

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 794**

51 Int. Cl.:

G01N 21/552 (2014.01)

G01N 21/65 (2006.01)

G01N 21/77 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/553 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.06.2015 PCT/ES2015/070434**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2015 WO15185778**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2015 E 15742334 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018 EP 3153844**

54 Título: **Sistema para aplicaciones de biodetección**

30 Prioridad:

03.06.2014 ES 201430846

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

04.10.2018

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)
C/ Serrano 117
28006 Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**TAMAYO DE MIGUEL, FRANCISCO JAVIER;
MONTEIRO KOSAKA, PRISCILA;
PINI, VALERIO;
CALLEJA GOMÉZ, MONTSERRAT;
RUZ MARTINEZ, JOSE JAIME;
RAMOS VEGA, DANIEL y
GONZALEZ SAGARDOY, MARIA UJUE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 684 794 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sistema para aplicaciones de biodetección

Campo de la invención

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 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 invención**Biosensores**

15 Un biosensor mide los cambios físicos que experimenta una capa de reconocimiento biológico unida a un transductor sólido cuando interacciona con una muestra que contiene las moléculas diana. Por lo tanto, usa la capacidad de algunas biomoléculas (receptores) para unirse específicamente (reconocer) a biomoléculas complementarias (ligandos). Las interacciones más típicas son la 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.

20 Los biosensores ópticos pueden dividirse principalmente en detección basada en marcadores y detección sin marcadores. Los biosensores basados en marcadores más comúnmente usados se basan en detección basada en fluorescencia, las moléculas diana o bien las moléculas de biorreconocimiento se marcan con marcadores fluorescentes, tales como colorantes; la intensidad de la señal de fluorescencia indica la cantidad de moléculas diana. Mientras que la detección basada en fluorescencia es extremadamente sensible, y requiere procedimientos laboriosos de marcaje que pueden también interferir con la función de la biomolécula. A diferencia, en la detección sin marcadores, las moléculas diana no están marcadas o alteradas, y se detectan en sus formas naturales. Una parte significativa de los sensores ópticos sin marcador 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 de entre decenas a cientos de nanómetros⁴. El procedimiento de resonancia de plasmón superficial (SPR) y los procedimientos de resonancia de plasmón superficial localizados (LSPR) son los más populares entre los biosensores ópticos sin marcador.

35 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, glutamato, alcohol, hidroxibutirato, por nombrar algunos. Los avances en nanotecnología también están proporcionando biosensores eléctricos a nanoescala 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.

45 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 usando 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.

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

55 Por otra parte, dispositivos tales como los ensayos de flujo lateral son de suma importancia dado el corto tiempo de análisis necesario y se han miniaturizado y simplificado satisfactoriamente hasta el punto de que incluso es posible hacerlos en casa. Sin embargo, la menor concentración de analito que pueden detectar normalmente es de hasta 0,1 μM , que no es lo suficientemente buena para detectar muchas dianas de importancia biológica. En comparación, el ELISA requiere un tiempo de análisis mucho mayor (aproximadamente 1 h), pero ofrece mucha mejor sensibilidad de concentración (aproximadamente 1 pM).

Todavía se está en investigando la técnica de biodetección que pueda combinar excelente sensibilidad y especificidad con un 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 un gran tiempo de almacenamiento también son requisitos para obtener un producto comercialmente viable.

10 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, las nanopartículas de 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 el marcador de detección de muy bajas concentraciones de un analito de interés. En la referencia 22, tanto PSA como el antígeno p24 de la cápsida 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 marcaje de NP con diversas secuencias de ADN proporciona la capacidad de multiplexación que no tendrían las NP metálicas solas, ya que carecen de un intervalo de marcadores 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. 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 tal 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). Como alternativa, una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en los códigos de barras de oligonucleótidos puede reforzar la sensibilidad a 3 atomolar. Los ensayos convencionales clínicamente aceptados comparables tienen límites de sensibilidad de 3 picomolar, seis órdenes de magnitud sensibles que los que se observan 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 los marcadores 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 de patente 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, tal 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 los marcadores 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 al 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 nanoescala y altos factores de calidad (1000-100000) que implican mediciones al vacío. Sin embargo, la detección de biomoléculas debe llevarse a cabo idealmente en disoluciones acuosas, el ambiente 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 se arrastra junto con el resonador nanomecánico, aumenta su masa eficaz y así reduce la sensibilidad. La miniaturización de los dispositivos a nanoescala 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 nanoescala 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 desafiante. Estas limitaciones han limitado el éxito de los resonadores nanomecánicos como sensores biológicos.

Resonadores nanomecánicos con marcadores de masa

Los resonadores nanomecánicos han usado NP para amplificar la señal; en el presente documento, la unión a una masa mayor proporcionada por los marcadores aumenta la respuesta mecánica del sensor. En el presente documento, 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 marcadores; el marcaje mejora ampliamente la especificidad y puede reducir el límite de detección. Se ha demostrado que el marcaje de muestras para la detección nanomecánica es ventajoso en los ensayos de criterio de valoración. Craighead y col. demostraron en la referencia 31 que el marcaje de un anticuerpo monoclonal con nanopartículas en un inmunoensayo de tipo sándwich mejoró 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. Sin embargo, los resonadores nanomecánicos todavía no se usan ampliamente en la práctica 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 falsos positivos y falsos negativos ha recibido poca atención. La detección de marcadores de cáncer en medios complejos tales como suero requiere selectividad superior a 1 parte por millón.

Las predicciones teóricas indican que la selectividad requerida para la detección de biomarcadores en medios complejos se puede lograr 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 importante. Esto es 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 de forma importante tanto de la densidad superficial de anticuerpos como de las estrategias de bloqueo. Se descubrió 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 tipo 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, así como en seres humanos³⁴. La frecuencia de resonancia se detectó *ex-situ* en el 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 natural de los biosensores nanomecánicos sin marcador es implementar microfluidos para la purificación y preconcentración de muestras. El potencial de este enfoque se ha demostrado con nanosensores de nanoalambre sin marcador. En este trabajo, una microplaca de purificación microfluidica 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 ambiente complejo de la sangre completa, y reduce su sensibilidad requerida mínima preconcentrando eficazmente los biomarcadores. Los autores demostraron la detección cuantitativa y específica de dos antígenos del cáncer modelo de una muestra de 10 ml de sangre completa en menos de 20 minutos.

A pesar de que la nanotecnología haya proporcionado biosensores con niveles impredecibles de sensibilidad sin necesidad de marcaje, 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). Por lo tanto, 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:

- La especificidad, para discriminar trazas de biomarcadores en la compleja mezcla de proteínas de la sangre.
- La fiabilidad, para minimizar los angustiosos falsos positivos y falsos negativos en el diagnóstico de pacientes.

Actualmente, los autores de la presente invención han encontrado un sistema para aplicaciones de biodetección que permite límites de detección ultrabajos ya que discrimina concentraciones de alrededor 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 de tipo sándwich que se aprovecha de la sorprendente e inesperada mejora 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 falsos positivos y falsos negativos 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.

Descripción de la invención

Está previsto que las siguientes definiciones ayuden en el entendimiento e interpretación de la presente invención:
 Biosensor: Un 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, en combinación, 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.
- 5 Superficie funcionalizada o funcionalización superficial: Un procedimiento o técnica para introducir grupos químicos funcionales 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.
- 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.
- 10 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 permite la detección del analito diana cuando está presente en la muestra.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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 se secreta a 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 se puede detectar por varios procedimientos y es la base de muchos biosensores.
- 30 Receptor: Es una estructura biológica que puede detectar estímulos químicos de su entorno. Los receptores normalmente están presentes sobre la superficie de las 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.
- 35 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 una estructura principal 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.
- 40 Nanopartícula de metamaterial plasmónico: Es una nanopartícula hecha de un material artificial manipulado para manifestar propiedades plasmónicas.
- Transmitancia: La transmitancia es la parte de luz incidente (radiación electromagnética) a una longitud de onda especificada que pasa a través de una muestra.
- 45 Reflectancia: La reflectividad o reflectancia es la parte 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.
- 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 se volverá a disolver en forma líquida o se reconstituirá.

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 una relación fija entre sí, perpendiculares entre sí y perpendiculares a la dirección de propagación de energía y ondas.

- 5 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 incide sobre una superficie, la onda reflejada se concentra normalmente en la dirección especular como se ha determinado por las bien conocidas leyes de la reflexión. Además de la reflexión especular también hay un componente difuso que se irradia sobre un amplio intervalo de ángulos centrados sobre el haz especular que comúnmente se conoce como dispersión de la luz. Los procedimientos de dispersión se pueden producir 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 el material, normalmente los electrones de un átomo. Por lo tanto, la energía electromagnética se transforma en energía interna del absorbedor, por ejemplo, energía térmica.

- 15 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.

La invención se define en las reivindicaciones. Un primer objetivo de la invención es un sistema para aplicaciones de biodetección que comprende:

- 20 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 la misma y que puede unirse específicamente al analito diana en una disposición de tipo sándwich,

caracterizado porque:

- 25 - el sustrato de material dieléctrico tiene un espesor de 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.

- 30 El sistema de la invención es adecuado para procedimientos de detección y cuantificación de 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 efecto plasmónico mejorado que se puede lograr 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.

- 35 El sustrato debe 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 del mismo 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.

- 45 El primer punto clave 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 se refracta 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 mejora 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 retrodispersión, múltiples rutas ayudan a potenciar la dispersión mediante una única nanopartícula. Una ruta implica la amplificación de la dispersión directa por la nanopartícula mediante 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 las 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 adyacentes que llevan a una densidad aparente mayor de nanopartículas en, por ejemplo, una imagen de campo oscuro.

La importancia del espesor en la señal de dispersión se demuestra claramente mediante 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 la microplaca 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, significa que las superficies opuestas del sustrato son como espejos, permitiendo 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 se puede usar en principio 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 membrana, una placa, un puente, un tubo hueco o un nanoalambre (véase, por ejemplo, la Figura 11).

El analito diana es el elemento que se va a detectar 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, 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 tales como mitocondrias, vesículas celulares, etc.) o virus.

Una ventaja del sistema de la invención es que permite detectar y cuantificar analitos con muestras complejas, tales como, por ejemplo, muestras de sangre o de orina, sin la necesidad de 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 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 de ARN), una célula (células protozoicas, células bacterianas, célula fúngica, células eucariotas), un microorganismo o una parte del mismo (tal como paredes bacterianas, orgánulos celulares tales como mitocondrias, vesículas celulares etc.). En una realización preferente 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. La nanopartícula debe tener naturalmente propiedades plasmónicas. En principio se puede usar cualquier tipo de nanopartícula con propiedades plasmónicas. Por lo tanto, la nanopartícula puede ser, por ejemplo, una nanopartícula de oro, una nanopartícula de plata o una nanopartícula de metamaterial plasmónico tal como, pero sin limitación, nitruro de titanio y óxidos no estequiométricos tales como óxidos no estequiométricos de vanadio, titanio y aluminio.

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

La nanopartícula comprende al menos un elemento de detección unido a la misma que se puede unir de forma específica al analito diana. El elemento de detección puede ser cualquier tipo de elemento que pueda unirse al analito diana, por lo tanto, en principio su naturaleza puede ser la misma o similar a la del elemento de reconocimiento. Sin embargo, en una realización preferente, el elemento de detección se selecciona tanto 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 la misma si el analito diana está presente en la muestra analizada. En tal caso, el elemento de reconocimiento se puede unir al analito diana que después se detecta por el elemento de detección en una disposición de tipo sándwich. La ausencia del analito diana en la muestra da como resultado que el elemento de reconocimiento no se una al analito diana y, por lo tanto, 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 en la intensidad de extinción (dependiendo de los parámetros medidos) producida por las nanopartículas. Si el analito diana no está presente en la muestra, no habrá efecto plasmónico detectable sobre el sustrato ya que no estarán presentes las nanopartículas.

5 La detección y cuantificación se pueden hacer midiendo la intensidad de dispersión producida por las nanopartículas cuando el sistema se irradia con radiación electromagnética. Habría un efecto plasmónico detectable debido a la irradiación a cualquier longitud de onda del espectro de luz blanca como resultado de la amplificación de la señal proporcionada por el sustrato que cumple los parámetros de diseño.

10 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 está comprendido entre 0,01 y 1.

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

15 Las nanopartículas en el sistema de la invención se pueden ver a través de 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. En principio, el sistema de la invención se aplica a cualquier tipo de biosensor sobre el que se pueda disponer el sistema.

20 En una realización particularmente preferente, el sistema está dispuesto en un biosensor micro o nanomecánico de manera que las señales optomecanoplasmónicas se puedan detectar y analizar. Este tipo particular de biosensor dual permite una mayor fiabilidad, 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 la fiabilidad del ensayo.

25 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 las 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 fue de nuevo comparable, pero positivamente, la combinación de señales mecánicas y optoplasmónicas (señal optomecanoplasmónica) potenció significativamente la confianza del ensayo que conduce a una tasa de falsos positivos y falsos negativos extremadamente baja, de aproximadamente 2×10^{-4} a una concentración ultrabaja de 100 ag/ml del analito diana (Figura 10).

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

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

40 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

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 la misma y que se puede unir específicamente al analito diana, con el fin de detectar la presencia del analito diana unido al elemento de reconocimiento

45 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 amplificado 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.

50 El procedimiento de la invención se basa en el uso del sistema de detección de tipo sándwich de la invención tal como se ha descrito anteriormente.

55 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. Por lo tanto, después de un tiempo de incubación adecuado de manera que 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.

Tal como se ha descrito anteriormente, el material dieléctrico usado en el procedimiento puede ser cualquier material dieléctrico siempre que tenga un coeficiente de extinción 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 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 tal como se ha explicado anteriormente, el elemento de reconocimiento usado en el 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 de ARN), una célula (células protozoicas, células bacterianas, célula fúngica, células eucariotas), un microorganismo o una parte del mismo (tal como paredes bacterianas, orgánulos celulares tales como mitocondrias, vesículas celulares, etc.). En una realización preferente de la invención, el elemento de reconocimiento es un anticuerpo, más preferentemente un anticuerpo monoclonal.

La etapa b) del procedimiento de la invención comprende la etapa de detección. La nanopartícula que actúa de marcador para la detección y cuantificación está unida a un elemento de detección que se puede unir 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 mediante 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, por lo tanto, en principio su naturaleza puede ser la misma o similar a la del elemento de reconocimiento. Sin embargo, en una realización preferente, el elemento de detección tanto se selecciona de un anticuerpo como de una molécula de ácido nucleico.

También, tal como se explica anteriormente, el tipo de nanopartícula usada en el procedimiento de la invención puede ser cualquier nanopartícula que tenga propiedades plasmónicas. En este sentido, la nanopartícula puede ser una nanopartícula de oro, una nanopartícula de plata o una nanopartícula de metamaterial plasmónico. Con respecto a la forma, la nanopartícula puede adoptar cualquier estructura tal como nanoesferas, nanovarillas, nanovarillas puntiagudas, nanovainas, nanojaulas/marcos, nanoesferas huecas, tetraedros, octaedros, cubos, icosaedros, dodecaedros rómbicos, nanocubos cóncavos, tetrahexaedros, bipirámides triangulares obtusas, trisoctaedros 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 la ausencia 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. Tal 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 se puede hacer 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 se puede relacionar con una concentración de analito desconocida mediante comparación con una curva de calibración obtenida de muestras con concentraciones previamente conocidas de un analito.

El procedimiento de la invención se puede diseñar 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.

Como alternativa, si la medición se hace en transmitancia, entonces la intensidad de la señal de extinción se mide y el sustrato de material dieléctrico debe, por lo tanto, tener un índice de transmitancia comprendido entre 0,01 y 1.

El procedimiento de la presente invención permite límites de detección ultrabajos ya que discrimina concentraciones de alrededor 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 preferente, el procedimiento de la invención se realiza en un sistema micromecánico mediante el cual el sustrato de material dieléctrico se dispone como un elemento mecánico que puede experimentar 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 la ausencia del analito diana en la muestra,
- f) combinar los datos ópticos obtenidos en la etapa d) con los datos mecánicos de la etapa e) con el fin de mejorar la fiabilidad del procedimiento de detección.

Los inventores han descubierto que en esta realización particularmente preferente, aunque el procedimiento de la invención no mejora el límite de detección de manera significativa, 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 preferente conduce a una tasa muy baja de falsos positivos y falsos negativos. 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 experimentar un cambio en al menos una característica mecánica cuando el analito diana está presente en la muestra. Este cambio en una característica mecánica se puede medir 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 preferente, el sustrato está dispuesto para actuar de elemento mecánico en forma de una micropalanca.

Además, se puede medir un cambio de cualquier característica mecánica del elemento mecánico con el fin de detectar la presencia del analito diana en la muestra. El cambio de la característica mecánica detectado se puede seleccionar de, aunque sin limitación, 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;
- 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 se 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;

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:
 - o 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

- o un sistema de control electrónico;
- o medios de escaneo para escanear 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.

- 5 y
- 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 los dibujos

10 Figura 1: Representación esquemática del ensayo de tipo 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, se desarrollan las inmunorreacciones 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.

15 Figura 2: Detección plasmónica del biomarcador de proteína CEA sobre la microcavidad óptica de la palanca. (a) Diagramas 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 tipo sándwich en las regiones de la microplaca y de palanca para el ensayo de detección de CEA. La dispersión se normaliza a la de la microplaca de silicio. El acoplamiento entre los modos plasmónicos dipolares y los modos individuales de la microcavidad de la palanca lleva a un efecto doble, primero la dispersión asistida por plasmones se mejora mediante la cavidad de la palanca óptica por casi un orden de magnitud, y segundo, el espectro de plasmones de nanopartículas se individualiza mediante los modos de cavidad óptica de la palanca.

20 Figura 3: Diagramas 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 mediante 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.

25 Figura 4: Imágenes del microscopio electrónico de escaneo (MEB) de una región de la palanca que cumple el diseño que conduce al efecto plasmónico potenciado (superficie de la micropalanca) y microplaca que tiene dimensiones que no llevan al efecto plasmónico potenciado, tanto después del ensayo de tipo 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 de la microplaca muestran la misma cantidad promedio de nanopartículas.

30 Figura 5: Densidad de nanopartículas sobre las micropalanca y la microplaca en tampón medido con un microscopio electrónico de escaneo y usando un algoritmo basado en contraste de señales implementado en el programa informático Matlab.

35 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 como una cavidad óptica mientras que la dispersión en la región de prepinzamiento de la microplaca es baja, y no se puede usar para discriminar la presencia de CEA en la muestra. (b) Señal de dispersión media en la micropalanca y la microplaca 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 de la microplaca 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 la microplaca se representan como regiones discontinuas que representan la desviación estándar de los datos.

40 Figura 7: (a) Espectros de dispersión del efecto de las nanopartículas que se unen sobre la microplaca que tiene dimensiones que no llevan 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 una microplaca 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) Diagramas 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.

45 Figura 8: Resonancia de plasmones de nanopartículas y cavidad de la palanca óptica. (a) Las nanopartículas de oro usadas en el ensayo de tipo 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 tipo 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 microscopia electrónica de escaneo que muestra el límite entre la microplaca, de $6 \mu\text{m}$ de espesor, y la palanca, de $1 \mu\text{m}$ 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 que se produce interferencia destructiva. (e) Imágenes de campo brillante de las regiones de la palanca y de la microplaca 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 de la microplaca es insignificante. (f) Reflectividad relativa en la palanca con respecto a la microplaca.

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 durante un experimento de control y durante 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 $4,8 \pm 0,5 \text{ kHz}$ 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 solución 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 escaneo. 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 las mismas. (b) Tasa de falsos negativos frente a la tasa de falsos positivos 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 MEB de una palanca hueca y representación esquemática, (i) nanoalambre.

Descripción de una realización preferente de la invención

Como experimento de prueba conceptual para apoyar la invención se realizó un inmunoensayo de tipo sándwich para la detección de un biomarcador de cáncer. La detección del antígeno carcinoembrionario (CEA) se eligió como modelo. En primer lugar, 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 $500 \mu\text{m}$ de longitud, $100 \mu\text{m}$ de anchura y $1 \mu\text{m}$ 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 período de tiempo determinado y a una temperatura fija para permitir la unión del biomarcador 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); en este caso también se determinó el tiempo y la temperatura ideales para el segundo reconocimiento. Básicamente, se llevó a cabo un ensayo de tipo 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 las Figuras 7a y 7b).

Para estos experimentos, el protocolo detallado para la inmovilización del anticuerpo de captura, la detección del biomarcador y el ensayo de tipo sándwich se aplicaron 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 NanopartzTM. La muestra se almacenó en el frigorífico a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 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 ($3\text{H}_2\text{SO}_4:1 \text{ H}_2\text{O}_2$) (cabe destacar que 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 con 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 con agitación suave. Las muestras se aclararon bien 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 de suero bovino (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 Tween® 20 al 0,05 % (pH 5,5).

Reconocimiento de biomarcadores y ensayo de tipo sándwich

Las palancas se incubaron durante 1 hora a 37 °C en disoluciones de CEA con concentraciones que varían de 1 µg/ml a 1 ag/ml en solución de PBS con Tween® 20 al 0,05 % 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 concentraciones que varían 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 tipo 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 con 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 eficacia del reconocimiento de biomarcador puede estar afectada 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, el pH y el tiempo. Las estrategias para inmovilizar la capa de biorreceptor se deben optimizar 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 desarrolla 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 las condiciones experimentales para el reconocimiento de analitos tienen que personalizarse cada caso; pero el principio del procedimiento presentado en este caso, 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 de la microplaca y de la palanca se observaron después de la etapa de reconocimiento de CEA sobre la palanca y después del ensayo de tipo 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 conceptual se analizaron mediante microscopía electrónica de escaneo (MEB) tal como se ilustra en la Figura 4. Se tomaron al menos 100 imágenes de la palanca y de la microplaca para cada concentración de CEA detectada y ambas superficies presentaron la misma densidad de nanopartículas (Figura 5). La información obtenida de las imágenes de MEB se usará para apoyar los resultados descubiertos de las mediciones ópticas y mecánicas.

La Figura 6a muestra las imágenes de campo oscuro de la región de microplaca 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, se observa un aumento despreciable de la dispersión en la región de la microplaca; la región de la microplaca tiene dimensiones fuera de las reglas del diseño para el sustrato en la invención, no llevando así al efecto plasmónico potenciado, mientras que las nanopartículas unidas hacen que el área de la palanca brille, ya que la palanca cumple con el diseño que lleva 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 dispersión en la palanca es aproximadamente 6 veces la señal en la microplaca, 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 la microplaca se basa en la región obtenida en los experimentos de control para concentraciones de CEA de 0,1 fg/ml a 100 fg/ml. Sorprendentemente, la mejora inducida por la cavidad de la palanca de la señal de dispersión permite la discriminación de concentraciones de solo 0,1 fg/ml.

El aspecto brillante de la palanca está relacionado con su efecto como cavidad óptica, tal como se describe en la Figura 7a. Si la luz interacciona con una nanopartícula sobre la microplaca de la palanca (un soporte que no cumple las reglas de diseño del objetivo de la invención), la luz dispersa recogida se da solo mediante retrodispersión desde la superficie de separación entre el medio ambiental y el sustrato en bruto. Si la nanopartícula está sobre la palanca, además de la retrodispersión observada en la microplaca de soporte en bruto, múltiples rutas ayudan a potenciar la dispersión por una única nanopartícula que potencia espectacularmente la señal de retrodispersión medida. Una 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.

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 la microplaca 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 longitud de onda, que es 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 a la misma. La resonancia mecánica se midió por un instrumento con un procedimiento de deflexión de rayo láser tal como se representa en la Figura 3 para la lectura. La Figura 9a muestra el pico de frecuencia de 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 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 soluciones en suero (derecha). Los desplazamientos 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.

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 cambio del

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 cambiar continuamente el umbral de decisión con respecto al intervalo complejo de resultados observados. Éste es un gráfico de la tasa de verdaderos positivos (o sensibilidad) en el eje y y la tasa de verdaderos negativos (especificidad 1) en el eje x. La tasa de verdaderos positivos (TPR) es la probabilidad de que un caso de enfermedad se clasifique correctamente y la tasa de verdaderos negativos (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 falsos negativos (detecciones perdidas) frente a la tasa de falsos positivos (falsas alarmas) 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. Por lo tanto, como resultado de 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).
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).
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).
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).
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).
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).
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).
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).
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)
25. Dong y col., Two types of nanoparticle-based bio-barcode amplification assays to detect HIV-1 p24 antigen, *Virology Journal* 9, 180 (2012)
- 5 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)
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)
- 10 28. T. Andrew Taton, Chad A. Mirkin, Robert L. Letsinger, Scanometric DNA Array Detection with Nanoparticle Probes, *Science* 289, 1757-1760 (2000)
29. Robert Jenison, Shao Yang, Ayla Haeberli, Barry Polisky, Interference-based detection of nucleic acid targets on optically coated silicon, *Nature Biotechnology* 19, 62 - 65 (2001)
- 15 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)
31. Waggoner, P. S., Varshney, M. & Craighead, H. G. Detection of prostate specific antigen with nanomechanical resonators. *Lab Chip* 9, 3095-3099 (2009).
- 20 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, 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).
- 25 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*. 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. 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 se puede unir específicamente a un analito diana y
 - 5 b. al menos una nanopartícula con propiedades plasmónicas que comprende al menos un elemento de detección unido a la misma y que se puede unir específicamente al analito diana en una disposición de tipo sándwich, en el que
 - el sustrato de material dieléctrico tiene un espesor entre 0,1 μm y 5 μm y un coeficiente de extinción inferior a 0,3,
 - 10 - la nanopartícula tiene al menos una de sus dimensiones con un tamaño de 2 nm a 300 nm y
 - la proporción entre el índice de refracción del material dieléctrico y el material circundante es superior a 1,1, y que comprende un
 - sistema de detección adaptado para realizar una detección optoplasmónica de un efecto plasmónico potenciado.
- 15 2. Sistema según la reivindicación 1, en el que el material dieléctrico se selecciona de cuarzo, silicio, nitruro de silicio, carburo de silicio, grafeno, polímeros e hidrogeles.
3. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el sustrato está 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
 20 palanca hueca o un nanoalambre.
4. 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.
5. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el elemento de detección se selecciona de un
 25 anticuerpo o una molécula de ácido nucleico.
6. Sistema según las reivindicaciones 1 a 5, en el que la nanopartícula es una nanopartícula de oro, una nanopartícula de plata o una nanopartícula de metamaterial plasmónico.
7. Sistema según las reivindicaciones 1 a 5, en el que la nanopartícula tiene una estructura seleccionada del grupo
 30 de nanoesferas, nanovarillas, nanovarillas puntiagudas, nanovainas, nanojaulas/marcos, nanoesferas huecas, tetraedros, octaedros, cubos, icosaedros, dodecaedros rómbicos, nanocubos cóncavos, tetrahexaedros, bipirámides triangulares obtusas, trisohectaedros y nanoprismas.
8. 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. Biosensor que comprende un sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 35 10. 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:
 - a) poner en contacto una muestra con un sustrato de material dieléctrico que tiene una superficie funcionalizada
 40 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
 - b) añadir al sustrato resultante de a) al menos una nanopartícula con propiedades plasmónicas y que tiene al
 45 menos una de sus dimensiones con un tamaño de 2 nm a 300 nm, que comprende al menos un elemento de detección unido a la misma y que puede unirse específicamente al analito diana, con el fin de detectar la presencia del analito diana unido al elemento de reconocimiento
 - c) irradiar el sustrato resultante de b) con una radiación electromagnética en el que la presencia del analito
 50 diana en la muestra produce un efecto plasmónico en las nanopartículas amplificado por la presencia del sustrato que puede detectarse por medios ópticos,
 - d) medir la dispersión de la luz o la 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 mediante una detección optoplasmónica del efecto plasmónico potenciado.
12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que el material dieléctrico se selecciona de cuarzo, silicio, nitruro de silicio, carburo de silicio, polímeros, hidrogeles o grafeno.

13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, en el que el elemento de reconocimiento se selecciona de un anticuerpo, un receptor, un péptido, un hidrato de carbono, un ácido nucleico, una célula y un microorganismo o una parte del mismo.
- 5 14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que el elemento de detección se selecciona de un anticuerpo o una molécula de ácido nucleico.
15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que la nanopartícula es una nanopartícula de oro, una nanopartícula de plata o una nanopartícula de metamaterial plasmónico.
- 10 16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en el que la nanopartícula tiene una estructura seleccionada del grupo de nanoesferas, nanovarillas, nanovarillas puntiagudas, nanojaulas/marcos, nanoesferas huecas, tetraedros, octaedros, cubos, icosaedros, dodecaedros rómbicos, nanocubos cóncavos, tetrahexaedros, bipirámides triangulares obtusas, trisoctaedros y nanoprismas.
17. 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. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, en el que:
- 15
- el sustrato de material dieléctrico tiene un índice de reflectancia comprendido entre 0,01 y 1 cuando se mide la señal de intensidad de dispersión o
 - el sustrato de material dieléctrico tiene un índice de transmitancia comprendido entre 0,01 y 1 cuando se mide la señal de intensidad de extinción.
- 20 19. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 18, en el que el procedimiento se realiza en un sistema microelectromecánico por el cual el sustrato de material dieléctrico se dispone 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 en el que se realizan las siguientes etapas adicionales:
- 25
- 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,
 - f) combinar los datos ópticos obtenidos en la etapa d) con los datos mecánicos de la etapa e) con el fin de mejorar la fiabilidad del procedimiento de detección.
- 30 20. 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.
- 35 21. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 19-20, en el que la al menos una característica mecánica se puede seleccionar 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 parte del elemento mecánico o los cambios de disipación del elemento mecánico.
22. Dispositivo para inspección superficial dispuesto para detectar un efecto optoplasmónico en al menos una nanopartícula de un sistema según la reivindicación 1, comprendiendo dicho dispositivo:
- 40
- 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 desde o se transmite a través del sustrato para producir al menos una primera señal de salida en respuesta a la dispersión y/o extinción de dicha radiación electromagnética;
 - un sistema de control electrónico;
- 45 23. 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 la primera y segunda señales de salida del primer y segundo detectores sensibles.
- 50 24. 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 escaneo para escanear el desplazamiento relativo de dicha luz o rayo láser con respecto al sustrato de manera que escaneen el sustrato con el rayo de luz siguiendo instrucciones del sistema de control electrónico.

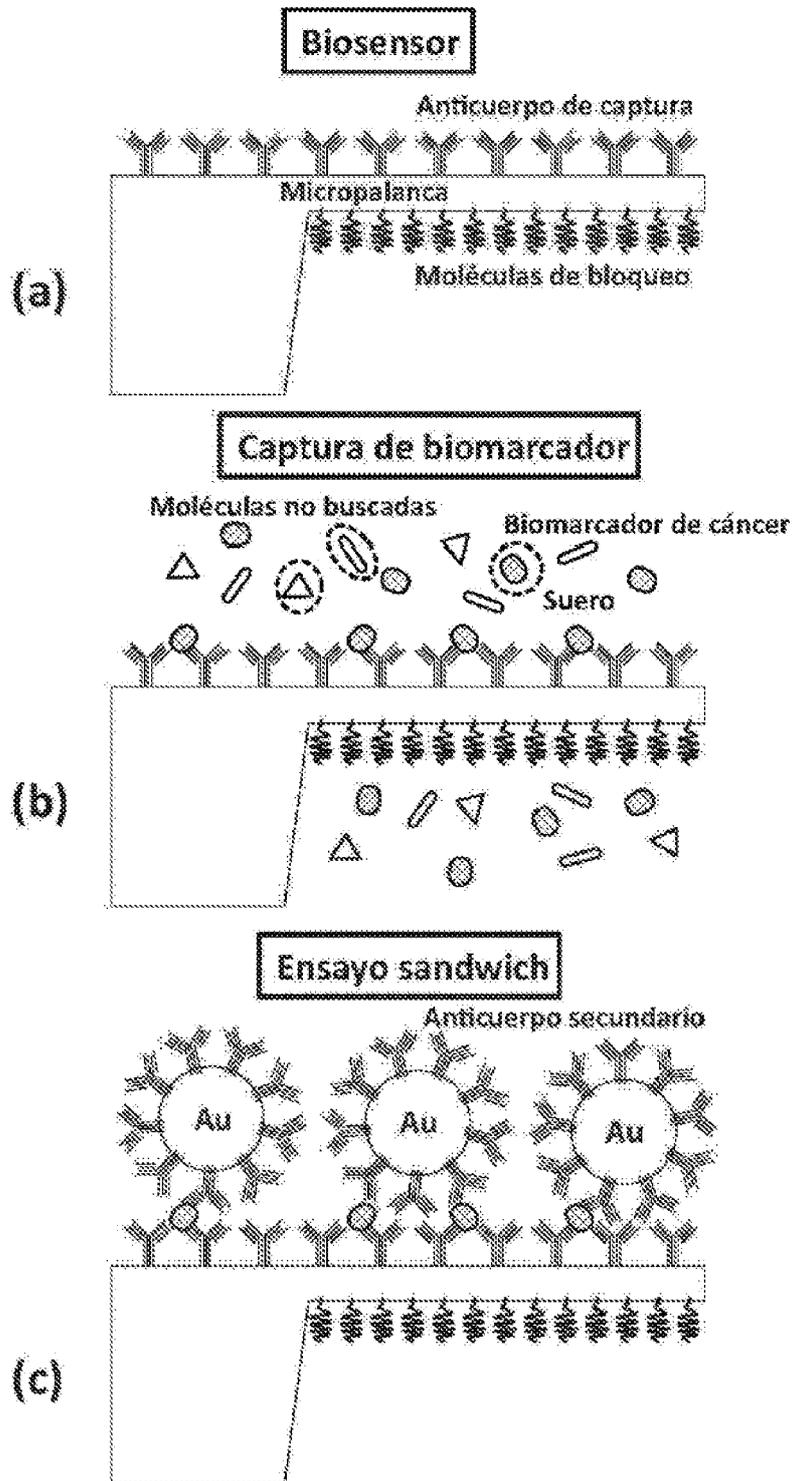


FIG. 1

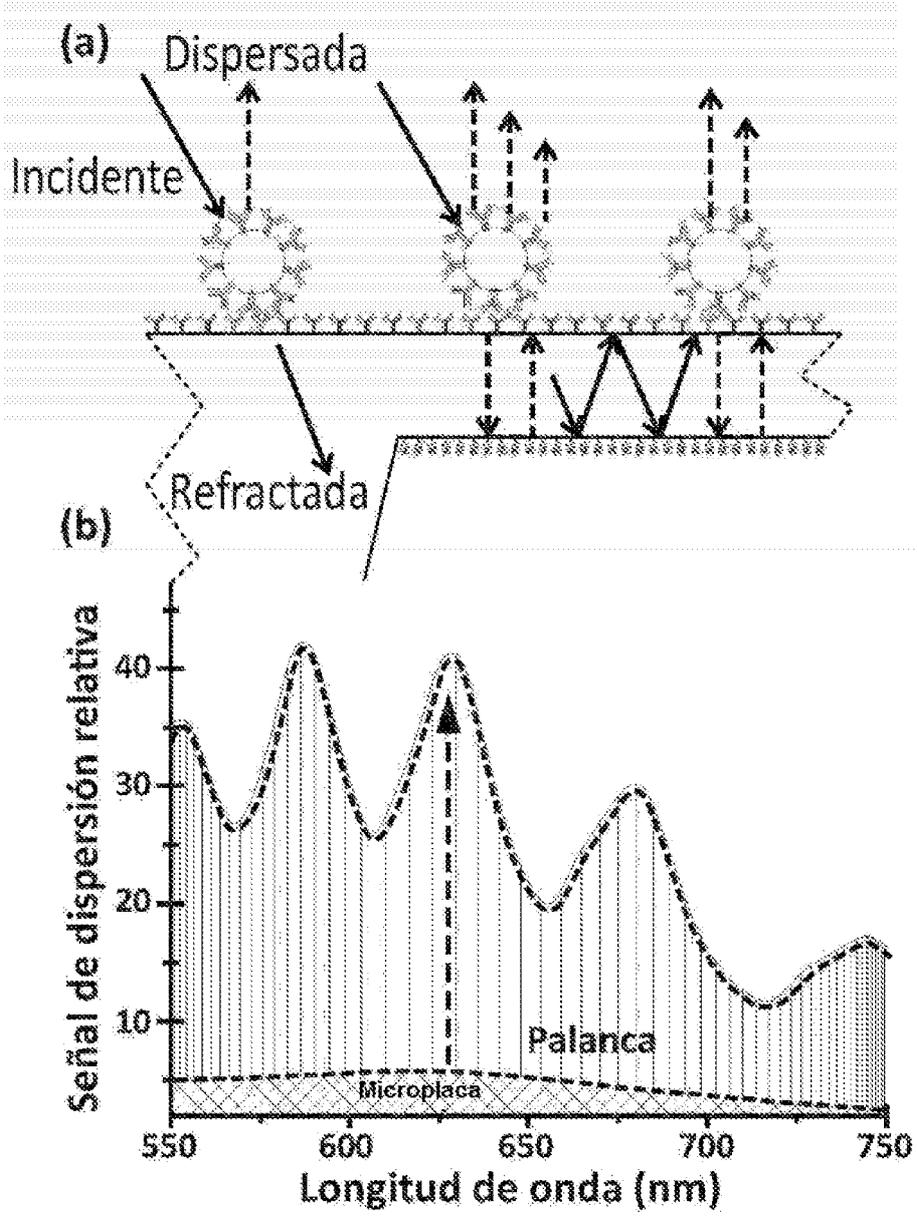


FIG. 2

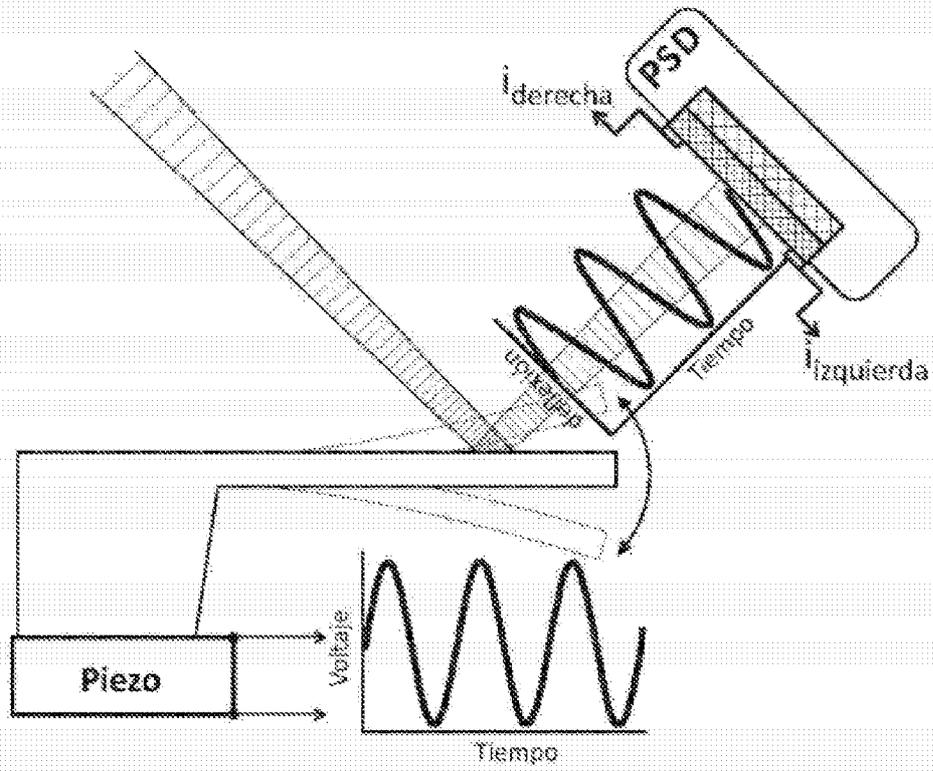
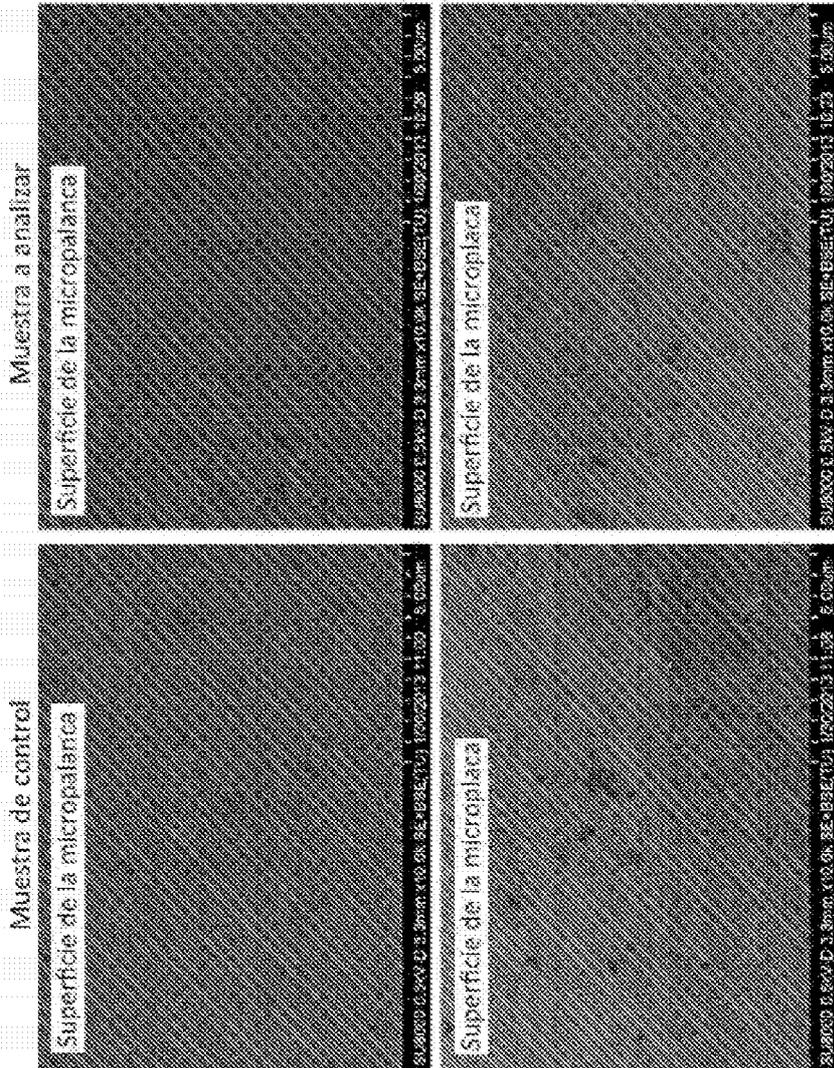


FIG. 3



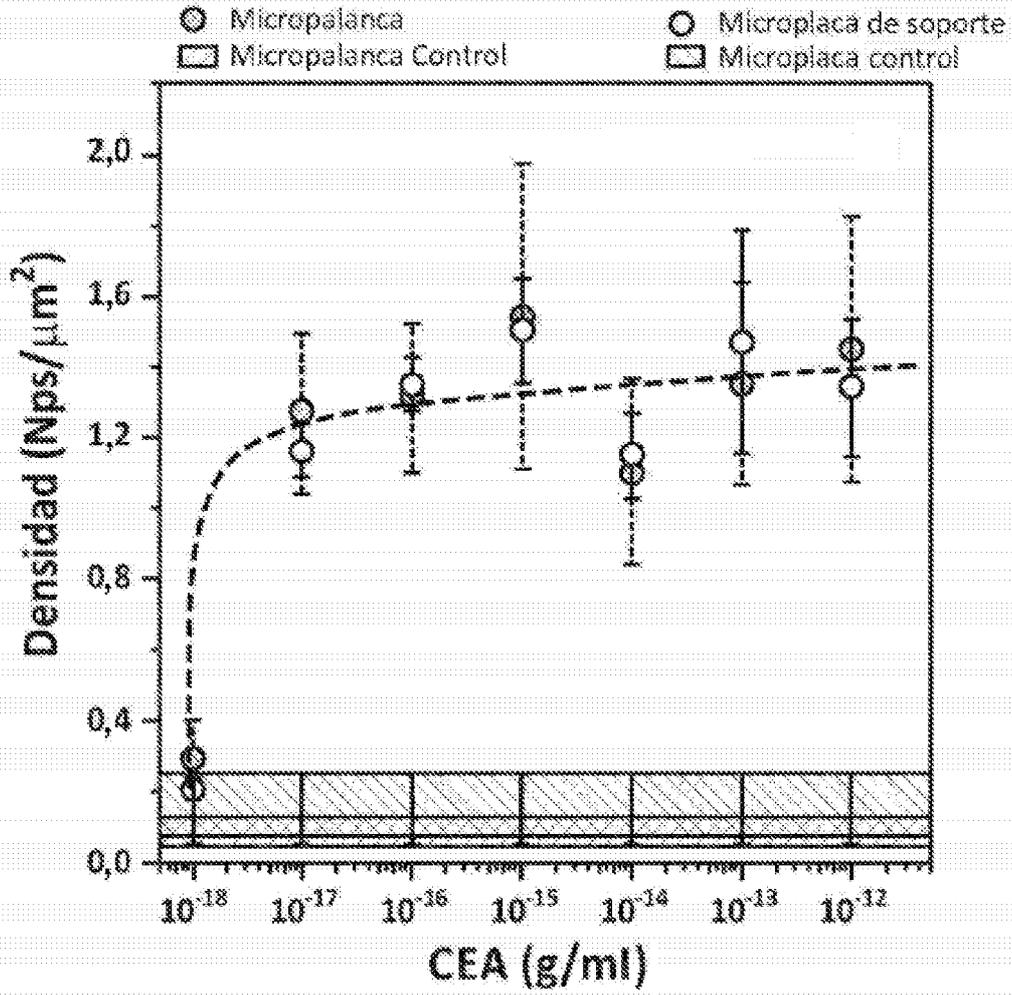


FIG. 5

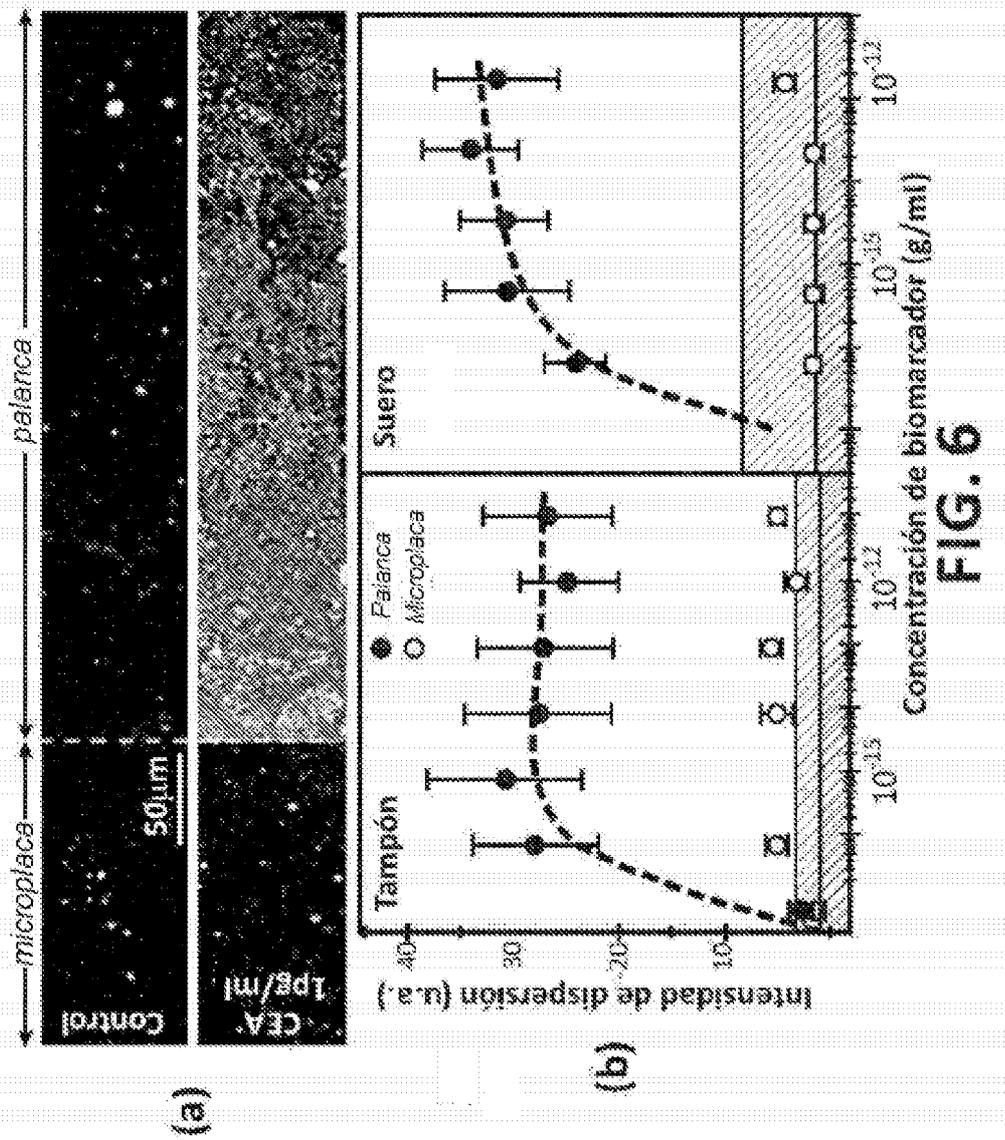


FIG. 6

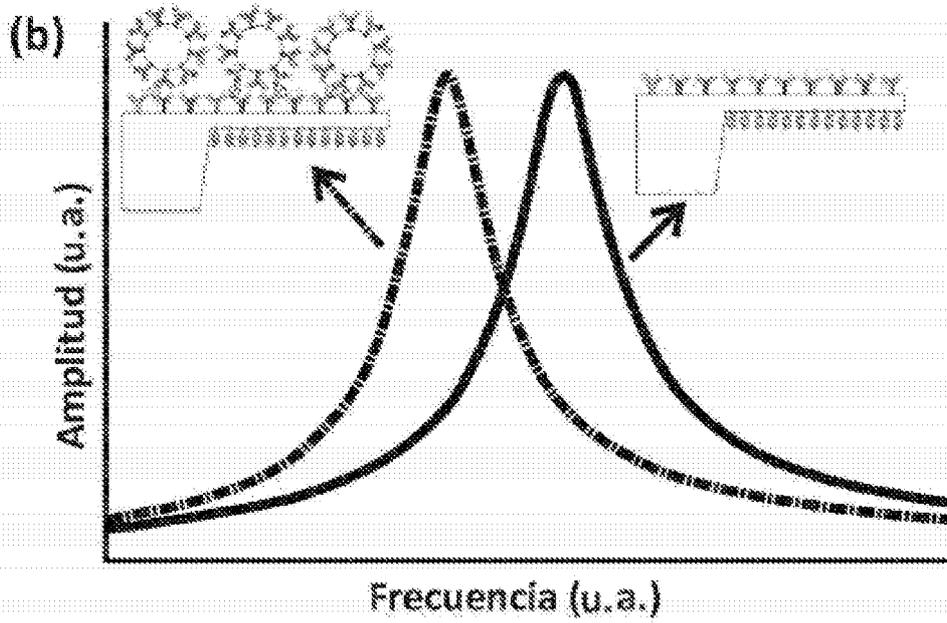
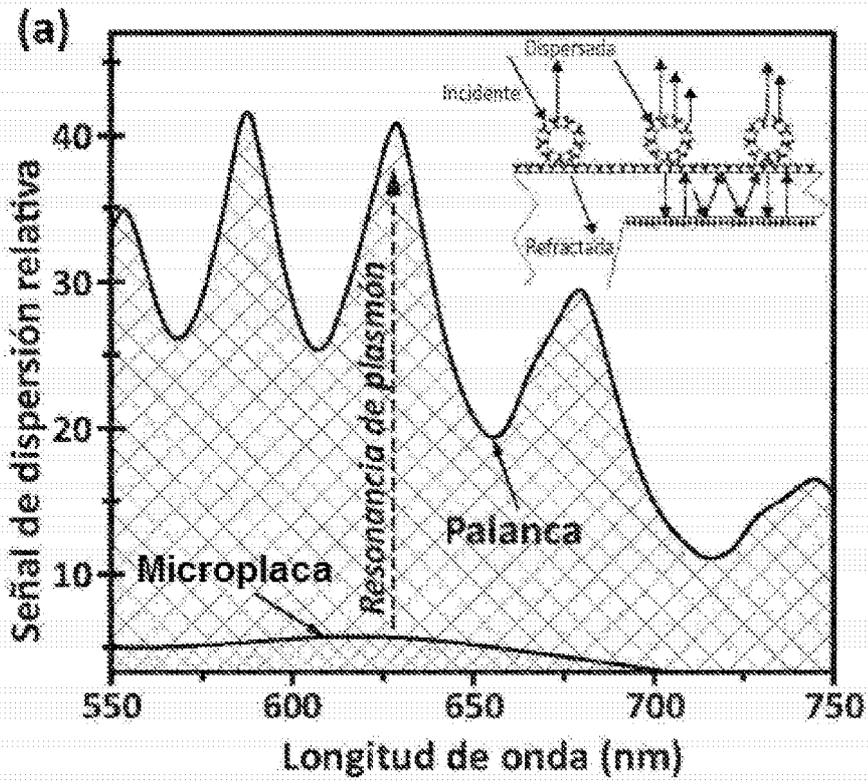


FIG. 7

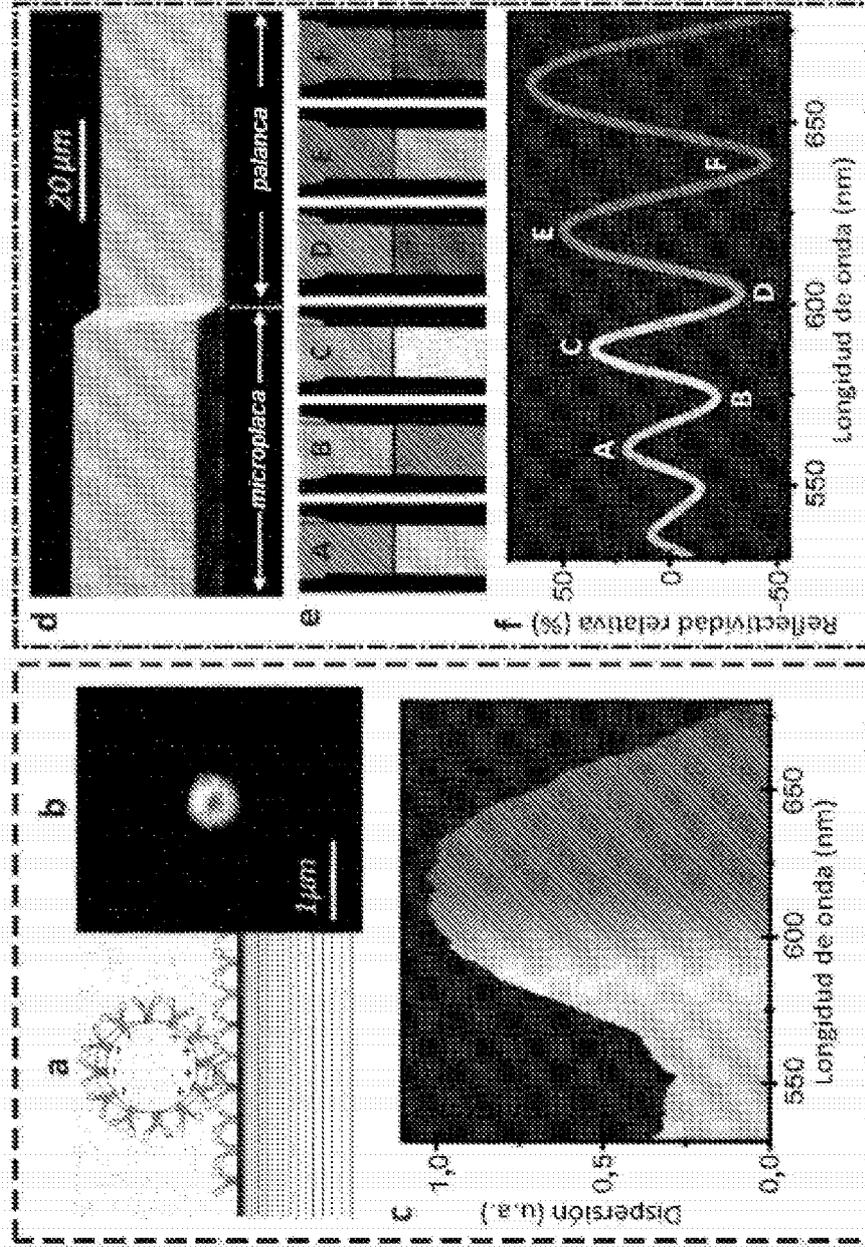


FIG. 8

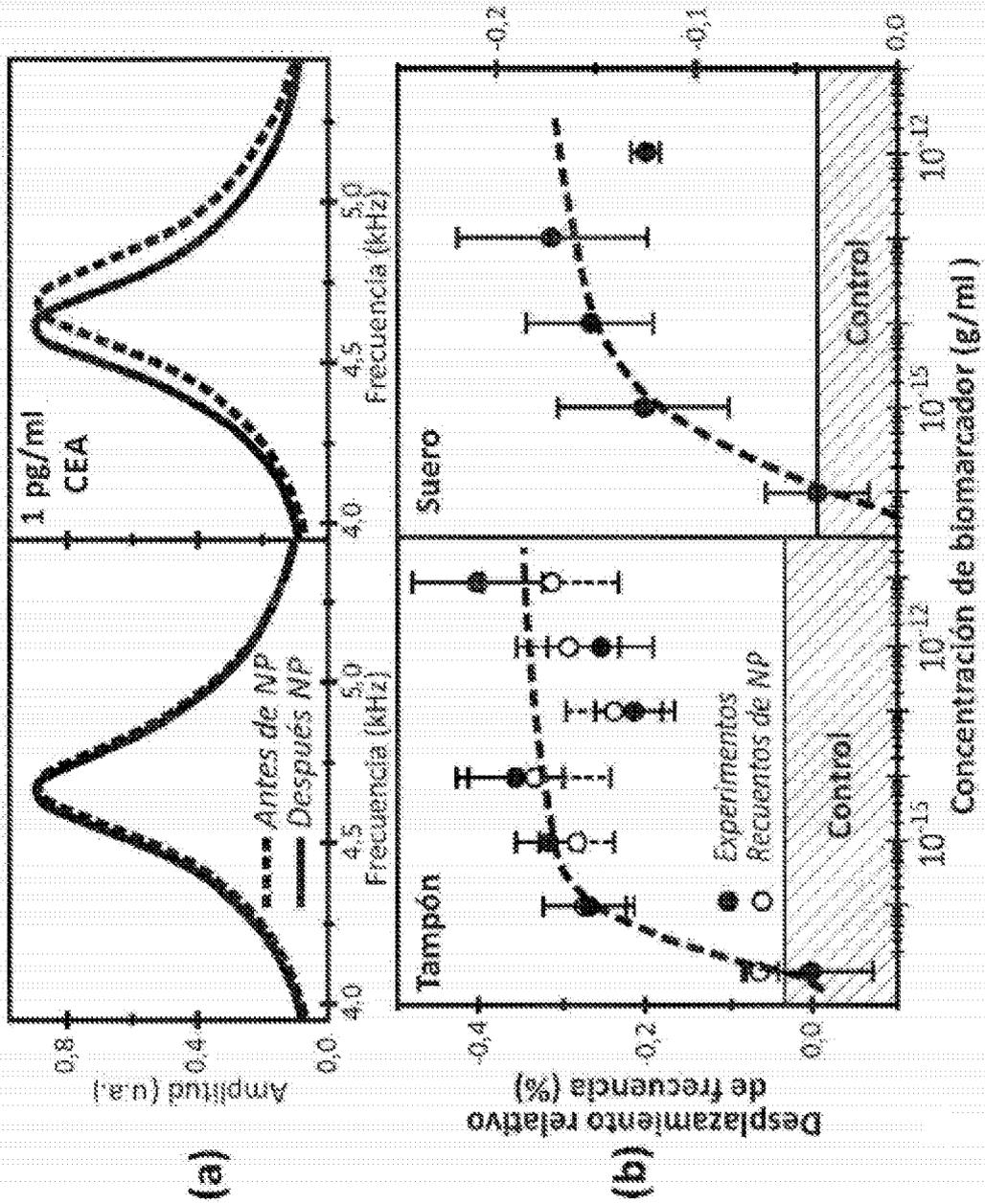


FIG. 9

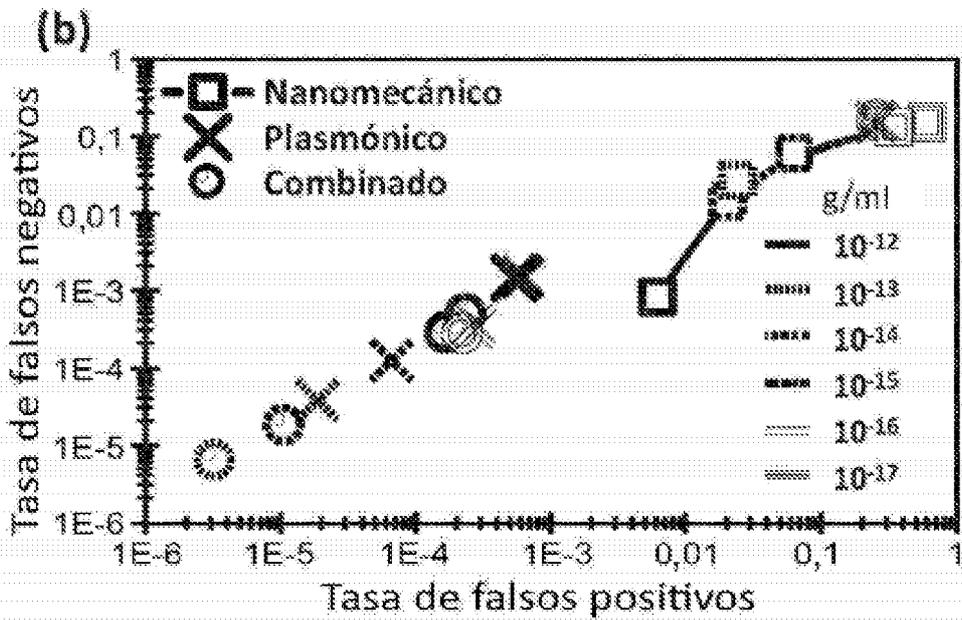
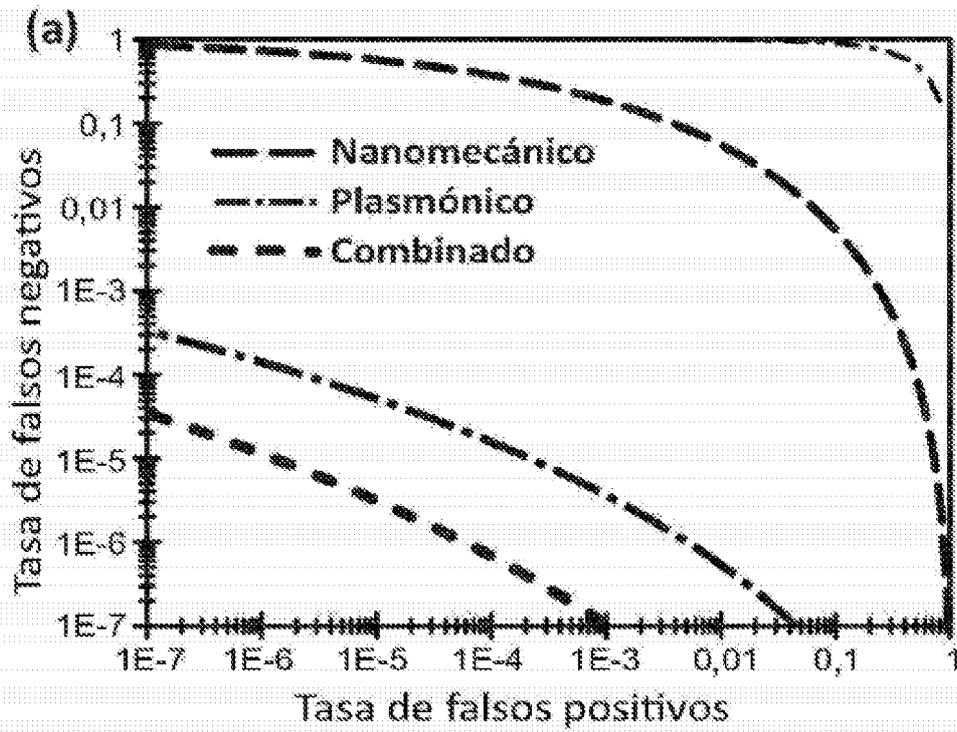


FIG. 10

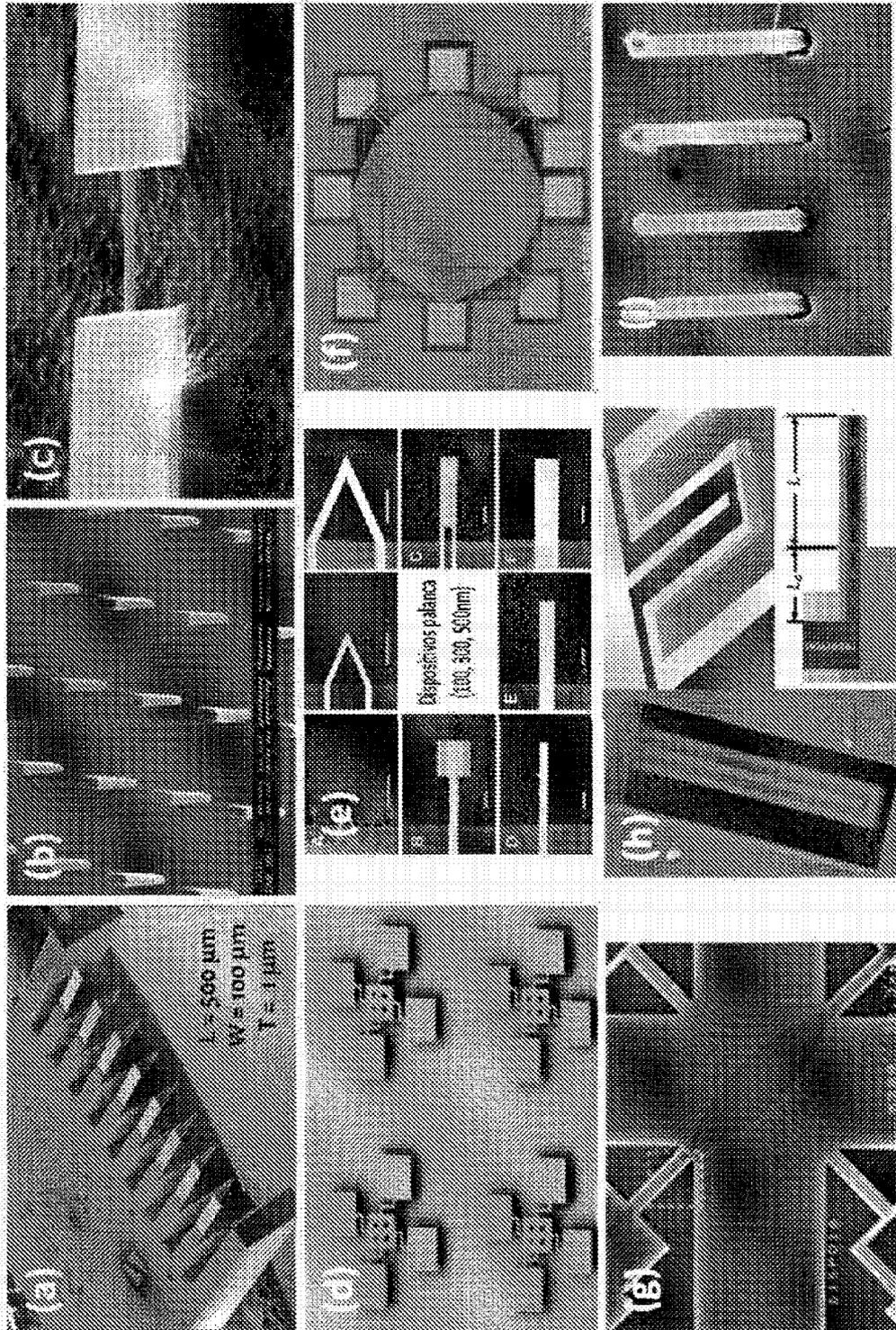


FIG. 11