

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 027**

21 Número de solicitud: 201430846

51 Int. Cl.:

G01N 21/17 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

B82Y 15/00 (2011.01)

G01N 21/29 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

03.06.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

03.12.2015

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTIFICAS (100.0%)
C/ SERRANO 117
28006 MADRID ES**

72 Inventor/es:

**TAMAYO DE MIGUEL, Francisco Javier;
MONTEIRO KOSAKA, Priscila;
PINI, Valerio;
CALLEJA GOMEZ, Montserrat;
RUZ MARTINEZ, Jose Jaime;
RAMOS VEGA, Daniel y
GONZÁLEZ SAGARDOY, Maria Ujue**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

54 Título: **UN SISTEMA PARA APLICACIONES DE BIODETECCIÓN**

57 Resumen:

Un sistema para aplicaciones de biodetección. La presente invención se refiere a un sistema para aplicaciones de biodetección que comprende dos elementos básicos, un sustrato con una superficie funcionalizada y una nanopartícula, siendo el sistema capaz de potenciar el efecto plasmónico de la nanopartícula. La invención también se refiere a un biosensor que incorpora tal sistema, además de al procedimiento para detectar y cuantificar un analito diana seleccionado en una muestra usando tal sistema. Finalmente, la invención se refiere a un dispositivo que puede detectar el efecto optoplasmónico potenciado de las nanopartículas por medio del sistema de la invención o bien combinar la detección de tal efecto optoplasmónico con el análisis de los cambios en las características mecánicas en el sustrato.

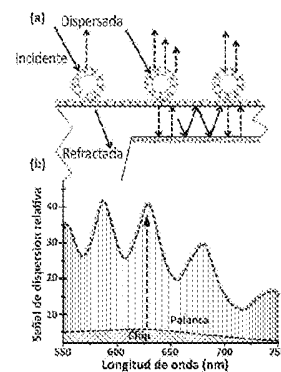


FIG. 2

ES 2 553 027 A1

DESCRIPCIÓN

Un sistema para aplicaciones de biodetección

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención pertenece al campo de los biosensores. Más particularmente, la presente invención se refiere a un sistema para aplicaciones de biodetección que comprende dos elementos básicos, un sustrato con una superficie funcionalizada y una nanopartícula, pudiendo el sistema potenciar el efecto plasmónico de la nanopartícula. La invención también se refiere a un biosensor que incorpora tal sistema, además de al procedimiento para detectar y cuantificar un analito diana seleccionado en una muestra usando tal sistema. Finalmente, la
10 invención se refiere a un dispositivo que puede detectar el efecto optoplasmónico potenciado de las nanopartículas por medio del sistema de la invención o bien combinar la detección de tal efecto optoplasmónico con el análisis de los cambios en las características mecánicas en el sustrato.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 **Biosensores**

Un biosensor mide los cambios físicos que una capa de reconocimiento biológico unida a un transductor sólido experimenta cuando interacciona con una muestra que contiene las moléculas elegidas como diana. Así, emplea la capacidad de algunas biomoléculas (receptores) para unirse específicamente (reconocer) a biomoléculas complementarias
20 (ligandos). Las interacciones más típicas son hibridación de ácidos nucleicos complementarios y unión de anticuerpo/antígeno. Los biosensores son cada vez más demandados en estudios biológicos fundamentales, investigación de ciencias de la salud, descubrimiento de fármacos y diagnóstico clínico¹⁻³. Dependiendo del cambio físico medido, los biosensores pueden clasificarse en ópticos, eléctricos y mecánicos.

25 Los biosensores ópticos pueden dividirse principalmente en detección basada en marcas y detección sin marcas. Los biosensores basados en marcas más comúnmente usados se basan en detección basada en fluorescencia, las moléculas diana o bien las moléculas de biorreconocimiento se marcan con marcas fluorescentes, tales como colorantes; la intensidad de la señal de fluorescencia indica la cantidad de moléculas elegidas como diana. Mientras que
30 la detección basada en fluorescencia es extremadamente sensible, sufre de laboriosos procedimientos de marcado que pueden también interferir con la función de la biomolécula. A diferencia, en la detección sin marcar, las moléculas elegidas como diana no son marcadas o alteradas, y se detectan en sus formas naturales. Una parte significativa de los sensores ópticos sin marca mide el cambio del índice de refracción próximo a la superficie del sensor excitando un campo evanescente que disminuye exponencialmente en la disolución a granel con una longitud característica entre decenas a cientos de nanómetros⁴. El procedimiento de resonancia de plasmones superficiales (SPR) y los procedimientos de resonancia de plasmones superficiales localizados (LSPR) son los más populares entre los biosensores ópticos sin marca.

40 Entre los biosensores eléctricos, los dispositivos electroquímicos han recibido tradicionalmente la mayor parte de la atención⁵⁻⁷. Estos dispositivos normalmente acoplan enzimas que producen o consumen electrones tras el reconocimiento de sustratos a un transductor de electrodos. Muchas de estas enzimas catalizan específicamente las reacciones de analitos clínicamente importantes tales como glucosa, lactato, colesterol, aminoácidos, urato, piruvato,
45 glutamato, alcohol, hidroxibutirato, por nombrar algunos. Los avances en la nanotecnología también están proporcionando biosensores eléctricos a escala nanométrica basados en nanoalambres y nanotubos semiconductores, en los que la apertura electroquímica se produce a partir de un cambio en el potencial superficial local debido a la unión a diana⁸⁻¹⁰.

Entre los biosensores mecánicos, la microbalanza de cristal de cuarzo se ha convertido en una de las técnicas más establecidas¹¹⁻¹³. Estos dispositivos se basan en resonadores de cristal de cuarzo (tales como aquellos usados en relojes), que son piezoeléctricos y así permiten la medición directa de la deformación del cristal por procedimientos eléctricos. En estos dispositivos, la frecuencia de resonancia se mide y relaciona con el cambio de masa inducido por la unión del analito a la capa de reconocimiento inmovilizada sobre la superficie cristalina. Una subclase de biosensores mecánicos se denomina biosensores nanomecánicos, que sacan el mayor rendimiento del tamaño de escala nanométrica de al menos una de sus dimensiones¹⁴⁻²⁰.

Entre los procedimientos existentes, los biosensores más satisfactorios en el campo biomédico incluyen bioensayos de detección del punto final tales como ELISA. Los ELISA son herramientas esenciales en el campo biomédico debido a su buena sensibilidad, simplicidad del ensayo, fiabilidad y alto rendimiento.

Por otra parte, dispositivos como los ensayos de flujo lateral son de suma importancia en el corto tiempo de análisis necesario y se han miniaturizado satisfactoriamente y simplificado hasta el punto de que incluso es posible la prueba en casa. Sin embargo, la menor concentración de analito que pueden detectar es comúnmente de hasta $0,1 \mu\text{M}$, que no es suficientemente buena para detectar muchas dianas de importancia biológica. Por comparación, el ELISA requiere un tiempo de análisis mucho mayor (~ 1 h), pero ofrece mucha mejor sensibilidad de concentración (~ 1 pM).

Todavía está en investigación la técnica de biodetección que pueda combinar excelente sensibilidad y especificidad con corto tiempo de análisis, junto con potencial de miniaturización. En particular, hay una alta demanda de técnicas que puedan integrarse en un dispositivo de punto de cuidado que sean dignas de sensibilidad, capacidad de cuantificación y buen intervalo dinámico. Hasta la fecha no se ha demostrado ninguna técnica que proporcione esto. La capacidad para ser integrado en un dispositivo de punto de cuidado (POC) significa que los protocolos de detección deben ser simples, usar pequeños volúmenes de muestra y no deben requerir etapas de preparación y/o de lavado complicadas o químicas complejas para preparar las muestras y/o dispositivos de detección. Un bajo coste para los análisis completos y la larga estabilidad en almacén también es un requisito para obtener un producto comercialmente viable.

Biosensores basados en nanopartículas

Hay enfoques en la técnica anterior que han tenido éxito en muchos, aunque no todos, los retos citados para dispositivos de POC. El uso de nanopartículas (NP) ha tomado su parte en este éxito. Particularmente, el oro y otras nanopartículas de metales nobles se han usado en la detección de analitos. La resonancia de plasmones superficiales localizados (LSPR) en NP de oro se desplaza cuando cambia la constante dieléctrica de alrededor, de manera que los desplazamientos en el pico espectral de LSPR facilitados por la unión de biomoléculas proporcionan un procedimiento para la detección de analitos en muestras clínicas. Diferentes enfoques de detección que hacen uso de este fenómeno a escala nanométrica se revisan en la referencia 21.

En un enfoque satisfactorio, llamado ELISA plasmónico, el desplazamiento de la resonancia de plasmones localizados facilitado por la agregación de nanopartículas de oro se usa para colorear la marca de detección de muy bajas concentraciones de un analito de interés. En la referencia 22, tanto PSA como el antígeno p24 de la cápside del VIH1 se detectan a concentraciones de tan solo 1×10^{-18} g/ml. En este procedimiento, el ciclo biocatalítico de una enzima genera disoluciones de NP coloreadas debido al hecho de que cuando la concentración de peróxido de hidrógeno disminuye se forman NP agregadas. La unión del analito promueve la agregación de NP que a su vez da un color azul a la disolución. Este cambio de color se usa como señal de detección que puede incluso ser seguida a simple vista y así proporciona un

enfoque de detección de bajo coste.

En otra metodología relevante, el marcado de NP con diversas secuencias de ADN proporciona la capacidad de multiplexación que no tendrían NP metálicas solas, ya que carecen de un intervalo de marcas de color para marcar cada reacción específica. El así llamado procedimiento de biocódigo de barras no solo se ha usado para la detección de ADN, sino que también ha tratado satisfactoriamente la detección de proteínas. Para después, el biocódigo de barras se basa en sondas de micropartículas magnéticas con anticuerpos que se unen específicamente a una diana de interés, por ejemplo, una proteína clínicamente relevante como antígeno prostático específico (PSA) (véase la referencia 23) y sondas de nanopartículas que están codificadas con ADN que es único para la proteína diana de interés y anticuerpos que pueden emparejar la diana capturada por las sondas de micropartículas. La separación magnética de las sondas complejadas y diana, seguido de la deshibridación de los oligonucleótidos sobre la superficie de la sonda de nanopartículas, permite la determinación de la presencia de la proteína diana que identifica la secuencia de oligonucleótidos liberada de la sonda de nanopartículas. Debido a que la sonda de nanopartículas lleva consigo un gran número de oligonucleótidos para el evento de unión a proteína, hay una sustancial amplificación de señales y la proteína diana puede detectarse a bajas concentraciones (concentración 30 atomolar). Alternativamente, una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en los códigos de barras de oligonucleótidos puede reforzar la sensibilidad a 3 atomolar. Ensayos convencionales clínicamente aceptados comparables tienen límites de sensibilidad de 3 picomolar, seis órdenes de magnitud menos sensibles al que se observa con este procedimiento²³. Una limitación de esta técnica es el tiempo de análisis requerido, hasta 100 minutos, dada la necesidad de separación de las sondas complejadas y diana de la disolución de muestra y posterior identificación de las marcas de ADN. Con este procedimiento también es posible la cuantificación. Un enfoque es realizar una PCR y/o electroforesis en gel, pero éstos son procedimientos no adecuados para aplicaciones de punto de cuidado y excluyen el rápido análisis como se trata en la referencia 25.

Un procedimiento de detección alternativo se basa en el cambio espectral en la luz dispersa cuando al menos dos NP se ponen próximas entre sí^{26,27}. El cambio de color es debido a un desplazamiento en la resonancia de plasmones superficiales de las nanopartículas de Au cuando al menos dos NP se ponen próximas entre sí. Esto produce un desplazamiento de color detectable y un cambio en la intensidad de luz recogida que puede medirse ópticamente. Los complejos de sonda de NP siempre comprenden dos o más nanopartículas unidas a un analito diana específico, esto se ha llamado un complejo de dispersión de la luz. Esto tiene la ventaja de que solo se detectan los agregados de NP, que contienen el analito. Las partículas no agregadas, que incluyen aquellas que no contienen el analito diana, no son detectadas en este procedimiento. Esto permite la detección de agregados de NP en presencia de un exceso significativo de partículas no agregadas. Este procedimiento ha demostrado excelente sensibilidad, mejor que 10 femtomoles de un oligonucleótido. Dentro de este procedimiento, el uso de iluminación evanescente por medio de una guía de onda de soporte y detección colorimétrica basada en la dispersión ha demostrado ser 4 órdenes de magnitud mejor que las pruebas de manchas basadas en absorbancia (documento EP1639370).

Una forma de eliminar la necesidad de amplificación por PCR a la vez que se mantiene una buena capacidad de multiplexación es hibridar los complejos de dispersión de GNP sobre un soporte sólido funcionalizado con secuencias conocidas en posiciones definidas, como se hace en las matrices fluorescentes. La posterior detección escanométrica de la luz dispersa sirve de señal biosensora y la capacidad de multiplexación se obtiene por las posiciones predefinidas de las secuencias inmovilizadas conocidas. Normalmente, se necesita una forma de amplificar esta señal óptica. Un procedimiento para la ampliación de la señal de luz dispersa de las marcas de NP es la reducción de plata promovida por nanopartículas²⁸ o respuesta colorimétrica por catálisis enzimática sobre sustratos de silicio ópticamente recubiertos²⁹. Este procedimiento se usa para amplificar la señal óptica y también permite cuantificar la cantidad

de analito en la muestra³⁰.

Biosensores basados en resonadores nanomecánicos

Los resonadores nanomecánicos han demostrado límites de detección sin precedentes en la detección de masas de átomos y moléculas a vacío. Los límites de detección de masa se han empujado recientemente al intervalo de yoctogramos, es decir, puede medirse la masa de un único protón. Dos componentes son esenciales para lograr la sensibilidad de la masa: dispositivos con dimensiones de escala nanométrica y altos factores de calidad (1000-100000) que implican mediciones a vacío. Sin embargo, la detección de biomoléculas debe llevarse a cabo idealmente en disoluciones acuosas, el entorno natural en el que se producen los procesos biológicos. Los resonadores nanomecánicos en líquidos presentan un factor de calidad muy bajo (1-10) como consecuencia del amortiguamiento viscoso. Además, el líquido es arrastrado junto con el resonador nanomecánico, aumenta su masa eficaz y así reduce la sensibilidad. La miniaturización de los dispositivos a la escala nanométrica no mejora estas limitaciones. Y, lo que es más importante, la detección biológica requiere muchas mediciones repetitivas que sólo pueden lograrse con dispositivos desechables y rentables que puedan ser tanto fácilmente manipulados como medidos. Estos requisitos se satisfacen por matrices de micropalanca que están comercialmente disponibles, pero no por los resonadores mecánicos de escala nanométrica del estado de la materia que todavía se fabrican a baja velocidad por técnicas de nanofabricación y son altamente irreproducibles en las dimensiones y respuesta mecánica. Además, la medición de la frecuencia resonante de estos dispositivos en líquido es científica y técnicamente exigente. Estas limitaciones han limitado el éxito de los resonadores nanomecánicos como sensores biológicos.

Resonadores nanomecánicos con marcas de masa.

Los resonadores nanomecánicos han hecho uso de NP para amplificar la señal, aquí, la unión a masa mayor proporcionada por las marcas aumenta la respuesta mecánica del sensor. Aquí, una reducción en la frecuencia de resonancia está relacionada con masa añadida del complejo analito-NP que se une al resonador. A pesar de que los sensores nanomecánicos dinámicos han demostrado un buen rendimiento sin marcas; el marcado mejora ampliamente la especificidad y puede reducir el límite de detección. Se ha demostrado que el marcado de muestras para la detección nanomecánica es ventajoso en los ensayos de punto final. Craighead y colaboradores demostraron en la referencia 31 que el marcado de un anticuerpo monoclonal con nanopartículas en un inmunoensayo tipo sándwich pudo mejorar el límite de detección en tres órdenes de magnitud para alcanzar 2 ng/ml en la detección de proteínas priónicas y detectar incluso la presencia de 50 fg/ml de PSA enriquecido en un ruido de fondo de suero bovino fetal. La técnica también es cuantitativa, ya que los autores encontraron una clara dependencia lineal de la respuesta de frecuencia sobre la concentración de PSA. La capacidad para detectar concentraciones fM de una proteína diana en un ruido de fondo realista coloca a los sensores de palanca resonantes marcados en una excelente posición para competir con todas las técnicas innovadoras citadas, además de las tecnologías más establecidas. Todavía, los resonadores nanomecánicos todavía no se usan ampliamente en la clínica. Esto es debido a que carecen de la robustez necesaria en la respuesta. Los pocos estudios que muestran un número estadísticamente significativo de pruebas muestran que el número de positivos y negativos falsos es todavía demasiado alto. El desplazamiento de la frecuencia comúnmente usado como señal de detección en estos sensores depende en gran medida de la adsorción no específica sobre la superficie del dispositivo.

Una limitación clave de los resonadores nanomecánicos es la adsorción no específica. Los límites de detección definitivos predichos por los enfoques teóricos pueden estar lejos de los límites de detección reales cuando biosensores nanomecánicos funcionalizados con biorreceptores se sumergen en disoluciones complejas, tales como suero, para detectar la presencia de biomarcadores en tiempo real o *ex-situ*. En esta situación, otras moléculas a

concentración mucho mayor, incluso billones de veces mayor, están presentes en la disolución. Aunque estas moléculas tienen mucha menor afinidad por los receptores injertados con sensores, su alta concentración impone el límite de detección real. Por ejemplo, los biomarcadores del cáncer están en plasma sanguíneo a una concentración en el intervalo de 1 ng/ml, mientras que la concentración de proteínas no deseadas es de aproximadamente 70 mg/ml. La sensibilidad para lograr la detección de biomarcadores del cáncer se satisface por la mayoría de los biosensores nanomecánicos. Sin embargo, la selectividad que determina la tasa de positivos falsos y negativos falsos ha recibido poca atención. La detección de biomarcadores de cáncer en medios complejos tales como suero requiere selectividad superior a 1 parte por millón.

Predicciones teóricas indican que la selectividad requerida para la detección de biomarcadores en medios complejos puede lograrse funcionalizando los sensores con una alta densidad superficial de receptores³². Esta predicción está de acuerdo con los hallazgos en biosensores nanomecánicos basados en tensión superficial, en los que los mejores resultados se obtienen a altas densidades de empaquetamiento de receptores. Una segunda predicción teórica es que la etapa de pasivación superficial intermedia adicional por pequeñas moléculas inertes después de la incubación del receptor podría reducir significativamente la bioincrustación y ayuda a lograr mejor selectividad. De forma interesante, el tamaño y geometría de la molécula bloqueante usada para volver a llenar los vacíos en la superficie del sensor desempeña una función crítica. Esto está de acuerdo con los resultados de recientes análisis estadísticos del efecto de inmunorreacciones sobre la respuesta de biosensores nanomecánicos en el modo estático³³. El estudio comprendió 1012 palancas con diferentes densidades superficiales de anticuerpo, dos estrategias de bloqueo basadas en polietilenglicol (PEG) y albúmina de suero bovino (BSA), controles rigurosos con anticuerpos no específicos y proteínas pequeñas tales como lisozimas. El estudio reveló que el rendimiento del ensayo depende críticamente de tanto la densidad superficial de anticuerpos como las estrategias de bloqueo. Encontraron que las condiciones óptimas implican densidades superficiales de anticuerpos próximas, pero inferiores, a la saturación y bloqueo con PEG.

Además, se han propuesto otros enfoques prácticos para minimizar la adsorción no específica y potenciar la selectividad. El uso de matrices de elementos nanomecánicos con una referencia interna ayuda a rechazar fuentes de ruido comunes, que incluyen adsorción no específica. Otro enfoque es la implementación de los ensayos de sándwich tradicionalmente usados en ELISA. En este ensayo, el sistema nanomecánico se funcionaliza con un receptor molecular específico para el biomarcador de interés. Después de la exposición del sistema nanomecánico a la muestra, el dispositivo se incuba con receptores secundarios unidos a una molécula o un material que actúa de amplificador de señales, tal como una nanopartícula para aumentar el efecto de la masa. El uso de dos receptores diferentes potencia ampliamente la sensibilidad y especificidad. Este enfoque se aplicó para detectar proteínas priónicas con resonador nanomecánico, que en formas conformacionalmente alteradas se sabe que producen enfermedades neurodegenerativas en animales, además de seres humanos³⁴. La frecuencia de resonancia se detectó *ex-situ* en alto vacío. Para la incubación directa de los resonadores nanomecánicos funcionalizados con un anticuerpo primario contra la proteína priónica, el límite de detección fue aproximadamente 20 µg/ml. Cuando los resonadores se sometieron a una etapa de incubación posterior con anticuerpos secundarios que se unen, el límite de detección se potenció 3 órdenes de magnitud, siendo aproximadamente 2 ng/ml.

Una segunda estrategia prometedora que mantiene la característica sin marca natural de los biosensores nanomecánicos es implementar microfluídica para la purificación y preconcentración de muestras. El potencial de este enfoque se ha demostrado con nanosensores de nanoalambre sin marca. En este trabajo, un chip de purificación microfluídica captura simultáneamente múltiples biomarcadores de muestras de sangre y los libera, después de lavar, en tampón purificado para la detección por los nanosensores⁸. Este enfoque de dos etapas aísla el detector del entorno complejo de sangre completa, y reduce su sensibilidad

requerida mínima pre-concentrando eficazmente los biomarcadores. Los autores demostraron detección cuantitativa y específica de dos antígenos del cáncer modelo de una muestra de 10 ml de sangre completa en menos de 20 min.

5 A pesar de que la nanotecnología haya proporcionado biosensores con niveles impredecibles de sensibilidad sin necesidad de marcado, los nanosensores también han mostrado dificultades significativas en cuestiones referentes a la especificidad y reproducibilidad, y de ahí que todavía no estén listos para la selección de biomarcadores en sangre. Esto surge de la dificultad extrema de ‘encontrar’ biomarcadores de proteína de baja abundancia en un ‘pajar’ de proteínas plasmáticas, algunas de ellas a concentraciones al menos siete órdenes de magnitud superiores (albúmina 40 mg/ml aprox). Así, la situación es que el alto ruido biológico fijado por las interacciones no específicas supera ampliamente el ruido intrínseco de la mayoría de los nanosensores existentes. En pocas palabras, el problema no es la sensibilidad, sino:

- Especificidad; para discriminar trazas de biomarcadores en la compleja mezcla de proteínas de la sangre.
- 15 • Fiabilidad, para minimizar los dolorosos positivos falsos y negativos falsos en el diagnóstico de pacientes.

Ahora, los autores de la presente invención han encontrado un sistema para aplicaciones de biodetección que permite límites de detección ultrabajos ya que discrimina concentraciones al borde de 10 ag/ml. Además, el sistema permite la detección de analitos diana en ruidos de fondo biológicos complejos como, por ejemplo, muestras de sangre, sin la necesidad de ninguna etapa de purificación. La invención se basa en un ensayo óptico tipo sándwich que se aprovecha del sorprendente e inesperado potenciamiento del efecto plasmónico causado en las nanopartículas por la combinación de la naturaleza y diseño particulares del sustrato usado en el biosensor y la naturaleza y dimensiones particulares de la nanopartícula. Este sistema puede adaptarse en un dispositivo nanomecánico con el fin de analizar tanto señales optoplasmónicas como mecánicas de manera que mejore la fiabilidad de la detección. La robustez de este biosensor dual conduce a una tasa de positivo falso y negativos falsos extremadamente baja, $\approx 2 \times 10^{-4}$ a una concentración ultrabaja de 100 ag/ml, proporcionando así una excelente solución para ser integrada en un dispositivo de POC.

30 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Está previsto que las siguientes definiciones ayuden en el entendimiento e interpretación de la presente invención:

Biosensor: Dispositivo analítico que comprende un elemento de reconocimiento biológico (por ejemplo, enzima, receptor, ADN, anticuerpo, o microorganismo) en contacto íntimo con un transductor de señales electroquímicas, mecánicas, ópticas, térmicas, acústicas u otras señales físicas que juntos permiten el análisis de propiedades químicas o detección o cuantificación de analitos diana.

Material dieléctrico: Un material dieléctrico es un aislante eléctrico que puede polarizarse por un campo eléctrico aplicado.

40 **Superficie funcionalizada o funcionalización superficial:** Un procedimiento o técnica para introducir grupos funcionales químicos en una superficie. Ésta se usa en biosensores para inmovilizar un elemento de reconocimiento en una superficie, en la presente invención sobre la superficie del sustrato.

45 **Elemento de reconocimiento:** Es el elemento del sistema inmovilizado y que funcionaliza la superficie del sustrato que puede reconocer y unirse específicamente al analito diana. El elemento de reconocimiento puede seleccionarse de, pero no se limita a, un anticuerpo, un receptor, un péptido, una proteína, un hidrato de carbono, un ácido nucleico, una célula, un

microorganismo o una parte de los mismos.

Elemento de detección: Es el elemento del sistema unido a la nanopartícula y que puede reconocer y unirse específicamente al analito diana. El elemento de detección conjuntamente con la nanopartícula permiten la detección del analito diana cuando está presente en la muestra.

Analito diana: Es el elemento buscado para la detección y/o cuantificación. Puede ser de cualquier naturaleza tal como moléculas orgánicas o inorgánicas (fármacos, hormonas, colesterol, etc.), moléculas biológicas (péptidos o proteínas, moléculas de ácidos nucleicos, factores de crecimiento, biomarcadores etc.), células (células protozoicas, células bacterianas, célula fúngica, células eucariotas) o fragmentos celulares (paredes bacterianas, orgánulos celulares como mitocondrias, vesículas celulares, etc.) o virus.

Coeficiente de extinción: El coeficiente de extinción es la parte imaginaria del índice complejo de refracción.

Índice de refracción: El índice de refracción de una sustancia (medio óptico) es un número adimensional que describe cómo la luz, o cualquier otra radiación, se propaga a través de ese medio.

Material circundante: Es el material subyacente a ambas superficies del sustrato en el sistema de la invención. El índice de refracción del material circundante es de relevancia en el logro del efecto plasmónico potenciado.

Efecto plasmónico: Es el fenómeno producido en las nanopartículas que tienen propiedades plasmónicas cuando se irradian con una radiación electromagnética apropiada. El efecto plasmónico se produce por las oscilaciones de electrones libres inducidas en un metal por una onda electromagnética.

Anticuerpo: Una proteína en forma de Y (inmunoglobulina) sobre la superficie de linfocitos B que es secretada en la sangre o linfa en respuesta a un estímulo antigénico, tal como una bacteria, virus, parásito u órgano trasplantado, y que neutraliza el antígeno uniéndose específicamente a él. La detección de la formación de pares anticuerpo-antígeno puede seguirse por varios procedimientos y es la base de muchos biosensores.

Receptor: Es una estructura biológica que puede detectar estímulos químicos de su entorno. Los receptores normalmente están presentes sobre la superficie de células y están adaptados para detectar un tipo particular de molécula que es responsable de inducir una respuesta en la célula una vez en contacto con el receptor.

Péptido: Cadenas cortas de monómeros de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos.

Hidrato de carbono: Se refiere en el contexto de la invención a moléculas de oligosacáridos o polisacáridos complejas que tienen capacidad de unirse a dianas específicas. Como un ejemplo puede citarse lipopolisacárido.

Ácido nucleico: Cualquier molécula polimérica u oligomérica que tiene un esqueleto que contiene una secuencia de bases nitrogenadas -adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G). En el contexto de la presente invención, las moléculas de ácidos nucleicos incluyen, entre otras, moléculas de ADN, moléculas de ARN, aptámeros o moléculas de PNA.

Nanopartícula de metamaterial plasmónico: Es una nanopartícula hecha de un material artificial manipulado para manifestar propiedades plasmónicas.

Transmitancia: La transmitancia es la fracción de luz incidente (radiación electromagnética) a una longitud de onda especificada que pasa a través de una muestra.

Reflectancia: La reflectividad o reflectancia es la fracción de potencia electromagnética incidente que es reflejada de una superficie de separación.

Detección: Es la acción de identificar la presencia o ausencia del analito diana en la muestra.

5 **Cuantificación:** Es la acción de determinar la concentración de un analito diana dentro de la muestra.

Muestra: Una preparación de un fluido biológico que va a analizarse normalmente en forma líquida aunque también es posible como una forma sólida que va a resolverse en forma líquida o reconstituible.

10 **Radiación electromagnética:** La radiación electromagnética es un fenómeno fundamental del electromagnetismo, comportándose como ondas que se propagan a través del espacio y que llevan energía radiante. Una onda electromagnética tiene tanto componentes de campo eléctrico como magnético, que oscilan en un relación fija entre sí, perpendiculares entre sí y perpendiculares a la dirección de propagación de energía y ondas.

15 **Dispersión de la luz:** La dispersión de la luz es un tipo de interacción entre la materia y una onda electromagnética. Cuando una onda que se propaga es incidente sobre una superficie, la onda reflejada se concentra normalmente en la dirección especular como se ha determinado por las muy conocidas leyes de la reflexión. Además de la reflexión especular también hay un componente difuso que es irradiado sobre un amplio intervalo de ángulos centrados sobre el haz especular que comúnmente se conoce como dispersión de la luz. Los procedimientos de
20 dispersión pueden producirse a partir de la rugosidad no cero de la superficie o por la presencia de pequeñas partículas depositadas sobre la misma.

Absorción: La absorción de radiación electromagnética es la forma en la que la energía de una radiación electromagnética es recogida por la materia, normalmente los electrones de un
25 átomo. Así, la energía electromagnética se transforma en energía interna del absorbedor, por ejemplo, energía térmica.

Señal de extinción: El término “extinción” significa la pérdida de luz en un haz óptico transmitido cuando pasa a través de un medio u objeto. Dos mecanismos diferentes contribuyen a la extinción: absorción y dispersión.

30 Un primer objetivo de la invención es un sistema para aplicaciones de biodetección que comprende:

- a. un sustrato de material dieléctrico que tiene al menos una superficie funcionalizada con un elemento de reconocimiento que puede unirse específicamente a un analito diana y
- 35 b. al menos una nanopartícula con propiedades plasmónicas que comprende al menos un elemento de detección unido a ella y que puede unirse específicamente al analito diana en una disposición tipo sándwich,

caracterizado porque:

- 40 - el sustrato de material dieléctrico tiene un espesor entre 0,1 μm y 5 μm y un coeficiente de extinción inferior a 0,3,
- la nanopartícula tiene al menos una de sus dimensiones con un tamaño de 2 nm a 300 nm y
- porque la relación entre el índice de refracción del material dieléctrico y el material circundante es superior a 1,1.

El sistema de la invención está adaptado para procedimientos de detección y cuantificación tipo sándwich (véase, por ejemplo, la Figura 1). El uso de un elemento de reconocimiento y un elemento de detección es un primer aspecto que mejora ampliamente la sensibilidad y especificidad del sistema. Sin embargo, el aspecto más sorprendente y ventajoso del sistema de la invención se deriva del potenciado efecto plasmónico que puede lograrse en detecciones optoplasmónicas. Este efecto particular permite límites de detección ultrabajos. El efecto es un modo plasmónico híbrido que resulta de la combinación de la naturaleza y diseño particulares de elementos que forman el sistema, concretamente el sustrato y la nanopartícula.

El sustrato tiene que ser un material dieléctrico de manera que pueda tener lugar el fenómeno de resonancia de plasmones superficiales. Cualquier material dieléctrico en el intervalo espectral electromagnético de interés es adecuado en el sistema de la invención. La única condición es que su coeficiente de extinción deba ser inferior a 0,3. En una realización particular, el material dieléctrico es cuarzo, silicio, nitruro de silicio, carburo de silicio, grafeno, polímeros tales como fotorresistentes, por ejemplo SU8, e hidrogeles tales como mezclas de PEG y PLA o de DEXTRANO y PEG. Los materiales dieléctricos más preferidos son silicio o nitruro de silicio.

Otro aspecto importante del sistema de la invención es el diseño del sustrato. Hay dos puntos clave en el diseño del sustrato que tienen que cumplirse con el fin de lograr el efecto plasmónico potenciado en el sitio de la nanopartícula.

Lo primero es que el espesor del sustrato deba estar entre 0,1 μm y 5 μm , más preferentemente entre 0,25 μm y 2 μm . Para espesores mayores, la radiación electromagnética incidente es refractada y no puede producir un efecto multirreflector dentro de la cavidad del sustrato que es el fenómeno físico que al final contribuye a producir la potenciación del efecto plasmónico (véase la Figura 2a). En la práctica, la potenciación del efecto plasmónico es un modo híbrido que resulta del acoplamiento del modo de plasmones superficiales localizados sobre las nanopartículas y el modo de cavidad óptica. Cuando la nanopartícula está sobre el sustrato, además de la dispersión hacia atrás, múltiples rutas ayudan a potenciar la dispersión por una única nanopartícula. Una ruta implica la amplificación de la dispersión directa por la nanopartícula por múltiples reflexiones. En este mecanismo, el acoplamiento entre la resonancia de plasmones dipolares de la nanopartícula y las resonancias de las cavidades del sustrato óptico crea un modo híbrido que refuerza la señal de dispersión en el sitio de nanopartículas. En una segunda ruta, la luz no dispersa experimenta múltiples reflexiones en la cavidad óptica del sustrato, produciendo una cascada de interacciones de dispersión en los sitios de nanopartículas vecinos que conducen a una densidad aparente mayor de nanopartículas en, por ejemplo, una imagen de campo oscuro.

La relevancia del espesor en la señal de dispersión se demuestra claramente por una realización particular de la invención en la que el sustrato está en forma de una palanca con un diseño de espesor entre 0,1 μm y 5 μm . Puede observarse una clara diferencia en la intensidad de la señal de dispersión entre la región de chip en la que el espesor es superior a 5 μm y la región de palanca en la que el espesor está entre 0,1 μm y 5 μm (véase la Figura 6a).

El segundo punto clave a tener en cuenta en el diseño del sistema es que la relación entre el índice de refracción del material dieléctrico (sustrato) y el material circundante debe ser superior a 1,1. Este aspecto también es esencial en el logro del efecto multirreflector en la cavidad del sustrato. La presencia de materiales circundantes al sustrato que tienen un índice de refracción diferente en la relación particular superior a 1,1, hace que las superficies opuestas del sustrato sean como espejos, que permite la multirreflexión dentro de la cavidad. El material circundante puede estar tanto en la propia disolución en la que el sustrato se sumerge para la detección como cualquier fluido o gases de alrededor, o un material sólido particular circundante con la única condición de que el índice de refracción del material circundante se diferencie del índice de refracción del sustrato.

El sistema de la invención puede en principio usarse en cualquier tipo de conformación de biosensor o de resonadores mecánicos. En particular, en el sistema de la invención, el sustrato puede tener la forma de una micropalanca, un micropilar, una cuerda, un trampolín, una palanca rectangular, una palanca triangular, una palanca piramidal, una palanca de pala, una
5 membrana, una placa, un puente, un tubo hueco o un nanoalambre (véase, por ejemplo, la Figura 11).

El analito diana es el elemento que va a detectarse de la muestra, especialmente de muestras biológicas. El analito diana puede ser de cualquier naturaleza tal como moléculas orgánicas o inorgánicas (fármacos, hormonas, colesterol, etc.), moléculas biológicas (péptidos o proteínas,
10 moléculas de ácidos nucleicos, factores de crecimiento, biomarcadores etc.), células (células protozoicas, células bacterianas, célula fúngica, células eucariotas) o fragmentos de células (paredes bacterianas, orgánulos celulares como mitocondrias, vesículas celulares, etc.) o virus.

Una ventaja del sistema de la invención es que permite detectar y cuantificar analitos dentro de muestras complejas, tales como, por ejemplo, sangre o muestras de orina, sin la necesidad de
15 ninguna etapa de purificación o etapa de separación. Esto hace la manipulación más simple y reduce el tiempo para la detección, lo que hace que el presente sistema sea muy adecuado para su implementación en dispositivos de POC.

El elemento de reconocimiento que funcionaliza la superficie del sustrato puede ser cualquier elemento que pueda reconocer y unirse específicamente a un analito diana. En este sentido, el
20 elemento de reconocimiento puede ser un anticuerpo (un anticuerpo policlonal o monoclonal), un receptor (un receptor de la superficie celular tal como un receptor de opioides), un péptido (tal como un péptido de opioides), una proteína (tal como lectinas), un hidrato de carbono (tal como el antígeno O de lipopolisacárido), un ácido nucleico (una secuencia de ADN o ARN), una célula (células protozoicas, células bacterianas, célula fúngica, células eucariotas),
25 un microorganismo o una parte del mismo (tal como paredes bacterianas, orgánulos celulares como mitocondrias, vesículas celulares etc.). En una realización preferida de la invención, el elemento de reconocimiento es un anticuerpo, más preferentemente un anticuerpo monoclonal.

La otra característica esencial del sistema, aparte del sustrato funcionalizado, es la nanopartícula. Por supuesto, la nanopartícula debe tener propiedades plasmónicas. En
30 principio puede usarse cualquier tipo de nanopartícula con propiedades plasmónicas. Así, la nanopartícula puede ser, por ejemplo, una nanopartícula de oro, plata o de metamaterial plasmónico tal como, pero no se limita a, nitruro de titanio y óxidos no estequiométricos tales como vanadio, titanio y aluminio.

Además, la nanopartícula puede adoptar multitud de formas o estructuras tales como, por
35 ejemplo, nanoesferas, nanovarillas, nanovarillas afiladas, nanovainas, nanojaulas/marcos, nanoesferas huecas, tetraedros, octaedros, cubos, icosaedros, dodecaedros rómbicos, nanocubos cóncavos, tetrahexaedros, bipirámides triangulares obtusas, trisoctaedros y nanoprismas (véase la Figura 12), pero es esencial que al menos una de sus dimensiones tenga un tamaño de 2 nm a 300 nm, preferentemente 5 nm a 150 nm, debido a que el pico de
40 resonancia plasmónica es altamente dependiente del tamaño de la nanopartícula.

La nanopartícula comprende al menos un elemento de detección unido a ella que puede unirse específicamente al analito diana. El elemento de detección puede ser cualquier tipo de
45 elemento que pueda unirse al analito diana, así, en principio su naturaleza puede ser la misma o similar a la del elemento de reconocimiento. Sin embargo, en una realización preferida, el elemento de detección tanto se selecciona de un anticuerpo como de una molécula de ácido nucleico. El elemento de detección tiene la función de detectar la presencia del analito diana capturado por el elemento de reconocimiento inmovilizado sobre la superficie del sustrato. Así, la nanopartícula solo se unirá al sustrato mediante el elemento de detección unido a ella si el

analito diana está presente en la muestra analizada. En tal caso, el elemento de reconocimiento puede unirse al analito diana que después se detecta por el elemento de detección en una disposición tipo sándwich. La ausencia del analito diana en la muestra tiene la consecuencia de que el elemento de reconocimiento no se unirá al analito diana y así no se producirá detección por el elemento de detección.

En resumen, si el analito diana está presente en la muestra, incluso a concentraciones ultrabajas, puede detectarse y cuantificarse basándose en la intensidad de dispersión o intensidad de extinción (dependiendo de los parámetros medidos) producidos por las nanopartículas. Si el analito diana no está presente en la muestra, no tendrá lugar efecto plasmónico detectable sobre el sustrato ya que no estarán presentes nanopartículas.

La detección y cuantificación pueden hacerse midiendo la intensidad de dispersión producida por las nanopartículas cuando el sistema se irradia con una radiación electromagnética. Un efecto plasmónico detectable tendrá lugar por irradiación a cualquier longitud de onda del espectro de la luz blanca gracias a la amplificación de la señal proporcionada por el sustrato que cumple los parámetros de diseño.

Si el tipo de señal medida es la señal de dispersión, la medición se hace en reflectancia y, en tal caso, el índice de reflectancia del sustrato comprende entre 0,01 y 1.

Alternativamente, la detección y cuantificación pueden llevarse a cabo midiendo la señal de extinción de las nanopartículas irradiadas con la radiación electromagnética. Si la señal de extinción se mide, la medición se hace en transmitancia y, en tal caso, el índice de transmitancia del sustrato comprende entre 0,01 y 1.

La visualización de las nanopartículas en el sistema de la invención puede realizarse por medios ópticos tales como un microscopio de campo oscuro o un microscopio de polarización cruzada.

Un aspecto adicional de la invención es un biosensor que comprende un sistema según la invención. El sistema de la invención es en principio aplicable a cualquier tipo de biosensor sobre el que pueda disponerse el sistema.

En una realización particularmente preferida, el sistema está dispuesto en un biosensor micro o nanomecánico de manera que señales optomecanoplasmónicas puedan detectarse y analizarse. Este tipo particular de biosensor dual permite una fiabilidad superior, ya que la respuesta del biosensor solo se considera positiva cuando tanto las señales plasmónicas como mecánicas dan un resultado positivo. Aunque el biosensor dual no mejora el límite de detección del sistema optoplasmónico de la invención solo, claramente mejora la especificidad del ensayo, mejorando así su fiabilidad.

Por ejemplo, en una realización particular, de un biosensor de señal dual basado en un sustrato en forma de una micropalanca, en la que se midieron tanto las señales plasmónicas como mecánicas, se observó que la tasa de error para las concentraciones menores era más pequeña en la transducción optoplasmónica. Para concentraciones superiores a 1 fg/ml, la tasa de error de tanto transducción mecánica como optoplasmónica se volvió comparable, pero positivamente, la combinación de señales mecánicas y optoplasmónicas (señal optomecanoplasmónica) potenció significativamente la confianza del ensayo que conduce a una tasa de positivos falsos y negativos falsos extremadamente baja, de aproximadamente 2×10^{-4} a una concentración ultrabaja de 100 ag/ml del analito diana (Figura 10).

En una realización particular, el biosensor está dispuesto en forma de una matriz que comprende múltiples sistemas según la invención, comprendiendo cada sistema un sustrato diseñado para detectar un analito diana diferente o diferentes concentraciones del mismo analito.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para detectar y/o cuantificar un analito diana seleccionado en una muestra que comprende:

- 5 a) poner en contacto una muestra con un sustrato de material dieléctrico que tiene una superficie funcionalizada con un elemento de reconocimiento que puede unirse específicamente al analito diana, teniendo el sustrato de material dieléctrico un espesor entre 0,1 μm y 5 μm y un coeficiente de extinción inferior a 0,3 y siendo la relación entre el índice de refracción del material dieléctrico y el material circundante superior a 1,1
- 10 b) añadir al sustrato resultante de a) al menos una nanopartícula con propiedades plasmónicas y que tiene al menos una de sus dimensiones con un tamaño de 2 nm a 300 nm, que comprende al menos un elemento de detección unido a ella y que puede unirse específicamente al analito diana, con el fin de detectar la presencia del analito diana unido al elemento de reconocimiento
- 15 c) irradiar el sustrato resultante de b) con una radiación electromagnética en la que la presencia del analito diana en la muestra produce un efecto plasmónico en las nanopartículas amplificadas por la presencia del sustrato que puede detectarse por medios ópticos,
- d) medir la dispersión de la luz o intensidad de la señal de extinción de manera que detecte la presencia o ausencia del analito diana en la muestra y para la cuantificación de la misma.

20 El procedimiento de la invención se basa en el uso del sistema de detección tipo sándwich de la invención como se ha explicado anteriormente.

La etapa a) es la etapa de reconocimiento, en la que la muestra se pone en contacto con la superficie funcionalizada del sustrato. La superficie del sustrato se diseña para detectar un tipo particular de analito diana. Así, después de un tiempo de incubación adecuado de manera que
25 pueda tener lugar la reacción si el analito diana está presente en la muestra, se unirá al elemento de reconocimiento y así se inmovilizará sobre la superficie.

Como se ha explicado anteriormente, el material dieléctrico usado en el procedimiento puede ser cualquier material dieléctrico en tanto que tenga un coeficiente de extinción inferior a 0,3.
30 En una realización particular, el material dieléctrico es cuarzo, silicio, nitruro de silicio, carburo de silicio, grafeno, polímeros tales como fotorresistentes como SU8 e hidrogeles tales como mezclas de PEG y PLA o de DEXTRANO y PEG. Los materiales dieléctricos más preferidos son silicio o nitruro de silicio.

También como se ha explicado anteriormente, el elemento de reconocimiento usado en el
35 procedimiento de la invención puede ser cualquier elemento que pueda reconocer y unirse específicamente a un analito diana deseado. En este sentido, en una realización particular, el elemento de reconocimiento puede ser un anticuerpo (un anticuerpo policlonal o monoclonal), un receptor (un receptor de la superficie celular tal como un receptor de opioides), un péptido (tal como un péptido de opioides), una proteína (tal como lectinas), un hidrato de carbono (tal como el antígeno O de lipopolisacárido), un ácido nucleico (una secuencia de ADN o ARN),
40 una célula (células protozoicas, células bacterianas, célula fúngica, células eucariotas), un microorganismo o una parte del mismo (tal como paredes bacterianas, orgánulos celulares como mitocondrias, vesículas celulares, etc.). En una realización preferida de la invención, el elemento de reconocimiento es un anticuerpo, más preferentemente un anticuerpo monoclonal.

45 La etapa b) del procedimiento de la invención comprende la etapa de detección. La nanopartícula que actúa de marca para la detección y cuantificación está unida a un elemento de detección que puede unirse específicamente al analito diana en una posición o área

diferente del elemento de reconocimiento. Si el analito diana está presente en la muestra, la estructura resultante de la etapa a) se detectará por el elemento de detección después de un tiempo de incubación adecuado. Una vez ha tenido lugar la reacción de detección, las nanopartículas se inmovilizan sobre la superficie del sustrato y están en condición de ser detectadas y/o cuantificadas basándose en sus propiedades plasmónicas.

El elemento de detección unido a la nanopartícula usada en el contexto del procedimiento puede ser cualquier tipo de elemento que pueda unirse al analito diana, así, en principio su naturaleza puede ser la misma o similar a la del elemento de reconocimiento. Sin embargo, en una realización preferida, el elemento de detección tanto se selecciona de un anticuerpo como de una molécula de ácido nucleico.

También como se explica antes, el tipo de nanopartícula usada en el procedimiento de la invención puede ser cualquier nanopartícula que presente propiedades plasmónicas. En este sentido, la nanopartícula puede ser una nanopartícula de oro, plata o de metamaterial plasmónico. Con respecto a la forma, la nanopartícula puede adoptar cualquier estructura tal como nanoesferas, nanovarillas, nanovarillas afiladas, nanovainas, nanojaulas/marcos, nanoesferas huecas, tetraedros, octaedros, cubos, icosaedros, dodecaedros rómbicos, nanocubos cóncavos, tetrahexaedros, bipirámides triangulares obtusas, trisohectaedros y nanoprismas en tanto que una de sus dimensiones tenga un tamaño de 2 nm a 300 nm.

La etapa c) comprende la irradiación de la superficie del sustrato con una radiación electromagnética de manera que revele la presencia o no de la nanopartícula en el sustrato. La radiación electromagnética incidente en el sustrato resultante de la etapa b) revelará si la muestra contiene o no el analito diana. Si el analito diana está presente en la muestra, la radiación electromagnética incidente producirá un efecto plasmónico en la nanopartícula que se potenciará enormemente por los fenómenos particulares que tienen lugar dentro de la cavidad del sustrato debido a su diseño particular. Como se ha explicado anteriormente, el efecto plasmónico potenciado producido cuando las nanopartículas están presentes en el sustrato es un modo híbrido que resulta del acoplamiento del modo de plasmones superficiales localizados sobre las nanopartículas y el modo de cavidad óptica.

La última etapa del procedimiento de la invención, etapa d), comprende medir la dispersión de la luz o intensidad de la señal de extinción de manera que se detecte la presencia o ausencia del analito diana en la muestra y para la cuantificación de la misma. Las mediciones pueden hacerse por dispositivos o medios ópticos adaptados para tal tarea tal como microscopio de campo oscuro o un microscopio de polarización cruzada.

La cuantificación puede hacerse basándose en la intensidad de la señal de la dispersión de la luz o la intensidad de la señal de la extinción de la luz. La intensidad de la señal medida puede relacionarse con una concentración de analito desconocida por comparación con una curva de calibración obtenida de muestras con concentraciones previamente conocidas de un analito.

El procedimiento de la invención puede diseñarse para medir el efecto plasmónico potenciado sobre las nanopartículas en reflectancia o transmitancia.

Si la medición se hace en reflectancia, entonces la intensidad de la señal de dispersión se mide y así el sustrato de material dieléctrico debe tener índice de reflectancia comprendido entre 0,01 y 1.

Alternativamente, si la medición se hace en transmitancia, entonces la intensidad de la señal de extinción se mide y así el sustrato de material dieléctrico debe tener índice de transmitancia comprendido entre 0,01 y 1.

El procedimiento de la presente invención permite límites de detección ultrabajos ya que discrimina concentraciones al borde de 10 ag/ml y tiene la ventaja de que permite la detección

de analitos diana en muestras complejas biológicas tales como muestras de sangre o de orina sin la necesidad de ninguna preparación o purificación previa de la muestra.

En una realización particularmente preferida, el procedimiento de la invención se realiza en un sistema micromecánico por el cual el sustrato de material dieléctrico está dispuesto como un elemento mecánico que puede sufrir un cambio en al menos una característica mecánica cuando el analito diana está presente en la muestra, y cuando se realizan las siguientes etapas adicionales:

e) medir la al menos una característica mecánica en el elemento mecánico de manera que detecte la presencia o ausencia del analito diana en la muestra,

f) combinar los datos ópticos obtenidos en la etapa d) con datos mecánicos de la etapa e) con el fin de mejorar la fiabilidad del procedimiento de detección.

Los inventores han encontrado que en esta realización particularmente preferida, el procedimiento de la invención, aunque no mejora el límite de detección espectacularmente, mejora la fiabilidad del procedimiento cuando se compara con el procedimiento solo basado en el efecto optoplasmónico. El procedimiento de la invención en esta realización particularmente preferida conduce a una tasa muy baja de positivos falsos y negativos falsos. La superior fiabilidad se explica debido a que el resultado del procedimiento solo se considera cuando tanto las señales plasmónicas como las mecánicas dan un resultado positivo.

En esta realización particular, el sustrato de material dieléctrico que es esencial en la presente invención debido a sus propiedades ópticas está dispuesto para también actuar de elemento mecánico que puede sufrir un cambio en al menos una característica mecánica cuando el analito diana está presente en la muestra. Este cambio en una característica mecánica puede medirse de manera que se obtenga una señal mecánica, además de la señal optoplasmónica. La presencia de la nanopartícula cuando el analito diana está presente en la muestra también produce una señal mecánica amplificada debido a la mayor masa proporcionada por la nanopartícula.

El elemento mecánico puede estar en forma de una micropalanca, un micropilar, un resonador de cuerda, un resonador de trampolín, una palanca rectangular, una palanca triangular, una palanca piramidal, una palanca de pala, un resonador de membrana, un resonador de placa, un puente, una palanca hueca o un nanoalambre. En una realización particularmente preferida, el sustrato está dispuesto para actuar de elemento mecánico en forma de una micropalanca.

Además, un cambio de cualquier característica mecánica del elemento mecánico puede medirse con el fin de detectar la presencia del analito diana en la muestra. El cambio de la característica mecánica detectado puede seleccionarse, aunque no limitarse a, la posición de una porción del elemento mecánico, la característica de vibración del elemento mecánico, tal como la fase de la vibración del elemento mecánico, la frecuencia de la vibración del elemento mecánico, la amplitud de la vibración del elemento mecánico o la tensión superficial sobre una porción del elemento mecánico o los cambios de disipación del elemento mecánico.

La combinación de los datos ópticos obtenidos en la etapa d) con los datos mecánicos de la etapa e) del presente procedimiento proporciona una fiabilidad mejorada del procedimiento.

Finalmente, otro objetivo de la invención es un dispositivo que puede detectar el efecto optoplasmónico potenciado de las nanopartículas por medio del sistema de la invención o bien combinar la detección de tal efecto optoplasmónico con el análisis de los cambios en las características mecánicas en el sustrato.

Más precisamente, el dispositivo para la inspección superficial dispuesto para detectar el efecto

optoplasmónico en al menos una nanopartícula de un sistema según las etapas c) y d) del procedimiento de la invención comprende:

- una fuente de radiación electromagnética dispuesta para generar al menos un haz de radiación electromagnética;
- 5 - un primer detector sensible tal como un microscopio de campo oscuro o un microscopio de polarización cruzada dispuesto para recibir la radiación electromagnética cuando se refleja o transmite a través del sustrato para producir al menos una primera señal de salida en respuesta a la dispersión y/o la extinción de dicha radiación electromagnética;
- un sistema de control electrónico;

10 Adicionalmente, con el fin de realizar las etapas e) y f) del procedimiento de la invención, en las que se miden cambios en las características mecánicas cuando el analito diana está presente en la muestra, el dispositivo también comprende:

- un subsistema para detectar un cambio en una característica mecánica en el sustrato, comprendiendo dicho subsistema un segundo detector sensible dispuesto para detectar un cambio mecánico en el sustrato para producir al menos una segunda señal en respuesta a dicho cambio mecánico, concretamente:
 - 15 ○ una luz de iluminación o rayo láser y un fotodetector sensible a la posición lineal (PSD) para registrar el cambio en la característica mecánica sobre el sustrato
 - un sistema de control electrónico;
 - 20 ○ medios de barrido para el desplazamiento relativo de dicha luz o rayo láser con respecto al sustrato de manera que se barra el sustrato con el haz de luz siguiendo instrucciones del sistema de control electrónico.

y

- 25 medios para producir una señal de salida final basada en la combinación de la primera y segunda señales de salida del primer y segundo detectores sensibles.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática del ensayo de sándwich sobre el sustrato en forma de una palanca. **(a)** La palanca está funcionalizada con anticuerpos de captura. La funcionalización comprende silanización, unión de anticuerpo sobre la superficie superior de la palanca y bloqueo con polietilenglicol para minimizar interacciones no específicas sobre la superficie inferior de la palanca y huecos entre los anticuerpos. **(b)** La palanca se sumerge entonces en la muestra de suero para unir la proteína de biomarcador, si está presente, por inmunorreacción con los anticuerpos de captura (elemento de reconocimiento). **(c)** Finalmente, las inmunorreacciones se revelan exponiendo la palanca a un anticuerpo primario (elemento de detección) que está unido a una nanopartícula de oro de 100 nm de diámetro que reconoce una región libre específica del biomarcador capturado.

Figura 2: Detección plasmónica del biomarcador de proteína CEA sobre la microcavidad óptica de la palanca. **(a)** Esquemas que ilustran las diferentes rutas para la generación de la señal óptica en la palanca mediante múltiples reflexiones internas. **(b)** Espectros de dispersión del ensayo de sándwich en las regiones de chip y de palanca para el ensayo de detección de CEA. La dispersión se normaliza a la del chip de silicio. El acoplamiento entre los modos plasmónicos dipolares y los modos individuales de la microcavidad de la palanca conduce a un efecto doble, primero la dispersión asistida por plasmones se potencia por la cavidad de la palanca óptica por casi un orden de magnitud, y segundo, el espectro de plasmones de nanopartículas se discretiza por los modos de cavidad óptica de la palanca.

Figura 3: Esquemas del procedimiento de deflexión del rayo óptico para medir la vibración de la palanca. Un rayo láser se enfoca sobre la región del extremo libre de la palanca. La deflexión del haz reflejado debido a la vibración de la palanca se mide por un fotodetector sensible a la posición lineal (PSD). Un generador de frecuencia barre la frecuencia excitando un actuador piezoeléctrico localizado debajo de la base de la matriz de la palanca. La amplitud de vibración frente a la frecuencia se ajusta al modelo de oscilador armónico para derivar la frecuencia de resonancia y el factor de calidad de la palanca.

Figura 4: Imágenes del microscopio electrónico de barrido (SEM) de una región de la palanca que cumple el diseño que conduce al efecto plasmónico potenciado (superficie de la micropalanca) y chip que tiene dimensiones que no conducen al efecto plasmónico potenciado, tanto después del ensayo de sándwich en un experimento de control como en un ensayo de detección de 1 pg/ml de CEA en suero. La superficie de la palanca y la superficie del chip muestran la misma cantidad promedio de nanopartículas.

Figura 5: Densidad de nanopartículas sobre las micropalancas y chip en tampón medido con un microscopio electrónico de barrido y usando un algoritmo basado en contraste de señales implementado en el software Matlab.

Figura 6: Detección plasmónica del biomarcador de proteínas CEA. **(a)** Imágenes ópticas de campo oscuro de la palanca después de la etapa de reconocimiento con los anticuerpos unidos a las nanopartículas para un experimento de control riguroso y para el ensayo de detección de CEA con una muestra de 1 pg/ml en solución salina tamponada con fosfato. La señal de dispersión es insignificante en el experimento de control, mientras que es significativamente mayor en la región de micropalanca en el ensayo de detección. La micropalanca actúa de cavidad óptica mientras que la dispersión en la región de prepinzamiento del chip es baja, y no puede usarse para discriminar la presencia de CEA en la muestra. **(b)** Señal de dispersión media en la micropalanca y el chip frente a la concentración de CEA en tampón y suero. La señal se obtiene de una rápida inspección de las palancas con un simple microscopio óptico comercial y objetivo de campo oscuro con bajo aumento. Los datos de la palanca se comparan con los datos del chip para evaluar el efecto de la cavidad de la palanca óptica. La dispersión para los experimentos de control en las regiones de palanca y de chip se representan como regiones discontinuas que representan la desviación estándar de los datos.

Figura 7: **(a)** Espectros de dispersión del efecto de las nanopartículas que se unen sobre el chip que tiene dimensiones que no conducen al efecto plasmónico potenciado, y regiones de palanca que cumplen el diseño que conduce al efecto plasmónico potenciado. La dispersión se normaliza a la de un chip de silicio en bruto. El recuadro ilustra las diferentes rutas para la generación de la señal dispersada en la palanca mediante múltiples reflexiones internas (también representadas en la Figura 2.) **(b)** Esquemas del efecto de la carga de masa de nanopartículas sobre la frecuencia de resonancia de la palanca. La reducción resultante de la frecuencia de resonancia es proporcional al aumento de masa.

Figura 8: Resonancia de plasmones de nanopartículas y cavidad de la palanca óptica. **(a)** Las nanopartículas de oro usadas en el ensayo de sándwich caracterizan resonancias de plasmones asociadas a oscilaciones de electrones colectivas en la nanopartícula. Estas resonancias dan lugar a dispersión y absorción potenciadas próximas a la frecuencia de resonancia óptica. **(b)** Imagen óptica de campo oscuro de una única nanopartícula de 100 nm de diámetro después de realizar un ensayo de sándwich sobre un sustrato de silicio. La nanopartícula de oro presenta el muy conocido patrón de Airy debido a la difracción de la luz. **(c)** Espectros de dispersión recogidos de un área de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ con una única nanopartícula. **(d)** Imagen de microscopía electrónica de barrido que muestra la frontera entre el chip, 6 μm de espesor, y la palanca, 1 μm de espesor. El espesor de la palanca hace que la luz pueda rebotar eficazmente múltiples veces entre los lados de la palanca opuestos que dan lugar a un potenciamiento de la reflectividad óptica a longitudes de onda en las que se producen

interferencia constructiva y, en cambio, a supresión de la reflectividad para longitudes de onda en las se produce interferencia destructiva. **(e)** Imágenes de campo brillante de las regiones de palanca y chip que muestran la modulación de la reflectividad de la palanca con la longitud de onda de iluminación en la región del espectro visible. La modulación de la reflectividad del chip es insignificante. **(f)** Reflectividad relativa en la palanca con respecto al chip.

Figura 9: Biomarcador de la proteína CEA de detección mecánica. **(a)** Frecuencia de resonancia mecánica de una palanca de silicio antes y después de la etapa de reconocimiento con los anticuerpos unidos a nanopartículas para un experimento de control y para un ensayo de detección de CEA (1 pg/ml en PBS). Las mediciones se llevaron a cabo en aire a temperatura ambiente. La frecuencia de resonancia fundamental y los factores de calidad de las palancas sin recubrir fueron $4,8 \pm 0,5$ kHz y $5,5 \pm 0,5$, respectivamente. **(b)** Desplazamiento relativo de la frecuencia de resonancia del modo de vibración fundamental frente a la concentración de biomarcador en tampón y muestras de suero (símbolos rojos). Las líneas son una guía para los ojos. Los desplazamientos de la frecuencia medidos en disolución de tampón se comparan con el desplazamiento de la frecuencia teórica predicho de la distribución de nanopartículas sobre la palanca obtenida por microscopia electrónica de barrido. La buena concordancia confirma que el desplazamiento de la frecuencia se produce a partir de la carga de masa de nanopartículas. El desplazamiento de la frecuencia para los experimentos de control se representa como una región discontinua que representa la desviación estándar de los datos.

Figura 10: **(a)** Curvas de DET para una concentración de 10 fg/ml usando las señales nanomecánicas y plasmónicas y una combinación lineal óptima de ellas. **(b)** Tasa de negativos falsos frente a la tasa de positivos falsos para cada mecanismo de transducción y para un procedimiento híbrido que usa una combinación lineal óptima de las señales de desplazamiento de frecuencia de resonancia de dispersión y mecánicas. Los colores indican la concentración diana.

Figura 11: Ejemplos de diferentes formas para el sustrato del sistema **(a)** micropalancas comerciales, **(b)** resonadores de micropilar, **(c)** resonador de cuerda, **(d)** resonadores de trampolín, **(e)** palancas rectangulares, triangulares y de pala, **(f)** resonadores de membrana, **(g)** resonadores de placa, **(h)** imagen de SEM de una palanca hueca y representación esquemática, **(i)** nanoalambre.

Figura 12: Nanopartículas de oro de diverso tamaño y forma útiles en el sistema de la invención. Nanoesferas pequeñas **(a)** y grandes **(b)**, **(c)** nanovarillas, **(d)** nanovarillas afiladas, **(e)** nanovainas, **(f)** nanojaulas/marcos, **(g)** nanoesferas huecas, **(h)** tetraedros/octaedros/cubos/icosaedros, **(i)** dodecaedros rómbicos, **(j)** octaedros, **(k)** nanocubos cóncavos, **(l)** tetrahexaedros, **(m)** dodecaedros rómbicos, **(n)** bipirámides triangulares obtusas, **(o)** trisoctaedros y **(p)** nanoprismas.

DESCRIPCIÓN DE UNA REALIZACIÓN PREFERIDA DE LA INVENCION

Como experimento de prueba de concepto para soportar la invención se realizó un inmunoensayo de sándwich para la detección de un biomarcador de cáncer. La detección del antígeno carcinoembrionario (CEA) se eligió como modelo. Primero, se aplicó un procedimiento de biofuncionalización a palancas con eficiencia de reconocimiento óptima y capacidad de incrustación ultrabaja³³ (véase la Figura 1a). Las palancas de silicio tuvieron 500 μ m de longitud, 100 μ m de anchura y 1 μ m de espesor. Esta biofuncionalización se produce para inmovilizar la capa de receptor que reconoce y atrapa el biomarcador de cáncer. Después de eso, la palanca biofuncionalizada se sumergió en la muestra de líquido durante un periodo de tiempo determinado y temperatura fija para permitir la unión del biomarcador elegido como diana a los anticuerpos de captura inmovilizados sobre la superficie de la palanca (véase la Figura 1b). Después del aclarado riguroso, la palanca se expuso a una disolución que contenía el anticuerpo de detección unido a la nanopartícula que reconoció y se unió a una región

específica del biomarcador capturado de superficie (véase la Figura 1c); aquí también se determinó el tiempo y temperatura ideales para el segundo reconocimiento. Básicamente, se llevó a cabo un ensayo de sándwich que implica dos etapas de reconocimiento para potenciar la selectividad y amplificar la respuesta del sensor. El anticuerpo de detección se unió a una nanopartícula de oro de 100 nm de diámetro que convirtió y amplificó el producto de biorreconocimiento en dos señales físicas detectables: (i) un aumento de masa y (ii) un aumento de dispersión de la luz debido a las propiedades plasmónicas de la nanopartícula (véanse la Figura 7a y 7b).

Para estos experimentos, el protocolo detallado para la inmovilización del anticuerpo de captura, detección del biomarcador y el ensayo de sándwich se aplicó como se describe a continuación.

Conjugación de anticuerpo con nanopartículas de oro esféricas de polímero de carboxilo

El anticuerpo primario, monoclonal de ratón anti-antígeno carcinoembrionario 3C1 (MAb3C1), se inmovilizó sobre la superficie de las nanopartículas de oro esféricas de polímero de carboxilo de 100 nm de diámetro siguiendo el procedimiento proporcionado por Nanopartz™. La muestra se almacenó en el frigorífico a 4 °C hasta su uso.

Funcionalización de la palanca y activación de los grupos carboxilo sobre la superficie

Antes de la funcionalización de la superficie, las matrices de palancas se limpiaron con disolución piraña (3H₂SO₄:1 H₂O₂) (cuidado: la disolución piraña es extremadamente corrosiva, reactiva y potencialmente explosiva) durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA). Las palancas se aclararon tres veces con agua Milli-Q y se secaron bajo una corriente de nitrógeno. Las palancas se sumergieron en una disolución al 0,2 % de (3-glicidiloxipropil)trimetoxisilano en tolueno seco durante la noche a temperatura ambiente. Después de eso, las muestras se lavaron con tolueno, agua Milli-Q y se secaron bajo N₂. Se preparó una disolución de NTA 100 mM en tampón carbonato 50 mM a pH 9,5 y las palancas se incubaron durante la noche a 25 °C bajo agitación suave. Entonces, las palancas se aclararon con tampón carbonato 50 mM a pH 9,5, agua Milli-Q y se secaron bajo N₂. Los grupos carboxilo en la superficie de la palanca se activaron por inmersión en una disolución mixta de EDC 100 mM y sulfo-NHS 150 mM, ambos disueltos en MES 10 mM a pH 5,5. Las palancas se incubaron durante 45 minutos a 37 °C bajo agitación suave. Las muestras se aclararon ampliamente con MES 10 mM.

Inmovilización covalente y orientada de los anticuerpos de captura y control sobre la palanca

Justamente después de la etapa de activación superficial, la inmovilización del anticuerpo se realizó solo sobre el lado superior de las palancas. Se preparó una disolución de 50 µg /ml del anticuerpo de captura, monoclonal de ratón anti-antígeno carcinoembrionario 3C6 (MAb3C6), en MES 10 mM a pH 5,5. Las palancas se incubaron durante 2 horas a 37 °C. Después de eso, las muestras se lavaron con MES 10 mM a pH 5,5 y se incubaron durante 45 minutos a 37 °C con tampón fosfato de sodio 10 mM a pH 8,0 con NaCl 0,3 M para desorber anticuerpos que no estaban covalentemente unidos a la superficie. Para los experimentos de control, anticuerpo anti-peroxidasa producido en conejo (anti-HRP) se inmovilizó sobre el lado superior de la superficie de la palanca en lugar de MAb3C6. Para las muestras de control se usaron la misma concentración de anticuerpo y procedimiento aplicados a la inmovilización covalente y orientada de MAb3C6. Antes de la inmovilización del anticuerpo de control sobre las palancas, 1 ml de una disolución de 4 mg/ml de anti-HRP en agua Milli-Q se dializó durante la noche a 4 °C. La concentración de la disolución de anticuerpo después de la diálisis se determinó usando el ensayo de Bradford [M. M. Bradford, M. M. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72, 248-254]. Se hizo una curva de calibración usando albúmina bovina de suero (BSA) como patrón de proteína. El intervalo de linealidad del ensayo fue de 5 µg/ml a 2500 µg/ml.

Después de la inmovilización de anticuerpos de captura (MAb3C6) y control (anti-HRP) en un

modo covalente y orientado y desorción de los anticuerpos que no se unen covalentemente a la superficie, la superficie de la palanca se bloqueó para prevenir adsorciones no específicas. Las palancas se sumergieron en 1 mg/ml de (aminoetil)polietilenglicol (PEG), durante la noche a 4 °C. Después de eso, las muestras se lavaron con MES a pH 5,5 con 0,05 % de Tween® 20 (pH 5,5).

Reconocimiento de biomarcadores y ensayo de sándwich

Las palancas se incubaron durante 1 hora a 37 °C en disoluciones de CEA con concentraciones que oscilan de 1 pg/ml a 1 ag/ml en disolución de PBS con 0,05 % de Tween® 20 a pH 7,4 (PBST). Con el fin de tener experimentos de control rigurosos, la concentración de CEA en disolución usada para estas muestras fue de 1 µg/ml. Para simular una muestra real se prepararon disoluciones de CEA con concentración que oscila de 100 fg/ml a 10 ag/ml en SBF y para los rigurosos experimentos de control en SBF la concentración de CEA se mantuvo a 1 µg/ml. Justo después, las palancas se lavaron dos veces con PBST y una vez con PBS a pH 7,4. Después de eso, las muestras se aclararon con agua Milli-Q y se secaron bajo una corriente de N₂.

Para el ensayo de sándwich, las palancas se sumergieron en 1 µg/ml de disolución de nanopartículas de oro esféricas funcionalizadas con el anticuerpo de detección (GNPs-MAb3C1) preparado en MES 10 mM con 0,05 % de Tween® 20 pH 5,5. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 1 hora bajo agitación suave, se lavaron tres veces con MES con Tween, dos veces con MES, se aclararon ampliamente con agua Milli-Q y se secaron bajo una corriente de N₂.

La eficiencia del reconocimiento de biomarcador puede afectarse por la capa de biorreceptor inmovilizada sobre la palanca y también por las condiciones experimentales a las que la reacción de reconocimiento tiene lugar tales como temperatura, pH y tiempo. Las estrategias para inmovilizar la capa de biorreceptor deben optimizarse para cada caso; pueden incluir la orientación y densidad de los receptores sobre la superficie, y las estrategias de bloqueo para evitar interacciones no específicas. Por ejemplo, si el biomarcador de detección es una proteína pequeña, la estrategia para inmovilizar los anticuerpos sobre la superficie de la micropalanca, como su densidad y orientación, y la molécula de bloqueo elegida no serán las mismas si ahora el biosensor se revela para la detección de una célula bacteriana, que es mayor. Incluso cuando se trabaja solo con anticuerpos las condiciones pueden cambiar; deberían determinarse y optimizarse condiciones ideales como concentración, pH, tiempo y temperatura que va a usarse. La inmovilización y condiciones experimentales para el reconocimiento de analitos tienen que personalizarse cada caso; pero el principio del procedimiento presentado aquí, basado en la detección dual, sigue siendo el mismo.

Las mediciones ópticas se realizaron usando un microscopio óptico comercial en modo reflectivo de campo oscuro (Axioskop 2 MAT equipado con AxioCam MRc 5 y objetivos de campo brillante/campo oscuro EC Epiplan Neofluor® de Zeiss 50x de Zeiss - Oberkochen, Alemania). Las superficies del chip y la palanca se observaron después de la etapa de reconocimiento de CEA sobre la palanca y después del ensayo de sándwich (unión de las nanopartículas funcionalizadas con el anticuerpo de detección).

La frecuencia de resonancia se obtuvo de la vibración accionada de la palanca que se detecta ópticamente por medio del simple procedimiento de palanca óptica³⁵ (véase la Figura 3). La frecuencia de resonancia del modo de vibración fundamental de la palanca se mide en aire antes y después de la exposición de la palanca a las nanopartículas de oro funcionalizadas con el anticuerpo primario.

Las muestras usadas en los experimentos para la prueba de concepto se analizaron por microscopía electrónica de barrido (SEM) como se ilustra en la Figura 4. Al menos 100 imágenes sobre la palanca y el chip se tomaron para cada concentración de CEA detectada y

ambas superficies presentaron la misma densidad de nanopartículas (Figura 5). La información obtenida de las imágenes de SEM se usará para soportar los resultados encontrados de las mediciones ópticas y mecánicas.

5 La Figura 6a muestra las imágenes de campo oscuro de la región de chip para un experimento de control y para un experimento de detección con 1 pg/ml de CEA en PBS. La señal de dispersión es despreciable en el experimento de control. En el caso del ensayo de detección de CEA, un aumento despreciable de la dispersión se observa en la región de chip, la región de chip tiene dimensiones fuera de las reglas del diseño para el sustrato en la invención, no conduciendo así al efecto plasmónico potenciado, mientras que las nanopartículas unidas
10 hacen que el área de la palanca brille, ya que la palanca cumple con el diseño que conduce al efecto plasmónico potenciado.

La señal de dispersión media obtenida de las imágenes de campo oscuro se representa en la Figura 6b en función de la concentración de CEA en tampón o suero. El límite de detección encontrado para los experimentos realizados en medio tampón es 0,1 fg/ml. La señal de
15 dispersión en la palanca es aproximadamente 6 veces la señal en el chip, mostrando los aumentos de la señal óptica por el sustrato diseñado. El potenciamiento resonante de la señal de dispersión desempeña una función de determinación en la detección de CEA a concentraciones ultrabajas en suero. Así, la señal de dispersión en el chip se basa en la región obtenida en los experimentos de control para concentraciones de CEA de 0,1 fg/ml a 100 fg/ml.
20 Impresionantemente, el potenciamiento inducido por la cavidad de la palanca de la señal de dispersión permite la discriminación de concentraciones de tan solo 0,1 fg/ml.

El aspecto brillante de la palanca está relacionado con su efecto como cavidad óptica, como se bosqueja en la Figura 7a. Si la luz interacciona con una nanopartícula sobre el chip de la palanca (un soporte que no cumple las reglas de diseño del objetivo de la invención), la luz
25 dispersa recogida se da solo por la dispersión hacia atrás de la dispersión procedente de la superficie de separación entre el medio medioambiental y el sustrato en bruto. Si la nanopartícula está sobre la palanca, además de la dispersión hacia atrás observada en el chip de soporte en bruto, múltiples rutas ayudan a potenciar la dispersión por una única nanopartícula que potencia espectacularmente la señal de dispersión hacia atrás medida. Una
30 ruta implica la amplificación de la luz dispersada por la nanopartícula hacia la palanca por múltiples reflexiones, produciendo procedimientos de dispersión múltiple. Una segunda ruta encierra los procedimientos en los que la luz que golpea en las regiones de la palanca entre nanopartículas experimentan múltiples reflexiones en la cavidad de la palanca óptica, produciendo una cascada de interacciones de dispersión en el sitio de nanopartículas.

35 Con el fin de determinar el acoplamiento entre la cavidad óptica y la respuesta de plasmones se analizó la respuesta espectral de la dispersión en la palanca y el chip de soporte. Los espectros mostraron el potenciamiento resonante de la dispersión asistida por plasmones de la cavidad de la palanca óptica por casi un orden de magnitud. Los procedimientos de múltiple reflexión en la cavidad de la palanca dan lugar a la modulación de la señal de dispersión con la
40 longitud de onda, reminiscente de la modulación de reflectividad mostrada en la Figura 8.

La Figura 9 muestra la respuesta de frecuencia mecánica de la palanca debido a la masa añadida dada por nanopartículas recubiertas de anticuerpo que se unen. La resonancia mecánica se midió por un instrumento con un procedimiento de deflexión de rayo láser como se representa en la Figura 3 para la lectura. La Figura 9a muestra el pico de frecuencia de
45 resonancia mecánica antes y después de la etapa de reconocimiento de nanopartículas en medios tampón para el experimento de control y durante 1 pg/ml de CEA. Los picos de resonancia mecánica antes y después de la exposición de la palanca de control a la disolución que contiene los biomarcadores de CEA presentan diferencias despreciables. En el ensayo de detección de CEA se observa un desplazamiento significativo del pico de resonancia mecánica
50 a frecuencias menores. Los desplazamientos de la frecuencia de resonancia mecánica frente a

la concentración de CEA se representan en la Figura 9b para tampón purificado (izquierda) y disoluciones en suero (derecha). Los desplazamiento de resonancia mecánica en disolución de tampón se muestran en la Figura 9b (izquierda) junto con el ruido base biológico determinado en los ensayos de control. Los datos experimentales muestran una coincidencia excelente con la predicción teórica basándose en la masa de las nanopartículas unidas a la palanca que los presentes inventores han evaluado por SEM. El límite de detección en estas curvas de calibración es 0,1 fg/ml. El límite de detección aumenta un orden de magnitud cuando los ensayos se realizan en suero debido a la enorme cantidad de interacciones no específicas de competición entre las biomoléculas de plasma y la superficie de la palanca.

El hecho de que la técnica óptica alcance un mayor límite de detección al obtenido con la medición mecánica no indica que sea un mejor biosensor. Un análisis estadístico de la fiabilidad de los sensores ópticos y mecánicos puros indica que ambos biosensores tienen rendimientos similares, pero la combinación de los dos mecanismos de transducción condujo a un biosensor dual con rendimiento mejorado como puede observarse en la Figura 10.

15 Estudio estadístico de la fiabilidad del sensor optomecanoplasmónico (señal híbrida)

La sensibilidad y especificidad de una prueba de diagnóstica son función de un valor umbral elegido. El cambiar el valor umbral de manera que aumente la sensibilidad disminuirá la especificidad, y viceversa. La curva de la *característica operativa del receptor* (ROC) es una gráfica de todos los pares de sensibilidad/especificidad resultantes de variar continuamente el umbral de decisión con respecto al intervalo complejo de resultados observados. Éste es un gráfico de la tasa de positivos verdaderos (o sensibilidad) en el eje y y la tasa de negativos verdaderos (especificidad 1) en el eje x. La tasa de positivos verdaderos (TPR) es la probabilidad de que un caso de enfermedad se clasifique correctamente y la tasa de negativos verdaderos (TNR) es la probabilidad de que un caso normal verdadero se clasifique correctamente. La curva de ROC también puede usarse para comparar el rendimiento de dos o más pruebas de diagnóstico^{7,8}. Una alternativa a la curva de ROC es la gráfica de la compensación del error de detección (DET), que representa la tasa de negativos falsos (detecciones perdidas) frente a la tasa de positivos falsos (alarmas falsas) en eje x e y logarítmicos. Esta alternativa gasta más área de gráfica en la región de interés, es decir, la región con tasa de falsos mínima. La gráfica de DET se realiza suponiendo una distribución normal determinada por el valor medio y desviación estándar experimentalmente obtenidos. La Figura 10a muestra las curvas de DET para una concentración de 10 fg/ml por los procedimientos de transducción plasmónica y nanomecánica. La línea de rayas-puntos se corresponde con un *parámetro aleatorio*. Ambos procedimientos de transducción proporcionan curvas de DET muy por debajo de esta curva de no discriminación. El valor óptimo de la señal umbral es aquel que da un mínimo en la distancia entre la curva de DET y el origen. Ahora se considera el caso en el que la señal de los presentes inventores sea una combinación de la intensidad de dispersión y el desplazamiento de la frecuencia de resonancia mecánica⁷. La combinación lineal se optimiza minimizando la distancia mínima entre la curva de DET y el origen. De esta forma, gracias a la señal dual, la tasa de falsos de la detección de los presentes inventores siempre se potencia como se muestra en la Figura 10a. La potenciación en la fiabilidad es modesta para las menores concentraciones como puede apreciarse en la Figura 10b, en la que la transducción plasmónica es claramente superior a la transducción nanomecánica. Sin embargo, a medida que aumenta la concentración, la fiabilidad de ambos procedimientos de transducción se vuelve comparable, y la optimización por combinación lineal de ambas señales es claramente ventajosa (véanse los símbolos de esferas en la Figura 10b).

REFERENCIAS

1. D'Orazio, P. Biosensors in clinical chemistry-2011 update. *Clinica Chimica Acta* 412, 1749-1761 (2011).

2. Tothill, I. E. 55-62 (Elsevier).
3. Justino, C. I. L., Rocha-Santos, T. A. & Duarte, A. C. Review of analytical figures of merit of sensors and biosensors in clinical applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 29, 1172-1183 (2010).
- 5 4. Fan, X. y col. Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review. *Analytical chimica acta* 620, 8-26 (2008).
5. Wang, J. Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: A review. *Electroanalysis* 17, 7-14 (2005).
6. Wang, J. Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics* 21, 1887-1892 (2006).
- 10 7. Wang, J. Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 19, 47-53 (1999).
8. Stern, E. y col. Label-free biomarker detection from whole blood. *Nature nanotechnology* 5, 138-142 (2009).
- 15 9. Duan, X. y col. Quantification of the affinities and kinetics of protein interactions using silicon nanowire biosensors. *Nature nanotechnology* 7, 401-407 (2012).
10. Zheng, G., Gao, X. P. A. & Lieber, C. M. Frequency domain detection of biomolecules using silicon nanowire biosensors. *Nano Letters* 10, 3179-3183 (2010).
11. Dixon, M. C. Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring: enabling real-time characterization of biological materials and their interactions. *Journal of biomolecular techniques: JBT* 19, 151 (2008).
- 20 12. Lange, K., Rapp, B. E. & Rapp, M. Surface acoustic wave biosensors: a review. *Analytical and bioanalytical chemistry* 391, 1509-1519 (2008).
13. O'sullivan, C. & Guilbault, G. Commercial quartz crystal microbalances-theory and applications. *Biosensors and Bioelectronics* 14, 663-670 (1999).
- 25 14. Arlett, J., Myers, E. & Roukes, M. Comparative advantages of mechanical biosensors. *Nature nanotechnology* 6, 203-215 (2011).
15. Boisen, A. & Thundat, T. Design & fabrication of cantilever array biosensors. *Materials Today* 12, 32-38 (2009).
- 30 16. Datar, R. y col. Cantilever sensors: nanomechanical tools for diagnostics. *MRS bulletin* 34, 449-454 (2009).
17. Boisen, A., Dohn, S., Keller, S. S., Schmid, S. & Tenje, M. Cantilever-like micromechanical sensors. *Reports on Progress in Physics* 74, 036101 (2011).
18. Fritz, J. Cantilever biosensors. *Analyst* 133, 855-863 (2008).
- 35 19. Raiteri, R., Grattarola, M., Butt, H. J. & Skladal, P. Micromechanical cantilever-based biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* 79, 115-126 (2001).
20. Waggoner, P. S. & Craighead, H. G. Micro-and nanomechanical sensors for environmental, chemical, and biological detection. *Lab Chip* 7, 1238-1255 (2007).
- 40 21. Kathryn M. Mayer, Jason H. Hafner, Localized Surface Plasmon Resonance Sensors, *Chemical Reviews* 111, 3828-3857 (2011)

- 22.** Roberto de la Rica, Molly M. Stevens, Plasmonic ELISA for the ultrasensitive detection of disease biomarkers with the naked eye, *Nature Nanotechnology* 7, 821–824 (2012)
- 23.** Jwa-Min Nam, C. Shad Thaxton, Chad A. Mirkin, Nanoparticle-Based Bio-Bar Codes for the Ultrasensitive Detection of Proteins, *Science* 301, 1884-1886 (2003)
- 5 **25.** Dong y col., Two types of nanoparticle-based bio-barcode amplification assays to detect HIV-1 p24 antigen, *Virology Journal* 9, 180 (2012)
- 26.** Elghanian R, Storhoff JJ, Mucic RC, Letsinger RL, Mirkin CA, Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles, *Science* 277, 1078-81 (1997)
- 10 **27.** James J. Storhoff , Robert Elghanian , Robert C. Mucic , Chad A. Mirkin , Robert L. Letsinger, One-Pot Colorimetric Differentiation of Polynucleotides with Single Base Imperfections Using Gold Nanoparticle Probes, *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 1959–1964 (1998)
- 28.** T. Andrew Taton, Chad A. Mirkin, Robert L. Letsinger, Scanometric DNA Array Detection with Nanoparticle Probes, *Science* 289, 1757-1760 (2000)
- 15 **29.** Robert Jenison, Shao Yang, Ayla Haerberli, Barry Polisky, Interference-based detection of nucleic acid targets on optically coated silicon, *Nature Biotechnology* 19, 62 - 65 (2001)
- 30.** Goluch ED1, Nam JM, Georganopoulou DG, Chiesl TN, Shaikh KA, Ryu KS, Barron AE, Mirkin CA, Liu C., A bio-barcode assay for on-chip attomolar-sensitivity protein detection, *Lab Chip*. 6, 1293-9 (2006)
- 20 **31.** Waggoner, P. S., Varshney, M. & Craighead, H. G. Detection of prostate specific antigen with nanomechanical resonators. *Lab Chip* 9, 3095-3099 (2009).
- 32.** Nair, P. R. & Alam, M. A. Theory of “Selectivity” of label-free nanobiosensors: A geometro-physical perspective. *Journal of applied physics* 107, 064701-064701-064706 (2010).
- 33.** Priscila M. Kosaka, Javier Tamayo, José J. Ruz, Sara Puertas, Ester Polo, Valeria Grazu, 25 Jesús M. de la Fuente y Montserrat Calleja. Tackling Reproducibility in Microcantilever Biosensors: A Statistical Approach for Sensitive and Specific End-point detection of Immunoreactions, *Analyst* 138, 863-872 (2013).
- 34.** Varshney M, Waggoner PS, Tan CP, Aubin K, Montagna RA, Craighead HG., Prion protein detection using nanomechanical resonator arrays and secondary mass labeling, *Anal Chem*. 30 80, 2141-8 (2008).
- 35.** Javier Tamayo, Valerio Pini, Priscila Kosaka, Nicolas F Martinez, Oscar Ahumada, Montserrat Calleja, Imaging the surface stress and vibration modes of a microcantilever by laser beam deflection microscopy, *Nanotechnology*, 23, 315501 (2012)

REIVINDICACIONES

1. Un sistema para aplicaciones de biodetección que comprende:

- 5
- a. un sustrato de material dieléctrico que tiene al menos una superficie funcionalizada con un elemento de reconocimiento que puede unirse específicamente a un analito diana y
 - b. al menos una nanopartícula con propiedades plasmónicas que comprende al menos un elemento de detección unido a ella y que puede unirse específicamente al analito diana en una disposición tipo sándwich,

caracterizado porque:

- 10
- el sustrato de material dieléctrico tiene un espesor entre 0,1 μm y 5 μm y un coeficiente de extinción inferior a 0,3,
 - la nanopartícula tiene al menos una de sus dimensiones con un tamaño de 2 nm a 300 nm y
 - porque la relación entre el índice de refracción del material dieléctrico y el material
- 15

2. Un sistema según la reivindicación 1, en el que el material dieléctrico está seleccionado de cuarzo, silicio, nitruro de silicio, carburo de silicio, grafeno, polímeros e hidrogeles.

3. Un sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el sustrato tiene la forma de una micropalanca, un micropilar, un resonador de cuerda, un resonador de trampolín, una palanca rectangular, una palanca triangular, una palanca piramidal, una palanca de pala, un resonador de membrana, un resonador de placa, un puente, una palanca hueca o un nanoalambre.

20

4. Un sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el sustrato está funcionalizado con un elemento de reconocimiento seleccionado de un anticuerpo, un receptor, un péptido, una proteína un hidrato de carbono, un ácido nucleico, una célula, un microorganismo o una parte del mismo.

25

5. Un sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el elemento de detección está seleccionado de un anticuerpo o una molécula de ácido nucleico.

6. Un sistema según la reivindicación 1 a 5, en el que la nanopartícula es una nanopartícula de oro, plata o de metamaterial plasmónico.

30

7. Un sistema según la reivindicación 1 a 5, en el que la nanopartícula tiene una estructura seleccionada del grupo de nanoesferas, nanovarillas, nanovarillas afiladas, nanovainas, nanojaulas/marcos, nanoesferas huecas, tetraedros, octaedros, cubos, icosaedros, dodecaedros rómbicos, nanocubos cóncavos, tetrahexaedros, bipirámides triangulares obtusas, trisoctaedros y nanoprismas.

35

8. Un sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el sustrato tiene un índice de transmitancia comprendido entre 0,01 y 1 y/o un índice de reflectancia comprendido entre 0,01 y 1.

9. Un biosensor que comprende un sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

40

10. Un biosensor dispuesto en forma de una matriz que comprende múltiples sistemas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, comprendiendo cada sistema un sustrato diseñado para detectar un analito diana diferente o concentraciones diferentes del mismo analito.

11. Un procedimiento para detectar y/o cuantificar un analito diana seleccionado en una muestra que comprende:

- 5 a) poner en contacto una muestra con un sustrato de material dieléctrico que tiene una superficie funcionalizada con un elemento de reconocimiento que puede unirse específicamente al analito diana, teniendo el sustrato de material dieléctrico un espesor entre 0,1 μm y 5 μm y un coeficiente de extinción inferior a 0,3 y siendo la relación entre el índice de refracción del material dieléctrico y el material circundante superior a 1,1
- 10 b) añadir al sustrato resultante de a) al menos una nanopartícula con propiedades plasmónicas y que tiene al menos una de sus dimensiones con un tamaño de 2 nm a 300 nm, que comprende al menos un elemento de detección unido a ella y que puede unirse específicamente al analito diana, con el fin de detectar la presencia del analito diana unido al elemento de reconocimiento
- 15 c) irradiar el sustrato resultante de b) con una radiación electromagnética en la que la presencia del analito diana en la muestra produce un efecto plasmónico en las nanopartículas amplificadas por la presencia del sustrato que puede detectarse por medios ópticos,
- d) medir la dispersión de la luz o intensidad de la señal de extinción de manera que detecte la presencia o ausencia del analito diana en la muestra y para la cuantificación de la misma.

20 12. Un procedimiento según la reivindicación 11, en el que el material dieléctrico está seleccionado de cuarzo, silicio, nitruro de silicio, carburo de silicio, polímeros, hidrogeles o grafeno.

25 13. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, en el que el elemento de reconocimiento está seleccionado de un anticuerpo, un receptor, un péptido, un hidrato de carbono, un ácido nucleico, una célula y un microorganismo o una parte del mismo.

14. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que el elemento de detección está seleccionado de un anticuerpo o una molécula de ácido nucleico.

15. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que la nanopartícula es una nanopartícula de oro, plata o un metamaterial plasmónico.

30 16. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en el que la nanopartícula tiene una estructura seleccionada del grupo de nanoesferas, nanovarillas, nanovarillas afiladas, nanovainas, nanojaulas/marcos, nanoesferas huecas, tetraedros, octaedros, cubos, icosaedros, dodecaedros rómbicos, nanocubos cóncavos, tetrahexaedros, bipirámides triangulares obtusas, trisohectaedros y nanoprismas.

35 17. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, en el que el medio óptico comprende microscopio de campo oscuro o un microscopio de polarización cruzada.

18. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, en el que:

- el sustrato de material dieléctrico tiene un índice de reflectancia comprendido entre 0,01 y 1 cuando la señal de intensidad de dispersión se mide o
- 40 • el sustrato de material dieléctrico tiene un índice de transmitancia comprendido entre 0,01 y 1 cuando la señal de intensidad de extinción se mide.

19. Un procedimiento según cualquiera de la reivindicación 11 a 18, en el que el procedimiento se realiza en un sistema microelectromecánico por el cual el sustrato de material dieléctrico está dispuesto como elemento mecánico que puede sufrir un cambio en al menos una

característica mecánica cuando el analito diana está presente en la muestra, y, en el que se realizan las siguientes etapas adicionales:

e) medir al menos una característica mecánica en el elemento mecánico de manera que detecte la presencia o ausencia del analito diana en la muestra,

5 f) combinar los datos ópticos obtenidos en la etapa d) con datos mecánicos de la etapa e) con el fin de mejorar la fiabilidad del procedimiento de detección.

20. Un procedimiento según la reivindicación 19, en el que el elemento mecánico puede estar en forma de una micropalanca, un micropilar, un resonador de cuerda, un resonador de trampolín, una palanca rectangular, una palanca triangular, una palanca piramidal, una palanca de pala, un resonador de membrana, un resonador de placa, un puente, una palanca hueca o un nanoalambre.

21. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 19-20, en el que la al menos una característica mecánica puede seleccionarse de: la posición de una porción del elemento mecánico, la característica de vibración del elemento mecánico, tal como la fase de la vibración del elemento mecánico, la frecuencia de la vibración del elemento mecánico, la amplitud de la vibración del elemento mecánico o la tensión superficial sobre una porción del elemento mecánico o los cambios de disipación del elemento mecánico.

22. Dispositivo para la inspección superficial dispuesto para detectar un efecto optoplasmónico en al menos una nanopartícula de un sistema según la reivindicación 1, comprendiendo dicho dispositivo:

- una fuente de radiación electromagnética dispuesta para generar al menos un haz de radiación electromagnética;
- un primer detector sensible dispuesto para recibir la radiación electromagnética cuando se refleja o transmite a través del sustrato para producir al menos una primera señal de salida en respuesta a la dispersión y/o la extinción de dicha radiación electromagnética;
- un sistema de control electrónico;

23. Un dispositivo según la reivindicación 22, en el que el dispositivo comprende además:

- un subsistema para detectar un cambio en una característica mecánica en el sustrato, comprendiendo dicho subsistema un segundo detector sensible dispuesto para detectar un cambio mecánico en el sustrato para producir al menos una segunda señal en respuesta a dicho cambio mecánico; y
- medios para producir una señal de salida final basada en la combinación de primera y segunda señales de salida del primer y segundo detectores sensibles.

24. Un dispositivo según la reivindicación 23, en el que dicho subsistema de detección comprende:

- una luz de iluminación o rayo láser y un fotodetector sensible de posición lineal para registrar el cambio en la característica mecánica sobre el sustrato
- un sistema de control electrónico;
- medios de barrido para el desplazamiento relativo de dicha luz o rayo láser con respecto al sustrato de manera que barran el sustrato con el rayo de luz siguiendo instrucciones del sistema de control electrónico.

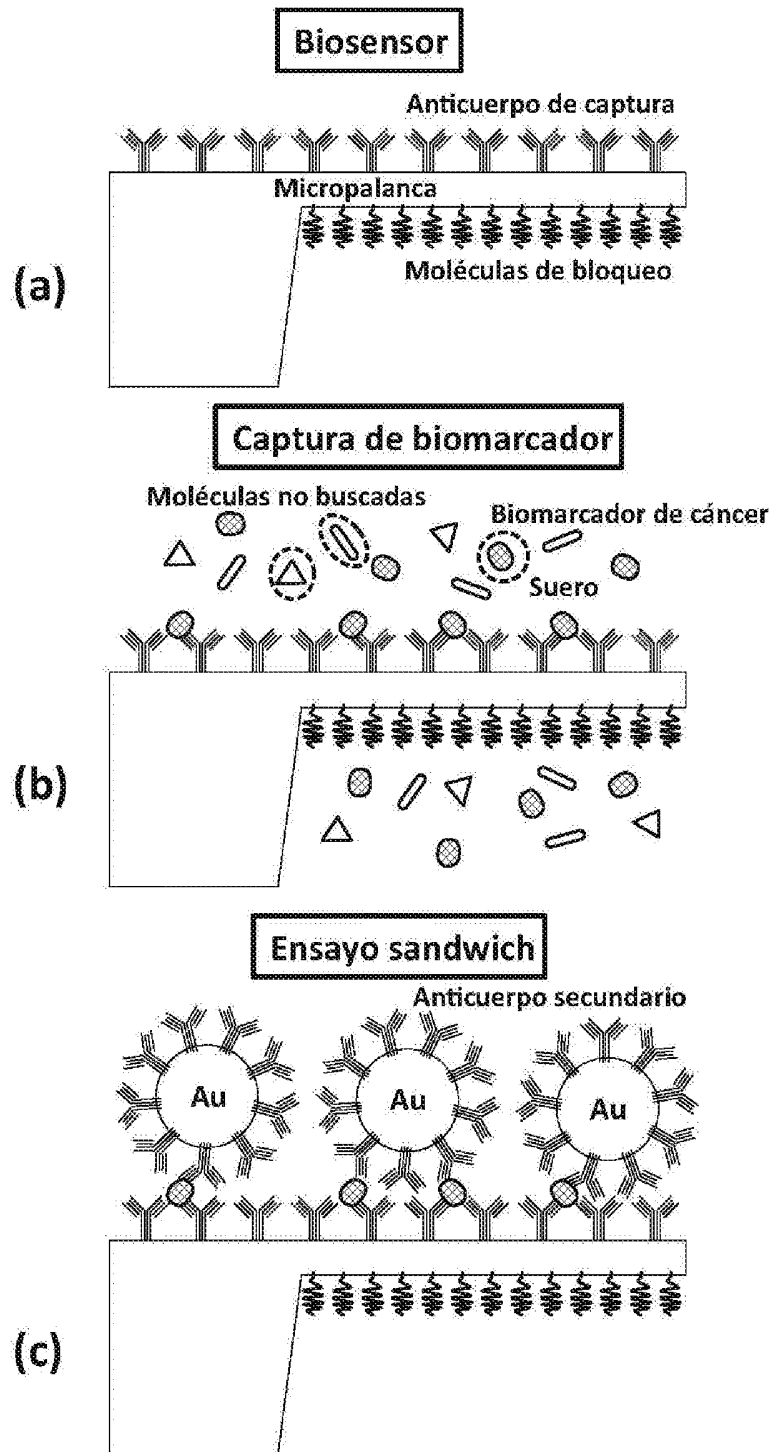


FIG. 1

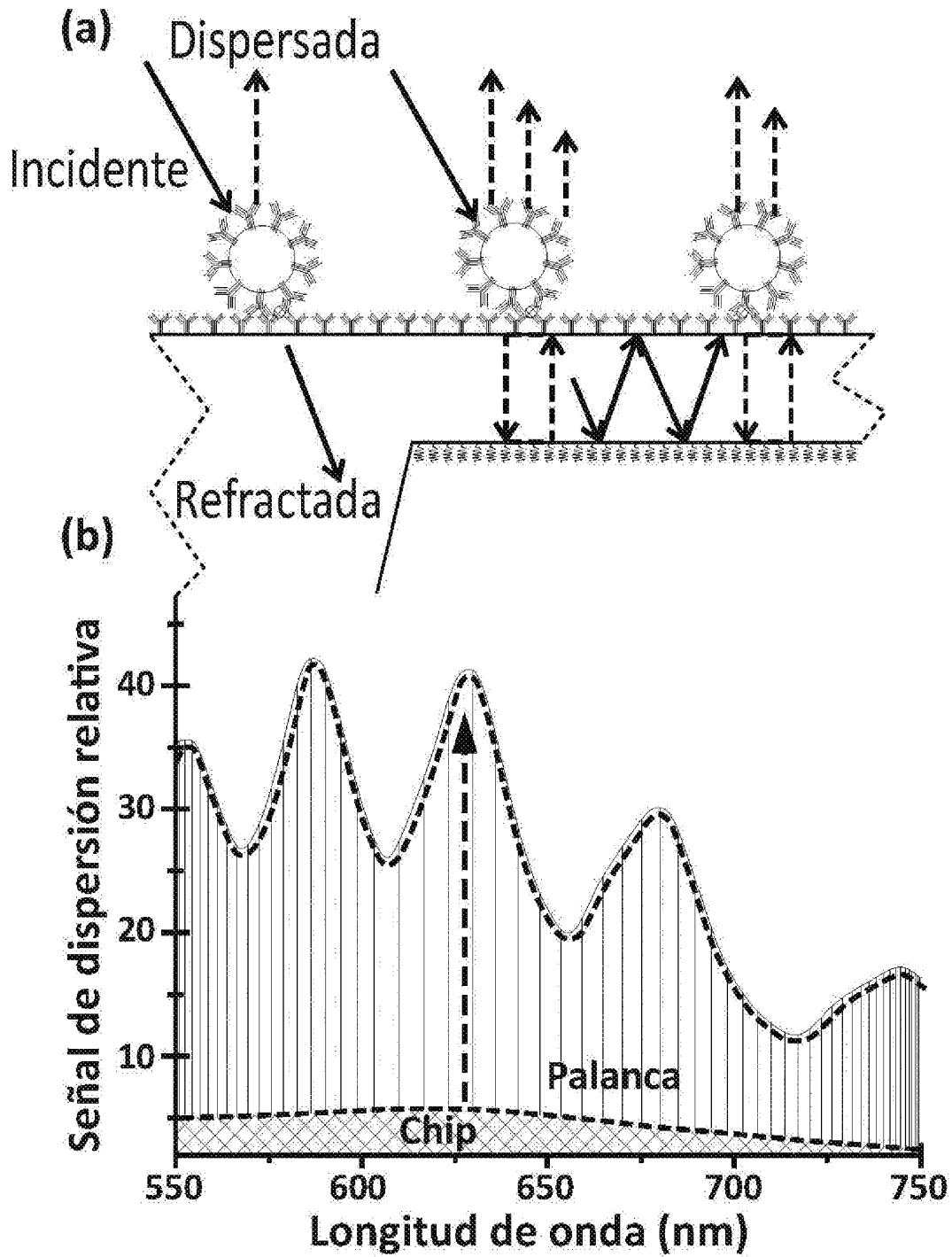


FIG. 2

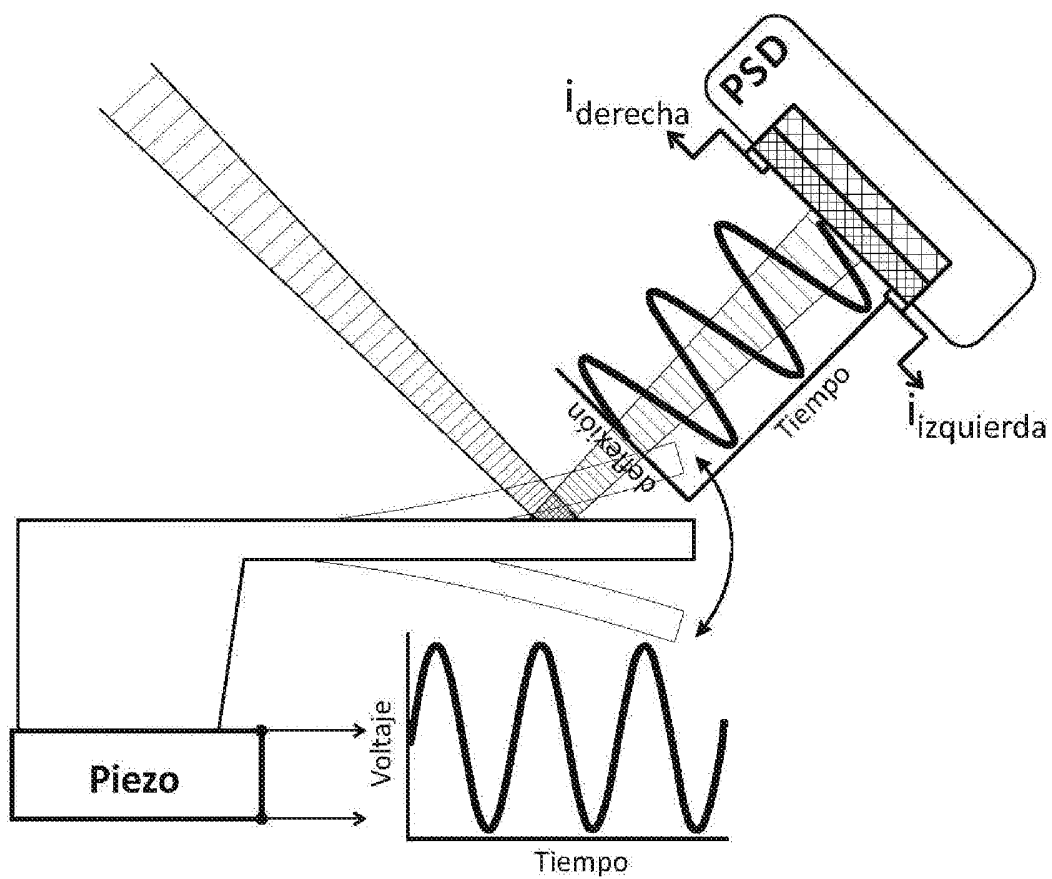


FIG. 3

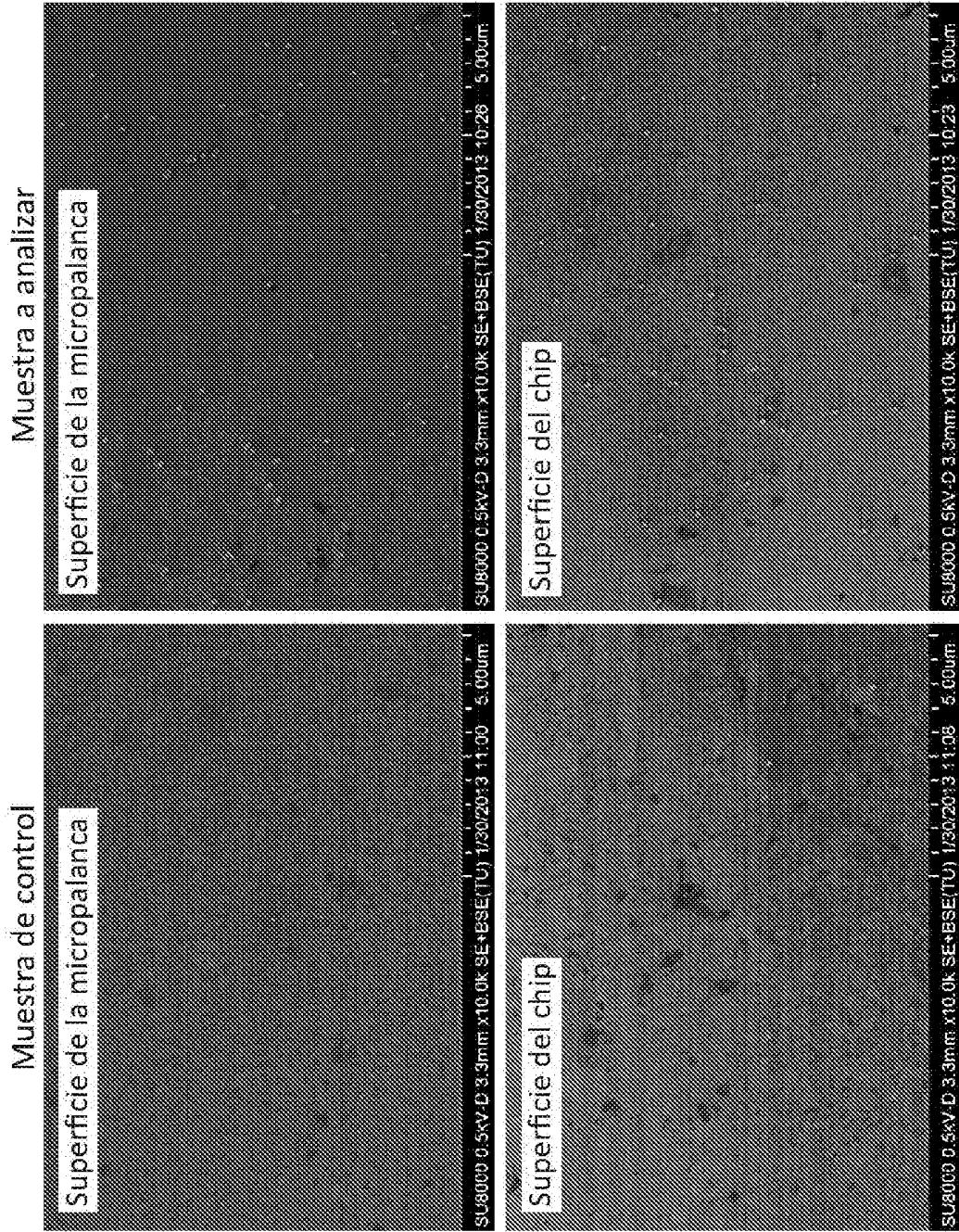


FIG. 4

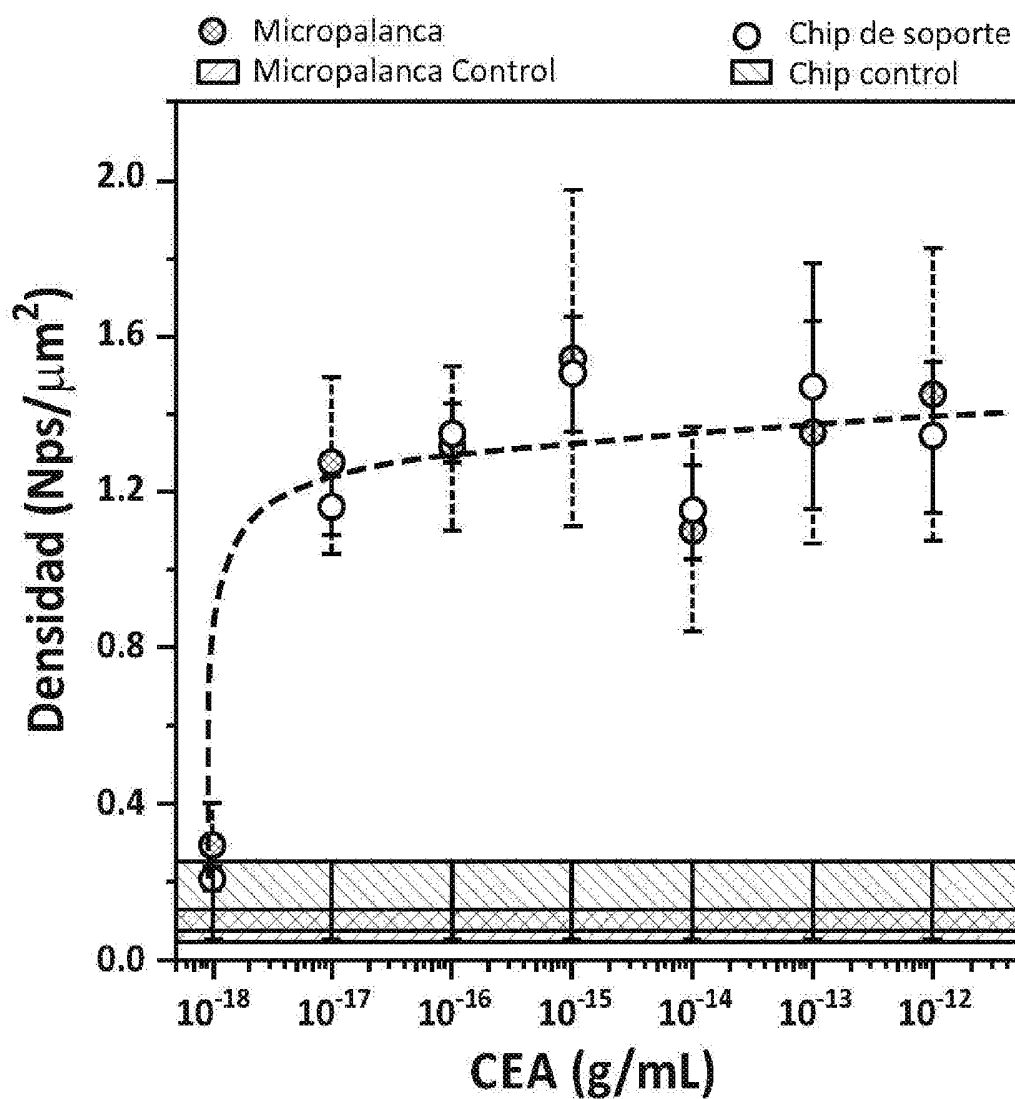


FIG. 5

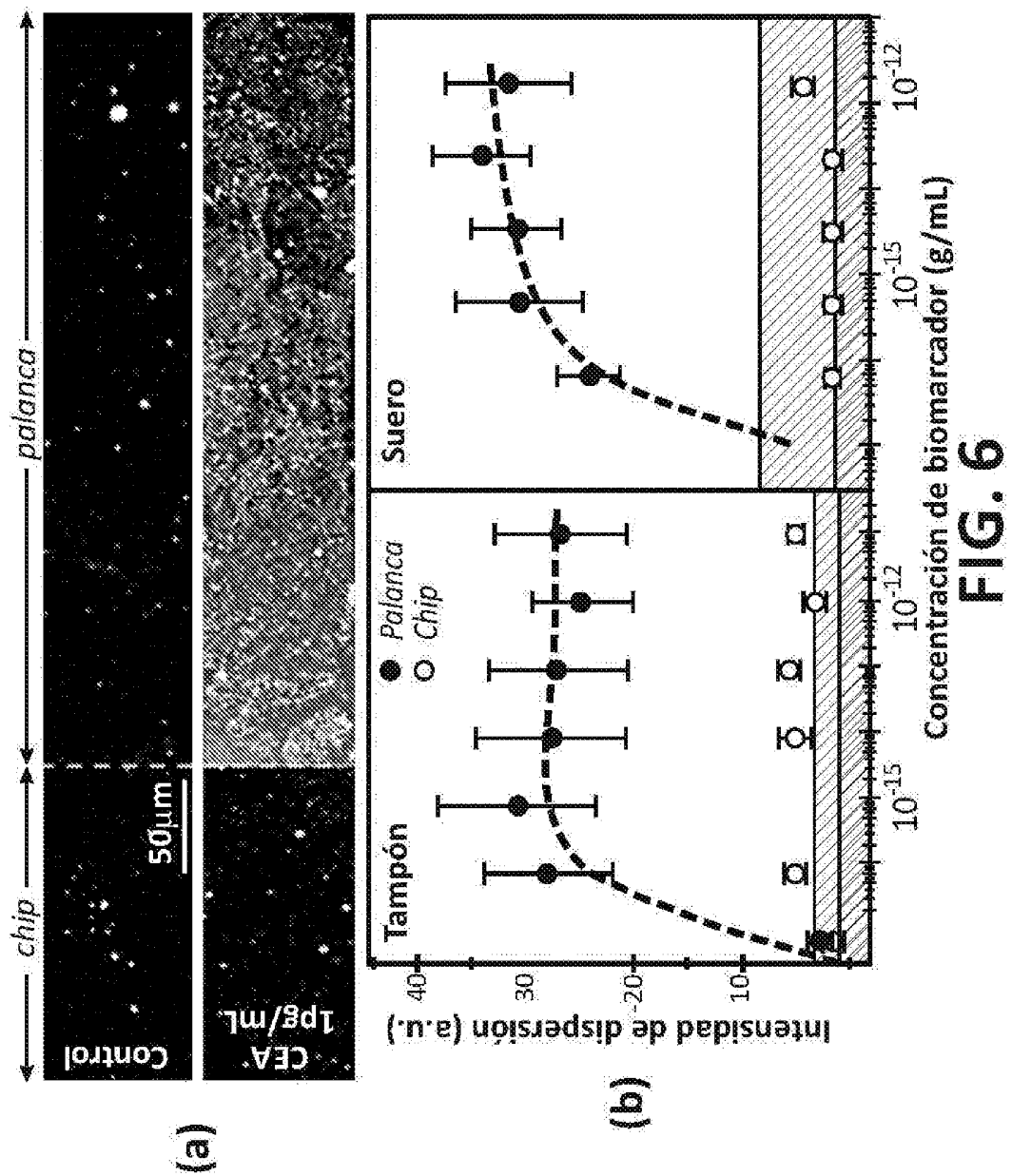


FIG. 6

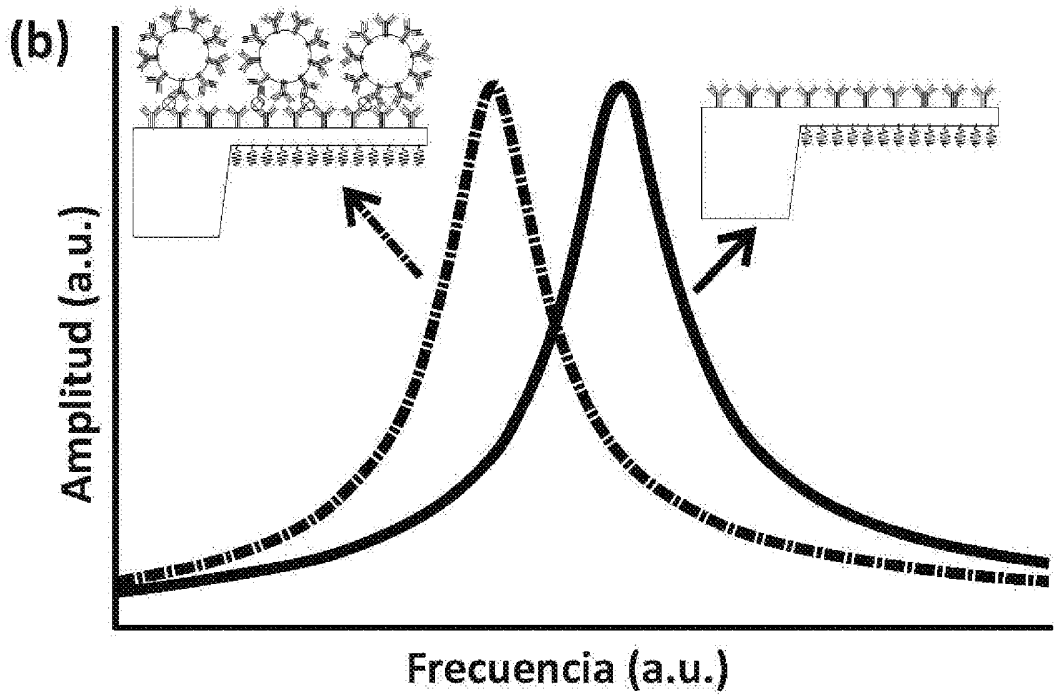
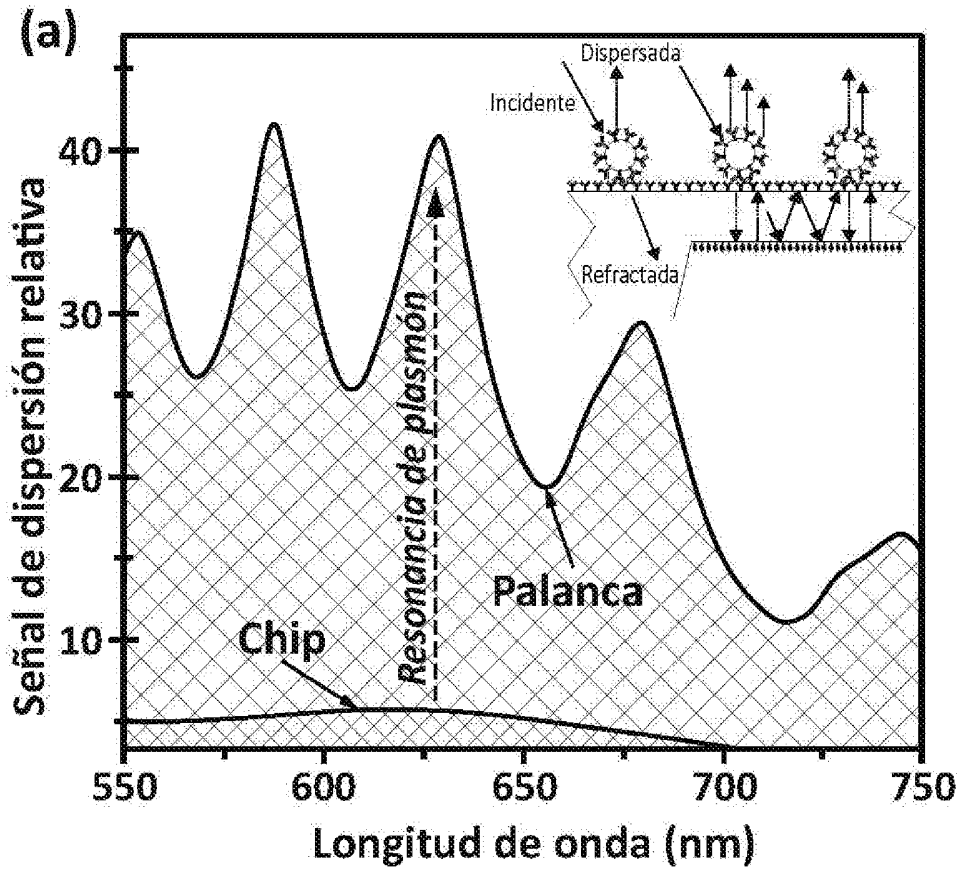


FIG. 7

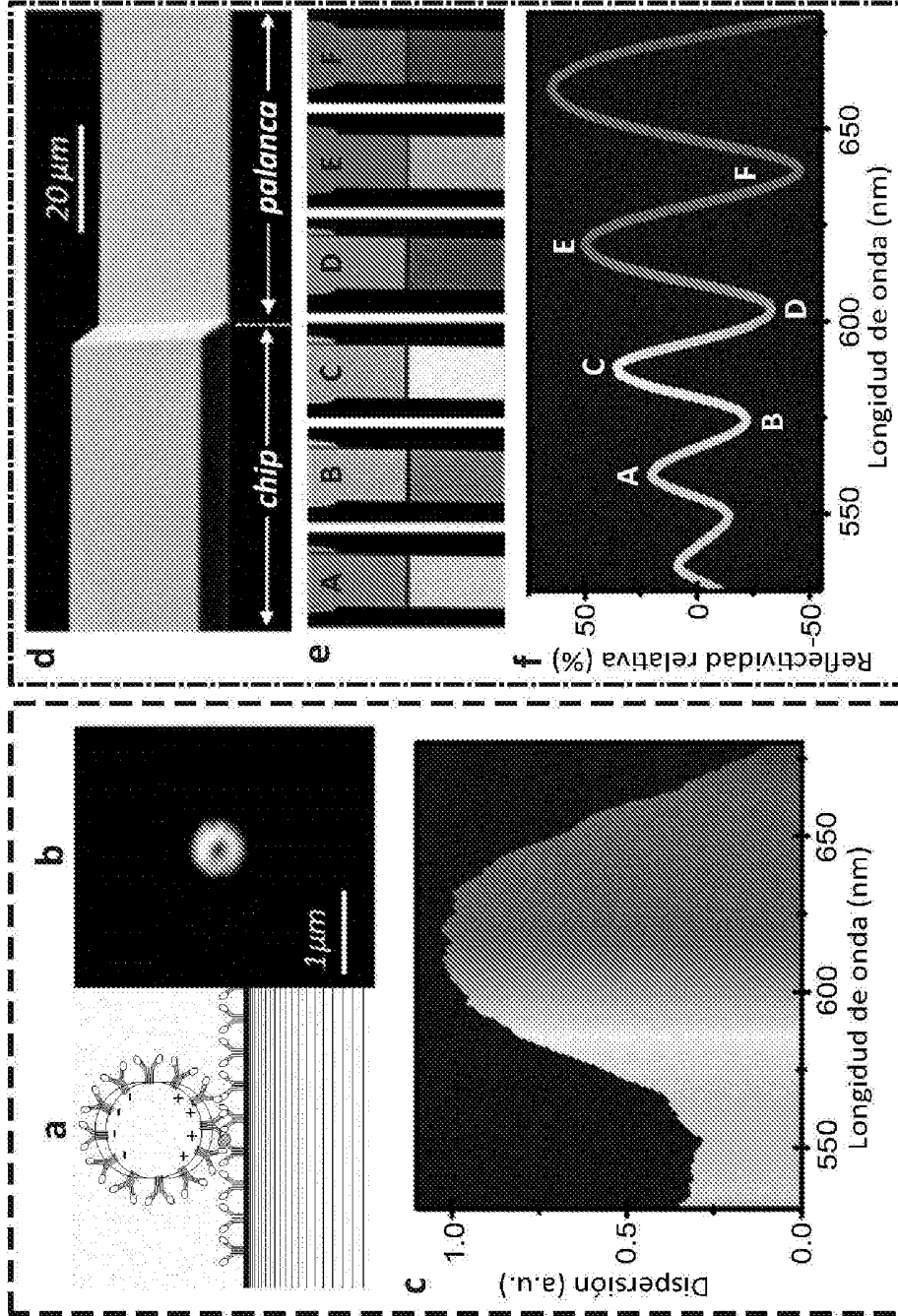


FIG. 8

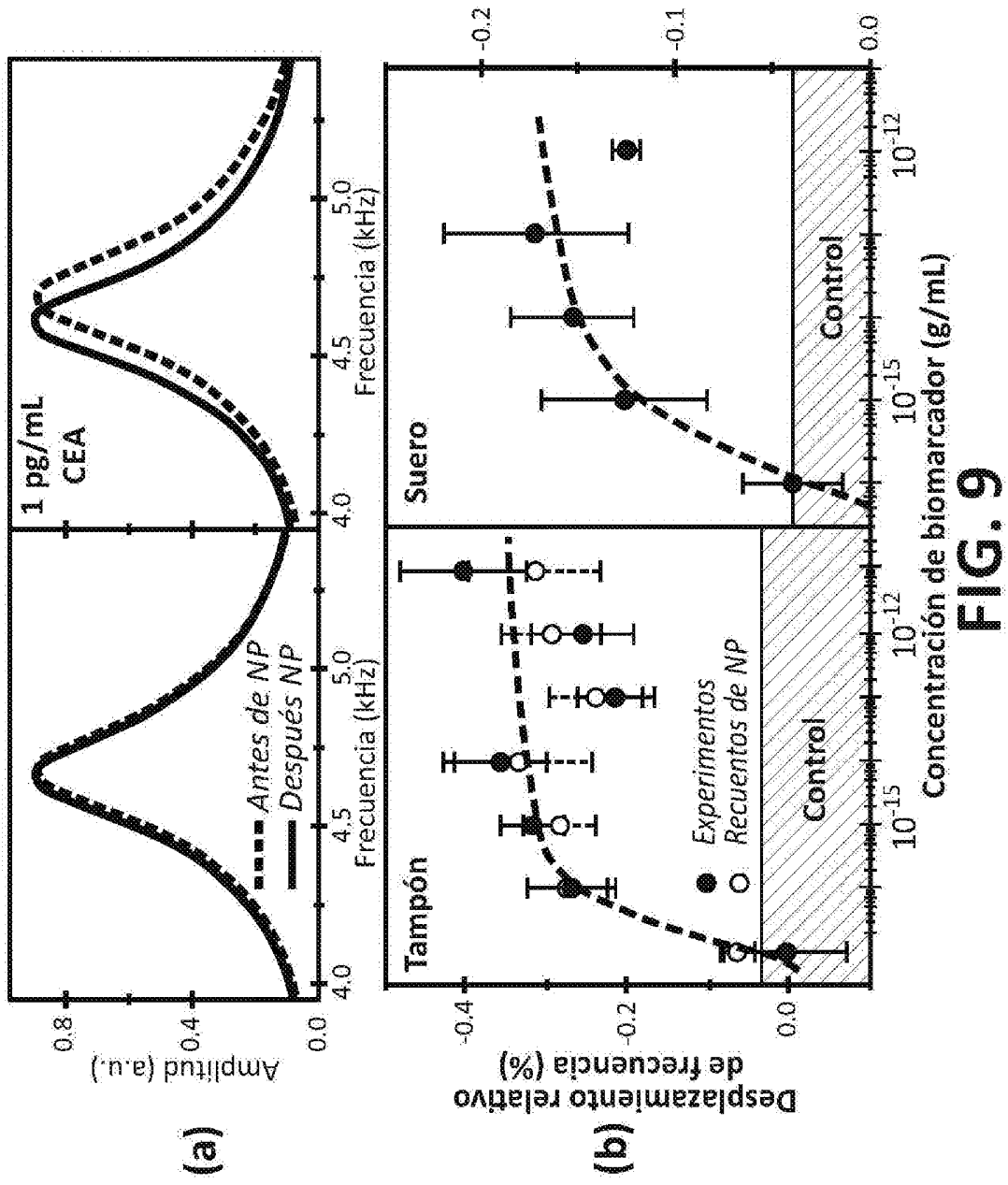


FIG. 9

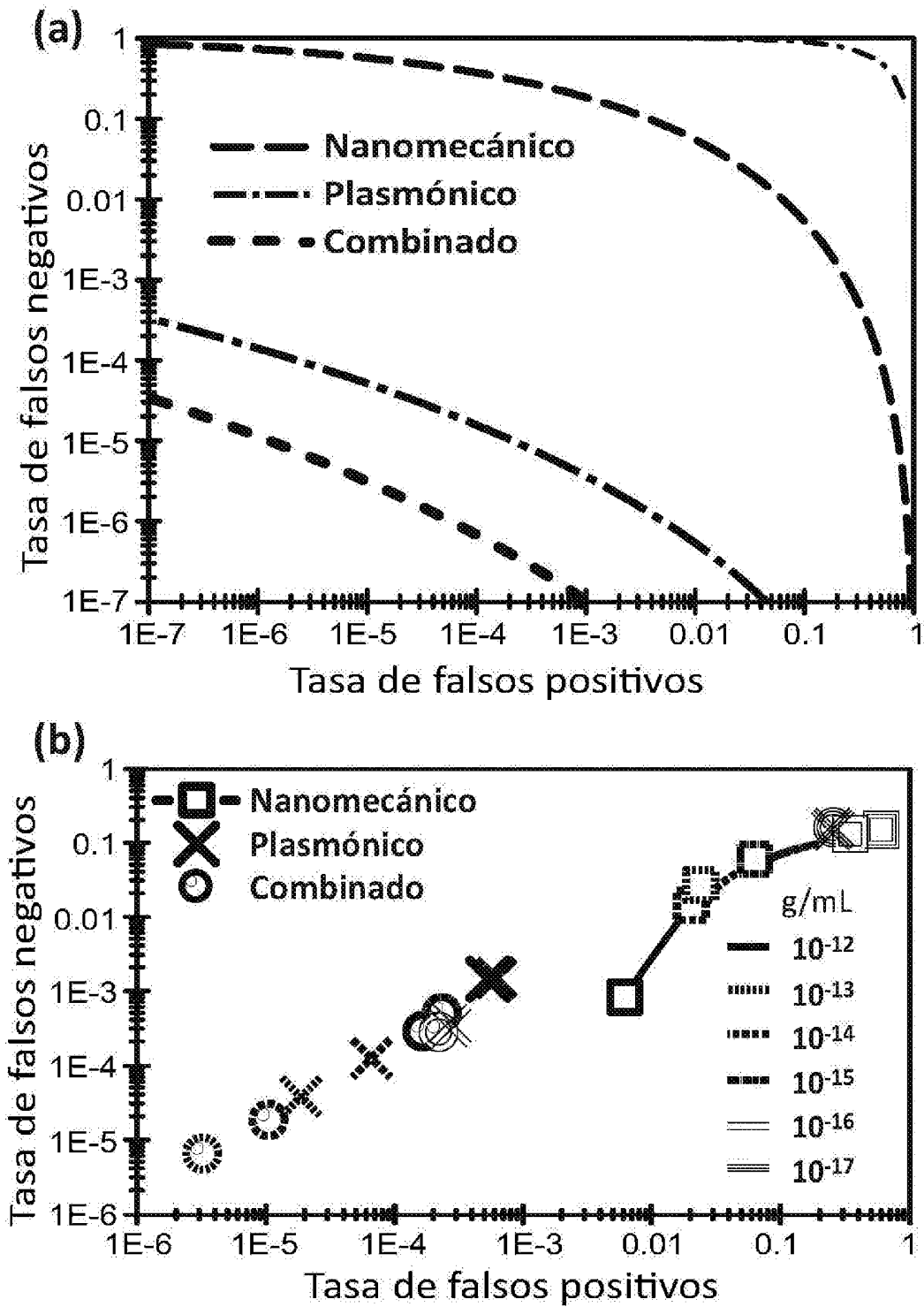
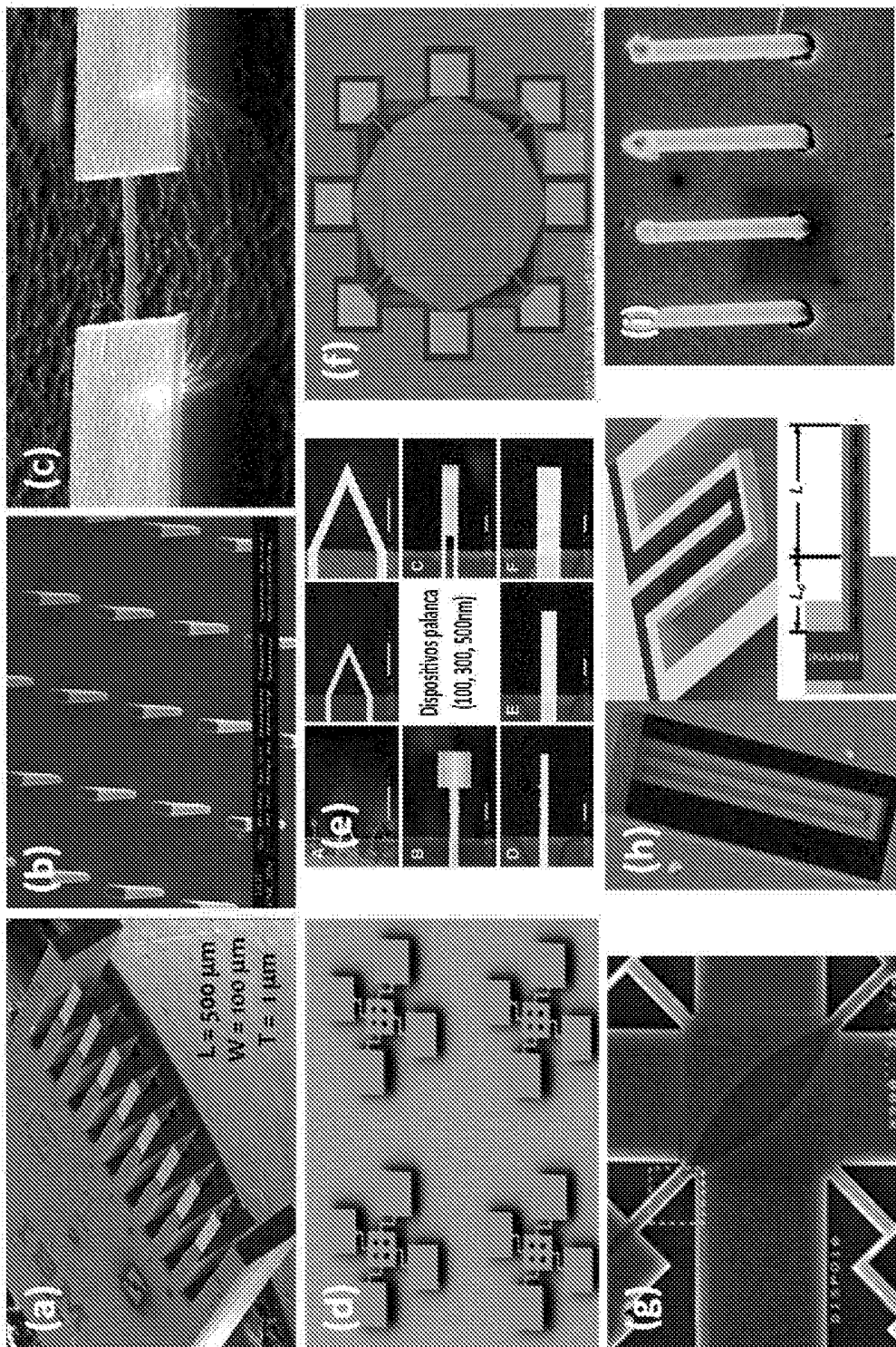


FIG. 10



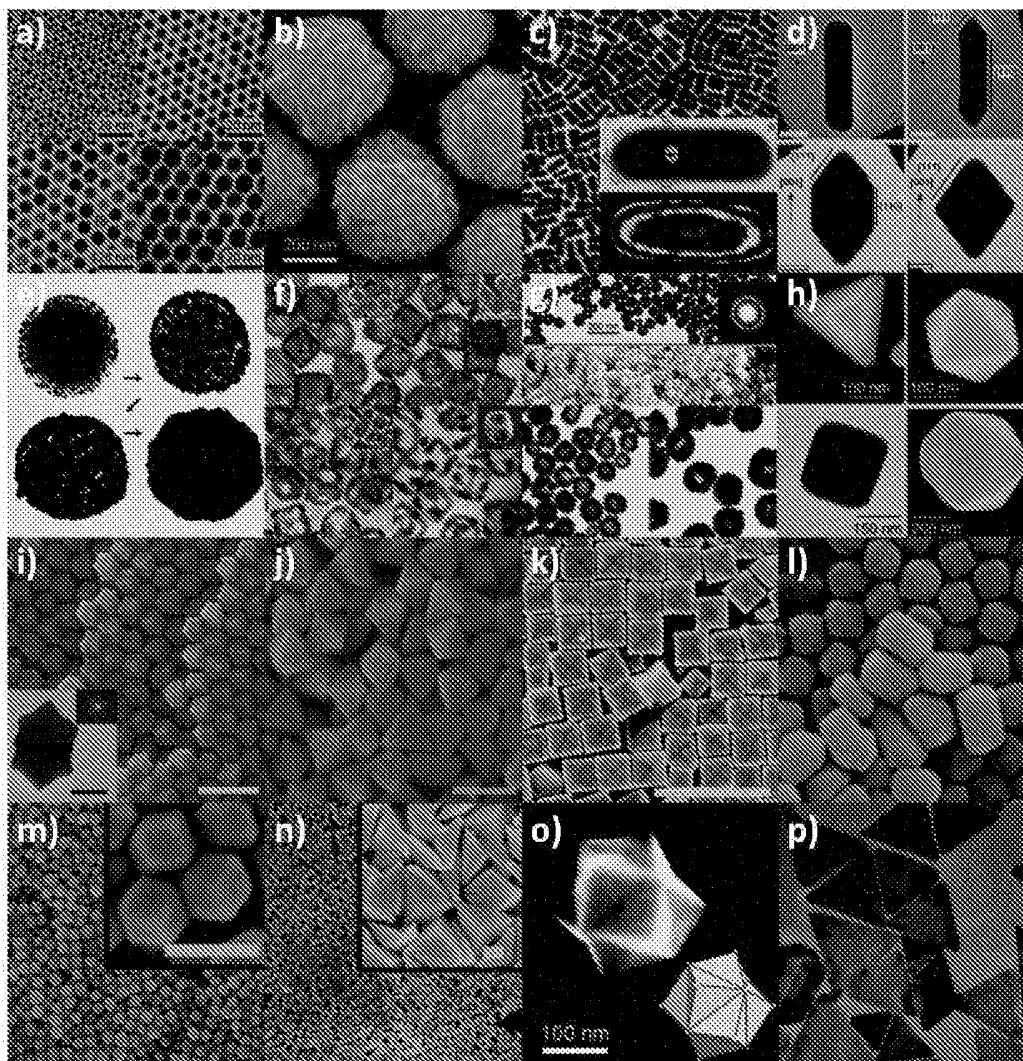


FIG. 12



21 N.º solicitud: 201430846

22 Fecha de presentación de la solicitud: 03.06.2014

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

5 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	O. V. GNEDENKO et al., "Highly sensitive detection of human cardiac myoglobin using a reverse sandwich immunoassay with a gold nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance biosensor", Analytica Chimica Acta, 2013, vol. 759, páginas 105-109	1-16
X	WO 2014/016465 A1 (UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA) 30-01-2014, páginas 2-5,14, ejemplos1-3, reivindicaciones 1-12	1-16
A	Y. BAI et al., "Aptamer/thrombin/aptamer-AuNPs sandwich enhanced surface plasmon resonance sensor for the detection of subnanomolar thrombin", Biosensors and Bioelectronics, 2013, vol. 47, páginas 265-270	1-24
A	J. MARTINEZ-PERDIGUERO et al., "Surface plasmon resonance immunoassay for the detection of the TNF α biomaker in human serum", Talanta, 2014 (accesible en línea 01-12-2013), vol. 119, páginas 492-497	1-24
A	J. TAMAYO et al., "Biosensors based on nanomechanical systems", Chemical Society reviews, 2013, vol. 42, páginas 1287-1311	1-24

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
20.10.2015

Examinador
E. Davila Muro

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N21/17 (2006.01)

G01N33/543 (2006.01)

B82Y15/00 (2011.01)

G01N21/29 (2006.01)

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

G01N, 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, XPESP, NLP, REGISTRY, CAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, COMPENDEX, BD-TXT, GOOGLE SCHOLAR

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 20.10.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-24	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 17-24	SI
	Reivindicaciones 1-16	NO

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	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	O. V. GNEDENKO et al., "Highly sensitive detection of human cardiac myoglobin using a reverse sandwich immunoassay with a gold nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance biosensor", <i>Analytica Chimica Acta</i> , 2013, vol. 759, páginas 105-109	
D02	WO 2014/016465 A1 (UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA)	30.01.2014
D03	Y. BAI et al., "Aptamer/thrombin/aptamer-AuNPs sandwich enhanced surface plasmon resonance sensor for the detection of subnanomolar thrombin", <i>Biosensors and Bioelectronics</i> , 2013, vol. 47, páginas 265-270	
D04	J. MARTINEZ-PERDIGUERO et al., "Surface plasmon resonance immunoassay for the detection of the TNF α biomaker in human serum", <i>Talanta</i> , 2014 (accesible en línea 01-12-2013), vol. 119, páginas 492-497	
D05	J. TAMAYO et al., "Biosensors based on nanomechanical systems", <i>Chemical Society reviews</i> , 2013, vol. 42, páginas 1287-1311	

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

El objeto de la invención es un sistema para aplicaciones de biodetección que comprende un sustrato de material dieléctrico con una superficie funcionalizada y una nanopartícula con propiedades plasmónicas. El sustrato dieléctrico está funcionalizado con un elemento de reconocimiento que puede unirse específicamente a un analito diana, y la nanopartícula también tiene un elemento de detección unido a ella que puede unirse al analito diana en una configuración tipo sándwich (reivindicaciones 1-8). Así mismo, la invención se refiere al biosensor que comprende el sistema de detección (reivindicaciones 9-10), al procedimiento para detectar y/o cuantificar un analito diana seleccionado en una muestra utilizando dicho sistema de detección (reivindicaciones 11-21) y, por último, al dispositivo que utiliza dicho sistema para detectar el efecto optoplasmónico potenciado de las nanopartículas (reivindicaciones 22-24).

El documento D01 divulga un sistema de detección altamente sensible de mioglobina cardíaca humana (cMb) en suero humano utilizando un biosensor reversible compuesto por un sustrato (chip CM3 Biacore) funcionalizado con un anticuerpo monoclonal anti-cMb (Mab1-CM3) inmovilizado covalentemente en su superficie y una nanopartícula de Au con propiedades de resonancia de plasmones superficiales también funcionalizada covalentemente con un segundo anticuerpo monoclonal anti-cMb (Mab2-AuNPs) en configuración tipo sándwich (ver Resumen, Apartados 2.2 a 2.5 y Figura 1). Este sistema de detección óptico altamente sensible se puede utilizar para el análisis cuantitativo de biomarcadores de proteínas en suero humano.

El documento D02 se refiere a un biosensor para la detección visual de un analito el cual comprende un soporte con una superficie termosensible y que está funcionalizado con una molécula de reconocimiento (biomolécula de captura), y una nanopartícula de Au, Ag o Cu que presenta banda de adsorción de plasmón superficial y que tiene unida una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección) capaz de reconocer el analito diana (ver página 2, línea 9-página 5, línea 30). Ambas moléculas de reconocimiento pueden ser péptidos, ácidos nucleicos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos y aptámeros (se mencionan estreptavidina, biotina, anticuerpos anti-CEA Ab3C6 y Ab3C1, ver Ejemplos 1-3). El soporte puede ser de membrana de celulosa o derivados, poliestireno, cerámica, silicio o vidrio (ver página 14, líneas 25-34). Las nanopartículas pueden ser nanopartículas de Au de tamaños entre 14-16nm, nanoprismas triangulares de Au de 100-160nm, nanoprismas triangulares de Ag de 70nm y nanocubos de Cu de 420nm (ver Ejemplo1). El sistema de reconocimiento es una estructura tipo sándwich entre la biomolécula de captura unida al soporte y la biomolécula de detección unida a la superficie de la nanopartícula (ver página 17, líneas 10-18).

La diferencia entre el objeto de la invención recogido en las reivindicaciones independientes 1,9 y 10 y lo divulgado en D01 y D02 radica en que en estos últimos no se especifican características del sustrato como el espesor o el coeficiente de extinción, o la relación entre el índice de refracción del sustrato y el material circundante.

Aunque no se ha encontrado divulgado en el estado de la técnica anterior un sistema de biodetección o un biosensor que tenga un sustrato dieléctrico de espesor, coeficiente de extinción e índices de transmitancia y reflectancia con los valores específicos que se recogen en las reivindicaciones 1 y 8, se considera que sería una mera variación estructural en el diseño de sistemas de biodetección basados en sustratos con una superficie funcionalizada combinados con nanopartículas con propiedades plasmónicas y también funcionalizadas, sobre todo teniendo en cuenta que los sistemas de detección divulgados en los documentos D01 y D02 tienen una configuración muy similar y permiten la biodetección de analitos específicos con elevada sensibilidad. Por lo tanto, se considera que el objeto de la invención recogido en las reivindicaciones 1-10 tiene novedad pero no actividad inventiva, a menos que el hecho de utilizar específicamente este sustrato con esas características técnicas tenga un efecto inesperado o sorprendente en el funcionamiento de dichos sistemas o suponga una ventaja técnica en cuanto a los valores de detección que proporcionan. Lo mismo puede aplicarse a la invención recogida en las reivindicaciones 11-16 relativas al procedimiento de detección de un analito utilizando un sistema de detección que comprende un biosensor como el definido en las reivindicaciones 1-10.

Consecuentemente, la invención recogida en las reivindicaciones 1-16 se considera que carece de actividad inventiva (Art. 8.1 LP/1986).

No se han encontrado descritos en el estado de la técnica procedimientos de detección y cuantificación de un analito en los que se utilice un biosensor como el definido en las reivindicaciones 1-10, de forma que se combine la detección del efecto optoplasmónico de las nanopartículas con el análisis de los cambios en las características mecánicas del sustrato tal como se define en las reivindicaciones 17-24. Tampoco existen indicios que lleven al experto en la materia a concebir el uso de un dispositivo para detectar un efecto optoplasmónico en una nanopartícula combinado con un efecto mecánico en el sustrato, ambos incorporados en un sistema de detección como el definido en las reivindicaciones 17-24.

Por lo tanto, el objeto de la invención recogido en las reivindicaciones 17-24 se considera nuevo y con actividad inventiva según los artículos 6.1y 8.1 LP/1986.