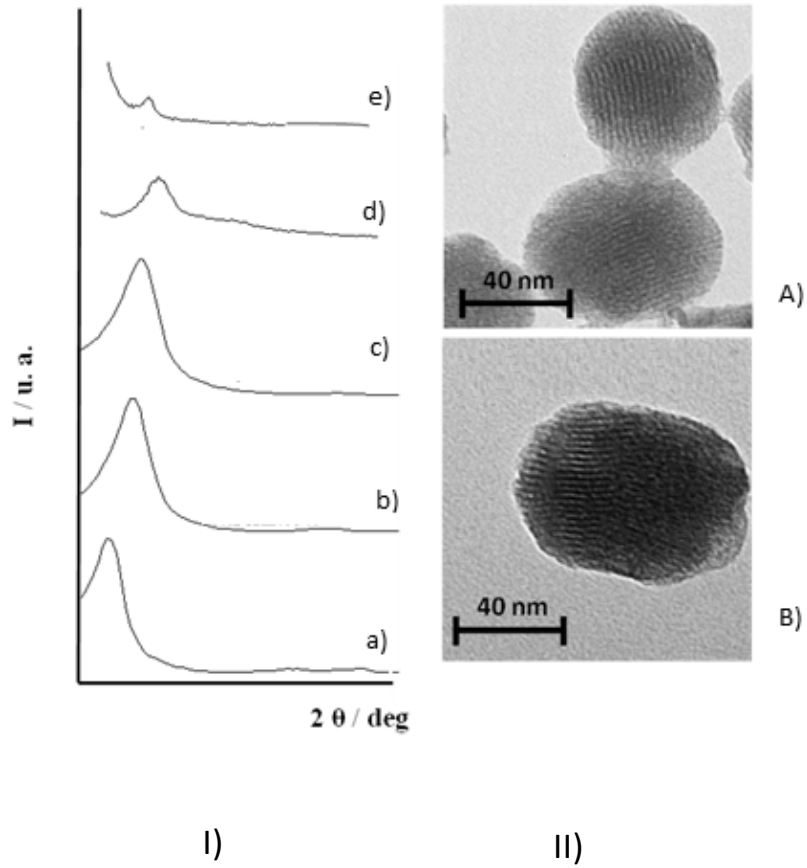


FIG. 6

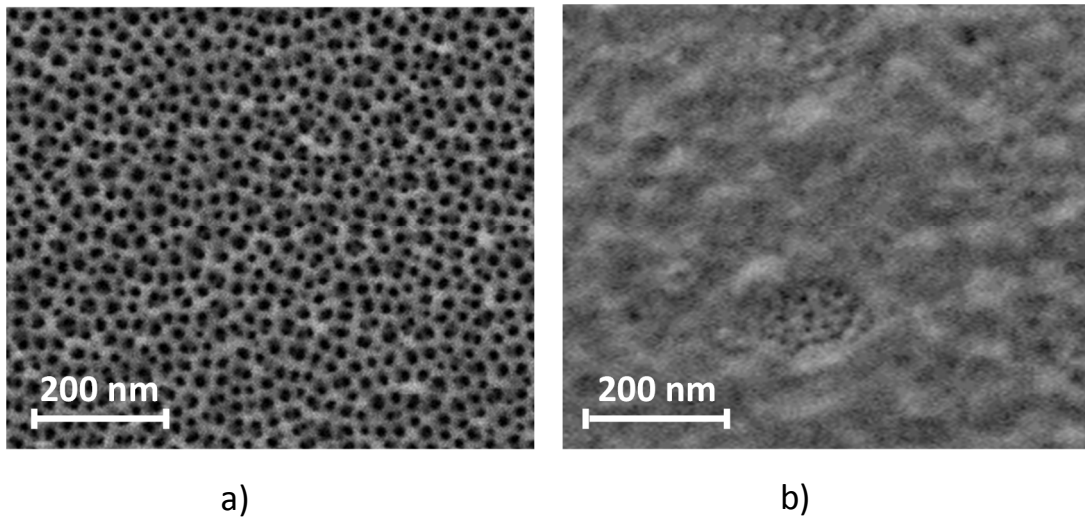


FIG. 7

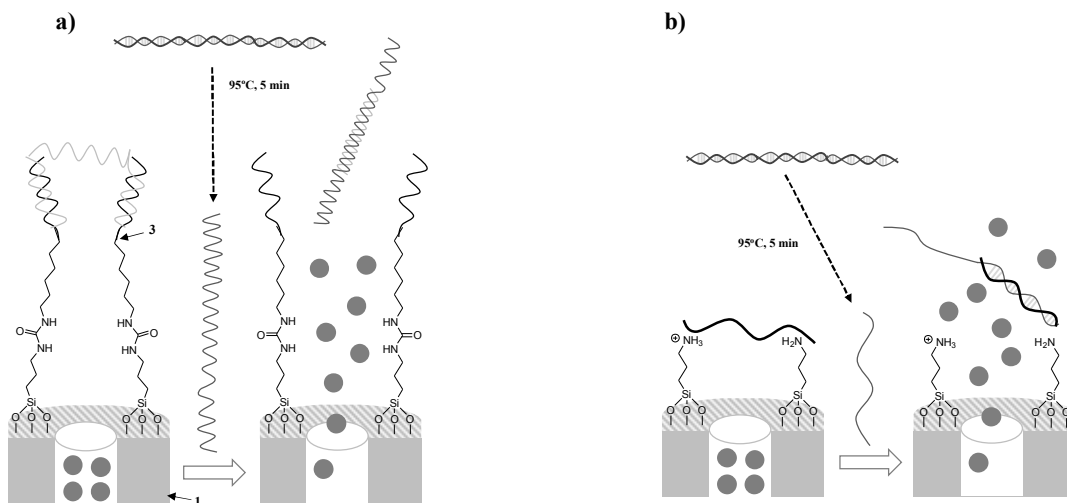


FIG. 8

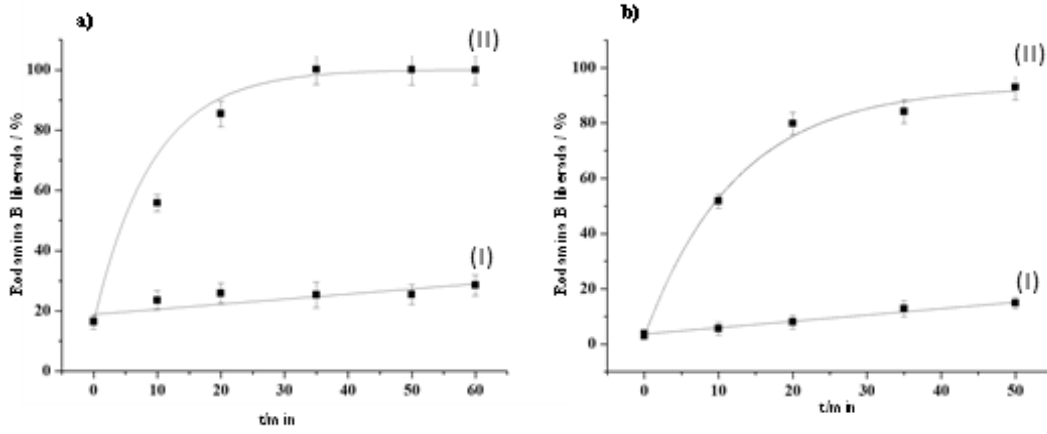


FIG. 9

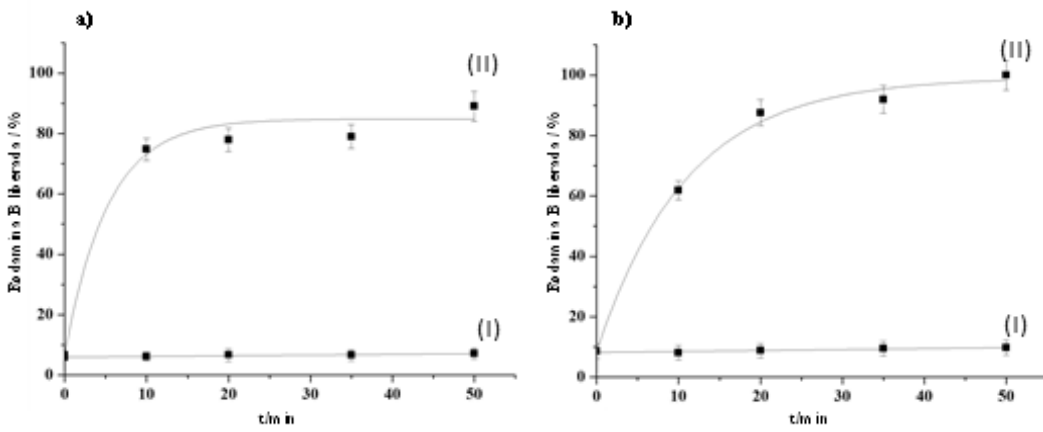


FIG. 10

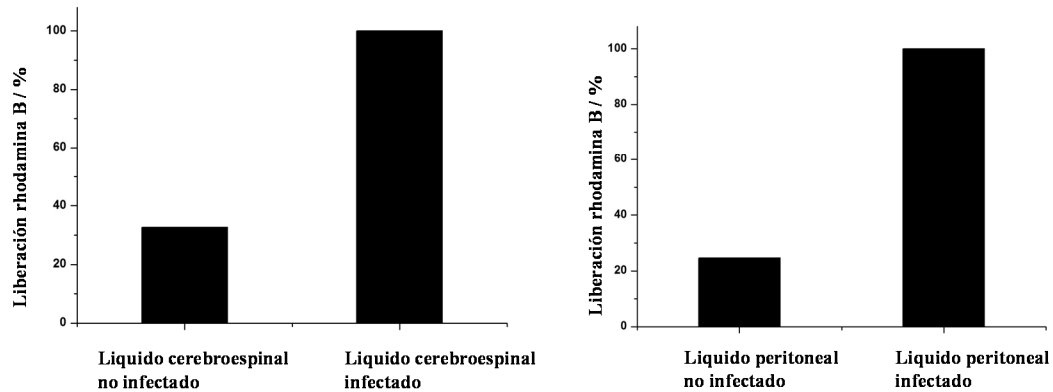


FIG. 11

A

B

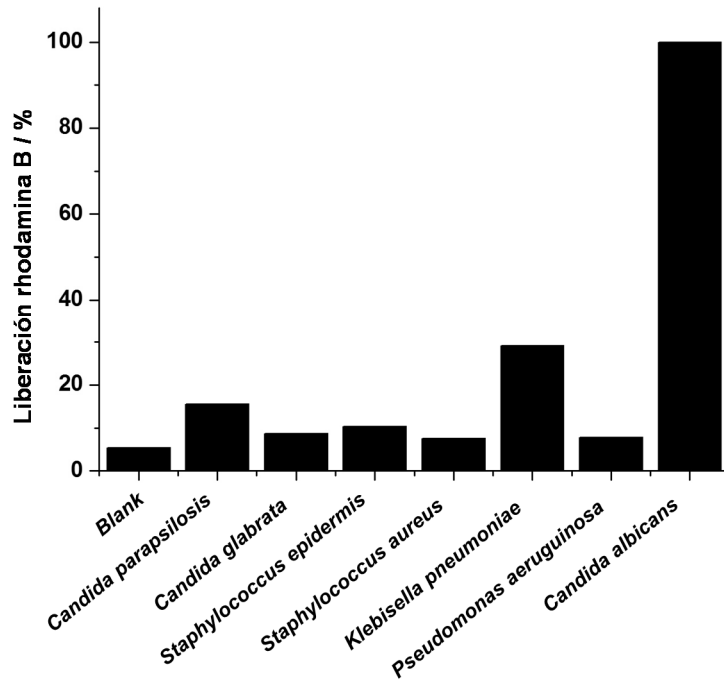


FIG. 12



- ②¹ N.º solicitud: 201731069
 ②² Fecha de presentación de la solicitud: 05.09.2017
 ③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **C12Q1/68** (2018.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	PASCUAL L. et al. Oligonucleotide-capped mesoporous silica nanoparticles as DNA-responsive dye delivery systems for genomic DNA detection. Chem. Commun. 2015, Vol. 51, Páginas 1414-1416 (todo el documento)	1-9 y 11-13
Y	SABEEH S. et al. PCR in Comparison with Culture Methods for The Diagnosis of <i>Candida albicans</i> Responsible for Candidemia in Leukemic Patients. Diyala Journal of Medicine, 12/2013, Vol. 5, N° 2, Páginas 29-35 (todo el documento)	1-9 y 11-13
Y	PLA L. et al. A <i>Mycoplasma</i> Genomic DNA Probe using Gated Nanoporous Anodic Alumina. ChemPlusChem, 30/12/2016, Vol. 82, Páginas 337-341 (todo el documento)	1-8 y 10-13
Y	LIM Y-H. et al. Rapid PCR Method for Detecting <i>Candida albicans</i> Using Primers Derived from the Integrin-like Protein Gene <i>aINT1</i> of <i>Candida albicans</i> . The Journal of Microbiology, 06/2000, Vol. 38, N° 2, Páginas 105-108 (todo el documento)	1-8 y 10-13
A	SANCENÓN F. et al. Gated Silica Mesoporous Materials in Sensing Applications. ChemistryOpen, 2015, Vol. 4, Páginas 418-437 (todo el documento)	1-13

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:

<p>Fecha de realización del informe 02.08.2018</p>	<p>Examinador M. Cumbreño Galindo</p>	<p>Página 1/2</p>
---	--	------------------------------

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

C12Q

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, MEDLINE, NPL, EMBASE, BIOSIS, EBI