

VERSIÓN CORREGIDA

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2014/016465 A9

(43) Fecha de publicación internacional
30 de enero de 2014 (30.01.2014) **WIPO | PCT**

- (51) **Clasificación Internacional de Patentes:**
G01N 33/543 (2006.01) *G01N 21/55* (2014.01)
- (21) **Número de la solicitud internacional:**
PCT/ES2013/070549
- (22) **Fecha de presentación internacional:**
26 de julio de 2013 (26.07.2013)
- (25) **Idioma de presentación:** español
- (26) **Idioma de publicación:** español
- (30) **Datos relativos a la prioridad:**
P201231209 26 de julio de 2012 (26.07.2012) ES
- (71) **Solicitantes:** **UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA** [ES/ES]; Campus plaza San Francisco, Edificio interfacultades, C/ Pedro Cerbuna, 12, E-50009 Zaragoza (ES). **FUNDACIÓN AGENCIA ARAGONESA PARA LA INVESTIGACIÓN Y EL DESARROLLO** [ES/ES]; Paseo Maria Agustín, 36, Edificio Pignatelli, puerta 30, 3a planta, E-50004 Zaragoza (ES). **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS** [ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).
- (72) **Inventores:** **DEL PINO GONZÁLEZ DE LA HIGUERA, Pablo**; Campus plaza San Francisco, Edificio interfacultades, C/ Pedro Cerbuna 12, E-50009 Zaragoza (ES). **PELAZ GARCIA, Beatriz**; Campus plaza San Francisco, Edificio interfacultades, C/ Pedro Cerbuna 12, 50.009 Zaragoza (ES). **POLO TOBAJAS, Ester**; Campus plaza San Francisco, Edificio interfacultades, C/ Pedro Cerbuna 12, 50.009 Zaragoza (ES). **GRAZÚ BONAVÍA, Valeria**; Campus plaza San Francisco, Edificio interfacultades, C/ Pedro Cerbuna 12, 50.009 Zaragoza (ES). **MARTÍNEZ DE LA FUENTE, Jesús**; Campus plaza San Francisco, Edificio interfacultades, C/ Pedro Cerbuna 12, 50.009 Zaragoza (ES). **PARRO GARCIA, Victor**; Campus plaza San Francisco, Edificio interfacultades, C/ Pedro Cerbuna 12, 50.009 Zaragoza (ES).
- (74) **Mandatario:** **FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo**; Hoffmann Eitle, Paseo de la Habana 9-11, Madrid, E-28036 Madrid (ES).
- (81) **Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publicada:**
— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- (48) **Fecha de publicación de esta versión corregida:**
12 de marzo de 2015
- (15) **Información sobre la corrección:**
véase la notificación del 12 de marzo de 2015

(54) **Title:** BIOSENSOR COMPRISING METAL NANOPARTICLES

(54) **Título:** BIOSENSOR CON NANOPARTICULAS METÁLICAS

(57) **Abstract:** The present invention discloses a biosensor for visual detection of an analyte, based on the light to heat conversion properties of metal nanoparticles: the analyte is visually detected by the colour change in the support areas (where the analyte is present), produced as a result of the heat generated by the metal nanoparticles where they are irradiated with an external light source. Use of said biosensor in a method for the detection of analytes is also claimed.

(57) **Resumen:** La presente invención se refiere a un biosensor donde la detección del analito se realiza de forma visual por el cambio de color en las zonas del soporte en que el analito esté presente producido por las nanoparticulasal ser irradiadas con una fuente de luz externa.



WO 2014/016465 A9

Biosensor con nanoparticulas metálicas

Campo de la técnica

La presente invención se refiere al campo de la biotecnología, concretamente al campo de los biosensores, más concretamente al campo de los biosensores con nanopartículas metálicas como sistema de transducción de la señal.

Antecedentes de la invención

En los últimos años los biosensores se han contemplado como alternativas analíticas a los métodos convencionales en diferentes campos. Un biosensor es un dispositivo de análisis compuesto por dos elementos fundamentales: un receptor biológico (un anticuerpo, una sonda de DNA, o una célula...) preparado para detectar específicamente una sustancia aprovechando la especificidad de las interacciones biomoleculares y un transductor o sensor, capaz de interpretar la reacción de reconocimiento biológico que produce el receptor y "traducirla" en una señal cuantificable, óptica o eléctrica. Las características más destacables de estos dispositivos, que los convierten en opciones altamente atractivas como herramientas analíticas son: su especificidad, alta sensibilidad, capacidad de respuesta que conduce a un corto tiempo de análisis, su capacidad de inclusión en sistemas integrados, facilidad de automatización, capacidad de trabajar en tiempo real, su versatilidad y bajo coste.

El avance en el campo de los biosensores se apoya en la experiencia adquirida durante años sobre las propiedades y capacidad de reconocimiento de diversas biomoléculas. Como elementos de reconocimiento se han utilizado numerosos instrumentos biológicos, desde los más simples como enzimas o anticuerpos, hasta los más complejos productos de la ingeniería genética. Por otro lado, los últimos avances en la microelectrónica, la nanotecnología y las propiedades únicas de determinados materiales han sido claves para este tipo de dispositivos.

A pesar de ello, los actuales métodos de sensado no siempre pueden responder a las demandas de fiabilidad y rapidez. El tiempo necesario para la realización del ensayo y la sensibilidad de la técnica son algunas de las limitaciones más importantes. Aunque el desarrollo de estos dispositivos se ha centrado principalmente en el campo del

diagnóstico clínico; hoy en día está aumentado su interés en otros ámbitos de aplicación que incluyen el medioambiental, agroalimentario, químico, farmacéutico y militar.

- 5 La presente invención propone un nuevo biosensor basado en las propiedades de conversión de luz a calor de las partículas metálicas.

Breve descripción de la invención

10 Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un biosensor para la detección visual de un analito que comprende:

- a. Una molécula de reconocimiento (biomolécula de captura), capaz de reconocer el analito diana;
- b. Un soporte con una superficie termosensible donde inmovilizar o donde se encuentra inmovilizada la molécula de reconocimiento de la etapa a);
- 15 c. Una fuente de luz externa;
- d. Una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección), capaz de reconocer el analito diana; y
- e. Una nanopartícula metálica que presenta banda de plasmón de superficie;

20 donde la detección del analito se realiza de forma visual por el cambio de color en las zonas del soporte en que el analito esté presente, producido como consecuencia del calor generado por las nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.

25 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el biosensor para la detección visual de un analito comprende:

- a. Una molécula de reconocimiento (biomolécula de captura), capaz de reconocer el analito diana, inmovilizada sobre un soporte con una superficie termosensible;
- 30 b. Una fuente de luz externa; y
- c. Una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección), capaz de reconocer el analito diana, unida a la superficie de una nanopartícula metálica que presenta banda de plasmón de superficie;

donde la detección del analito se realiza de forma visual por el cambio de color en las zonas del soporte en que el analito esté presente, producido como consecuencia del calor generado por las nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.

5

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un biosensor para la detección visual de un analito que comprende:

- a. Una molécula de reconocimiento (biomolécula de captura), capaz de reconocer el analito diana;
- 10 b. Un soporte con una superficie termosensible;
- c. Una fuente de luz externa;
- d. Una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección), capaz de reconocer el analito diana, opcionalmente unida a una molécula etiqueta; y
- 15 e. Nanopartículas metálicas con banda de plasmón de superficie funcionalizadas con biomoléculas que reconocen específicamente a la biomolécula de detección o la molécula etiqueta con la que fue modificada la biomolécula de detección;

20 donde la detección del analito se realiza de forma visual por el cambio de color en las zonas del soporte en que el analito esté presente, producido como consecuencia del calor generado por las nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.

25 Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un biosensor para la detección visual de un analito tal y como se define en el segundo aspecto de la invención, que comprende:

- a. Una molécula de reconocimiento (biomolécula de captura), capaz de reconocer el analito diana;
- 30 b. Un soporte con una superficie termosensible;
- c. Una fuente de luz externa;
- d. Una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección), capaz de reconocer el analito diana, unida a una o varias moléculas de biotina; y

e. Nanopartículas metálicas con banda de plasmón de superficie funcionalizadas con moléculas de estreptavidina, avidina o similares, que reconocen específicamente a las moléculas de biotina;

5 donde la detección del analito se realiza de forma visual por el cambio de color en las zonas del soporte en que el analito esté presente, producido como consecuencia del calor generado por las nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.

10 Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un biosensor para la detección visual de un analito tal y como se define en el segundo aspecto de la invención, que comprende:

a. Una molécula de reconocimiento (biomolécula de captura), capaz de reconocer el analito diana;

15 b. Un soporte con una superficie termosensible;

c. Una fuente de luz externa;

c. Una segunda molécula de reconocimiento donde la molécula es un anticuerpo (anticuerpo de detección), capaz de reconocer el analito diana; y

20 d. Nanopartículas metálicas con banda de plasmón de superficie funcionalizadas con anticuerpos anti-Fc que se unen al anticuerpo de detección;

25 donde la detección del analito se realiza de forma visual por el cambio de color en las zonas del soporte en que el analito esté presente producido como consecuencia del calor generado por las nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.

En una realización particular de cualquiera de los aspectos de la invención, las moléculas de reconocimiento (biomoléculas de captura y detección) se seleccionan de la lista que consiste en anticuerpos, péptidos, enzimas, polisacáridos, ácidos nucleicos
30 (DNA, RNA), aptámeros o ácidos nucleicos peptídicos (PNAs). Preferiblemente moléculas de DNA y anticuerpos.

En otra realización de cualquiera de los aspectos de la invención, la fuente de luz externa es un láser, donde el láser presenta una longitud de onda igual a la longitud de onda del máximo de la banda del plasmón de superficie de la nanopartícula metálica.

5 En otra realización de cualquiera de los dos aspectos de la invención, la nanopartícula metálica se selecciona de la lista que consiste en:

- a. Nanopartículas de oro;
- b. Nanopartículas de plata; o
- 10 c. Nanopartículas de cobre

Preferiblemente la nanopartícula metálica es un nanoprisma triangular de oro.

15 En otra realización de cualquiera de los dos aspectos de la invención, la superficie del soporte comprende un papel termosensible o una membrana de celulosa, nitrato de celulosa o acetato de celulosa. Preferiblemente, el papel termosensible presenta adherido un segundo soporte seleccionado de la lista que consiste en membranas de celulosa, nitrato de celulosa, acetato de celulosa, poliestireno, cerámica, silicio o vidrio.

20 Un quinto aspecto de la presente invención se refiere al uso de un biosensor según el primer aspecto de la invención, para la detección visual de un analito que comprende:

- a. Añadir la muestra, donde está presente el analito a determinar, a un soporte que presente inmovilizada la molécula de reconocimiento del analito (biomolécula de captura);
- 25 b. Incubar el soporte de la etapa a) con nanopartículas metálicas funcionalizadas con una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección) del analito; y
- c. Opcionalmente, colocar el soporte sobre una superficie termosensible si el soporte no comprendiese ya dicha superficie; e
- 30 d. Irradiar el soporte de la etapa b) o c) con la fuente de luz externa.

Un sexto aspecto de la invención se refiere al uso de un biosensor para la detección visual de un analito tal y como se define en el segundo aspecto de la invención, para la detección de un analito que comprende:

- a. Añadir la muestra, donde está presente el analito a determinar, a un soporte que presente inmovilizada la molécula de reconocimiento (biomolécula de captura) del analito;
- 5 b. Incubar el soporte de la etapa a) con una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección) del analito opcionalmente marcada con una etiqueta;
- c. Incubar el soporte de la etapa b) con nanopartículas metálicas funcionalizadas con una biomolécula que reconoce específicamente a la biomolécula de detección o la etiqueta con la que fue modificada la biomolécula
10 de detección; y
- d. Opcionalmente, colocar el soporte sobre una superficie termosensible si el soporte no comprendiese ya dicha superficie; e
- e. Irradiar el soporte de la etapa c) o d) con la fuente de luz externa.

15 Una realización preferida del sexto aspecto de la invención se refiere al uso de un biosensor para la detección de un analito que comprende:

- a. Añadir la muestra, donde está presente el analito a determinar, a un soporte que presente inmovilizada la molécula de reconocimiento (biomolécula de captura) del analito;
- 20 b. Incubar el soporte de la etapa a) con una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección) del analito marcada con al menos una molécula de biotina;
- c. Incubar el soporte de la etapa b) con nanopartículas metálicas funcionalizadas con estreptavidina; y
- 25 d. Opcionalmente, colocar el soporte sobre una superficie termosensible si el soporte no comprendiese ya dicha superficie; e
- e. Irradiar el soporte de la etapa c) o d) con la fuente de luz externa.

30 Otra realización preferida del sexto aspecto de la invención se refiere al uso de un biosensor para la detección de un analito que comprende:

- a. Añadir la muestra, donde está presente el analito a determinar, a un soporte que presente inmovilizada la molécula de reconocimiento (biomolécula de captura del analito);

- b. Incubar el soporte de la etapa a) con una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección) que deberá ser un anticuerpo;
 - c. Incubar el soporte de la etapa b) con nanopartículas metálicas funcionalizadas con un anticuerpo anti-Fc; y
 - 5 d. Opcionalmente, colocar el soporte sobre una superficie termosensible si el soporte no comprendiese ya dicha superficie; e
 - e. Irradiar el soporte de la etapa c) o d) con la fuente de luz externa.
- 10 Un séptimo aspecto de la invención se refiere al uso de un biosensor tal y como se define en el primer aspecto de la invención, para la detección de un analito que comprende:
- a. Añadir a una muestra, donde esté presente el analito a determinar, nanopartículas metálicas funcionalizadas con una segunda molécula de
 - 15 reconocimiento (biomolécula de detección) del analito;
 - b. Extraer el analito unido a las nanopartículas de la muestra de la etapa a), preferentemente a través de un proceso de centrifugación;
 - c. Añadir la extracción de la etapa b, a un soporte que presente inmovilizada la molécula de reconocimiento (biomolécula de captura) del analito;
 - 20 d. Opcionalmente, colocar el soporte sobre una superficie termosensible si el soporte no comprendiese ya dicha superficie; e
 - e. Irradiar el soporte de la etapa c) o d) con la fuente de luz externa.

25 Un octavo aspecto de la presente invención se refiere al uso de un biosensor según cualquiera de las realizaciones o aspectos anteriores, para la detección de aditivos, fármacos, microorganismos patógenos, componentes de los alimentos, pesticidas, compuestos tóxicos o en el análisis de la demanda bioquímica de oxígeno.

Breve descripción de las figuras

30

Figura 1: Esquema del sistema de reconocimiento de la presente invención.

Figura 2: Fig. 2a. Reconocimiento CEA + Anticuerpo anti-CEA 3C6-nanoprismas. Fig. 2b. Reconocimiento anticuerpo anti-CEA 3C6-biotina + estreptavidina-nanoprismas.

Figura 3: Fig. 3a. Reconocimiento Anticuerpo anti-CEA 3C1 + CEA + Anticuerpo anti-CEA 3C6-nanoprismas. Fig. 3b. Reconocimiento Anticuerpo anti-CEA 3C1 + CEA+ Anticuerpo antiCEA 3C6-biotina + estreptavidina-nanoprismas.

5

Figura 4: Reconocimiento Anticuerpo anti-CEA 3C1 + CEA+ Anticuerpo antiCEA 3C6 nanopartículas de oro.

Figura 5: Reconocimiento Anticuerpo antiCEA 3C1 + CEA + Anticuerpo anti-CEA 3C6-nanoprismas de oro con distintos tiempos de irradiación, y diferente distancia entre la superficie y el láser. Fig. 5a. Tiempo de irradiación 10 segundos a mayor distancia. Fig. 5b tiempo de irradiación 2segundos a una distancia menor.

10

Figura 6: Reconocimiento Anticuerpo antiCEA 3C1 + CEA + Anticuerpo anti-CEA 3C6-nanoprismas (en tampón PBS y en muestras de plasma sanguíneo).

15

Figura 7: Reconocimiento Anticuerpo antiCEA 3C1 + CEA + Anticuerpo anti-CEA 3C6-nanoprismas de oro en muestras de plasma sanguíneo y detección mediante cámara de infrarrojos.

20

Figura 8: Esta figura muestra los tres esquemas de diseño del biosensor descrito en el ejemplo 5.

Descripción de la invención

25

La presente invención se refiere a un biosensor que comprende (i) una molécula de reconocimiento (biomolécula de captura), capaz de reconocer el analito diana; (ii) un soporte con una superficie termosensible; (iii) una fuente de luz externa; (iv) una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección), capaz de reconocer el analito diana y (v) una nanopartícula metálica que presenta banda de plasmón de superficie, caracterizado porque la detección del analito se realiza de forma visual por el cambio de color en las zonas del soporte en que el analito esté presente, producido como consecuencia del calor generado por las nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.

30

El biosensor de la presente invención utiliza como sistema de transducción de la señal, las propiedades de conversión de luz a calor de las nanopartículas metálicas. La base para la utilización de este sistema como marcaje en biosensores, es debido a la presencia de la banda de absorción de plasmón de superficie. Estas bandas de absorción se producen cuando la frecuencia de la luz incidente sobre la nanopartícula, se encuentra en resonancia con la frecuencia de oscilación colectiva de los electrones de la banda de conducción de la partícula, produciendo su excitación. Este fenómeno se conoce como "resonancia localizada de plasmón de superficie" (LSPR). La posición en el espectro de la banda de resonancia depende decisivamente de la forma, tamaño y estructura (hueca o sólida) de la partícula, así como del medio dieléctrico donde se encuentra la partícula. La LSPR conduce a elevados coeficientes de extinción molar ($\sim 3 \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), con una eficacia equivalente a 106 moléculas de fluoróforo y un fuerte incremento del campo eléctrico local próximo a la nanopartícula.

Nanopartículas metálicas como pueden ser nanopartículas de oro, plata o de cobre, presentan este efecto de resonancia de plasmón de superficie. Estas partículas al ser irradiadas por una fuente de luz externa con la frecuencia adecuada y de alta intensidad, como puede ser un láser, son capaces de liberar parte de la energía absorbida en forma de calor, produciendo un aumento localizado de la temperatura alrededor de su superficie.

Esta generación controlada de calor, es la base del nuevo sistema de detección que se ha desarrollado. Este calor generado provoca un cambio perceptible en una superficie termosensible adecuadamente seleccionada. En este sentido, los inventores de la presente invención han descubierto que sorprendentemente se obtiene un límite de detección del orden de picogramos en los experimentos realizados utilizando como medio detección el cambio de color en las zonas del soporte en que el analito esté presente producido por las nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa. Así, el ejemplo 4 de la presente invención ilustra como se obtuvo un límite de detección de menor orden, y por lo tanto de una mayor sensibilidad, utilizando la detección visual de la presente invención al alcanzado en los experimentos realizados utilizando una cámara de infrarrojos como medio de detección. Este sorprendente resultado ha dado lugar al desarrollo de un biosensor que posee las siguientes

características: (i) alta sensibilidad, (ii) alta selectividad o especificidad, con el fin de que el biosensor interaccione exclusivamente con el analito de interés y no con otros de propiedades similares; (iii) alta fiabilidad, con el fin de que no haya problemas de ruido en el sistema de transducción debido a la muestra a analizar; (iv) bajo coste de producción; (v) tiempo de análisis corto que posibilite actuaciones rápidas en caso necesario; (vi) pretratamiento de la muestra innecesario lo que supone un ahorro de tiempo, materiales y reactivos; (vii) manejo sencillo, con el fin de que no se requiera personal cualificado en la utilización del biosensor; (viii) capacidad para realizar los análisis en tiempo real, y (ix) portátil para que sea posible realizar análisis in situ.

10

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un biosensor para la detección visual de un analito que comprende:

- a. Una molécula de reconocimiento (biomolécula de captura), capaz de reconocer el analito diana;
 - 15 b. Un soporte con una superficie termosensible donde inmovilizar la molécula de reconocimiento (biomolécula de captura) de la etapa a);
 - c. Una fuente de luz externa;
 - d. Una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección), capaz de reconocer el analito diana; y
 - 20 e. Una nanopartícula metálica que presenta banda de plasmón de superficie;
- donde la detección del analito se realiza de forma visual por el cambio de color en las zonas del soporte en que el analito esté presente, producido como consecuencia del calor generado por las nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.

25

Se enfatiza el hecho que en el contexto de la presente invención se entiende como detección de forma visual a aquella detección que es diferenciable a simple vista sin necesidad de emplear ningún tipo de instrumentación para su detección tal y como una cámara de infrarrojos.

30

Por lo tanto, en una realización preferida del primer aspecto de la invención el biosensor para la detección visual de un analito comprende:

- a. Una molécula de reconocimiento (biomolécula de captura), capaz de reconocer el analito diana;

- b. Un soporte con una superficie termosensible donde inmovilizar la molécula de reconocimiento (biomolécula de captura) de la etapa a);
- c. Una fuente de luz externa;
- d. Una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección), capaz de reconocer el analito diana; y
- e. Una nanopartícula metálica que presenta banda de plasmón de superficie;

donde el biosensor no comprende ningún tipo de instrumentación capaz de detectar la conversión de luz a calor de las nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, el biosensor comprende:

- a. Una molécula de reconocimiento (biomolécula de captura), capaz de reconocer el analito diana, inmovilizada sobre un soporte con una superficie termosensible;
- b. Una fuente de luz externa; y
- c. Una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección), capaz de reconocer el analito diana, unida a la superficie de una nanopartícula metálica que presenta banda de plasmón de superficie;

donde la detección del analito se realiza de forma visual por el cambio de color en las zonas del soporte en que el analito esté presente, producido como consecuencia del calor generado por las nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.

En el contexto de la presente invención se entiende como fuente de luz externa a toda aquella fuente de radiación electromagnética con energía entre 380 nm y 1100 nm, con la capacidad de excitar la banda LSPR de partículas metálicas de oro, plata, cobre o cualquiera de sus aleaciones u estados oxidados. Preferentemente, en el rango del infrarrojo cercano (entre 750 y 1100 nm) debido a que en ese rango de energías no hay absorción de energía por parte de biomoléculas interferentes presentes en la muestra que absorban en el rango visible del espectro (hemoglobina, etc). La fuente de luz externa puede ser monocromática o policromática, preferiblemente monocromática.

En el contexto de la presente invención se entiende como nanopartícula metálica que presenta banda de plasmón de superficie a aquella agrupación mono- o policristalina de átomos metálicos en cualquiera de sus estados de oxidación, o cualquiera de sus aleaciones, que presentan todas sus dimensiones geométricas entre 1 y 1000nm, preferiblemente entre 1 y 200 nm. En una realización preferida de la invención dichos átomos metálicos son metales nobles. En una realización más preferida de la invención dichos átomos metálicos son átomos de oro, plata o cobre. En una realización aún más preferida de la invención, son átomos de oro o plata con forma tubular o triangular.

10

En el contexto de la presente invención se entiende como molécula de reconocimiento o biomolécula de captura a toda aquella molécula capaz de reconocer de forma específica, a través de cualquier tipo de interacción química o biológica, a un determinado analito.

15

En el contexto de la presente invención se entiende como segunda molécula de reconocimiento o biomolécula de detección a toda aquella molécula capaz de reconocer de forma específica, a través de cualquier tipo de interacción química o biológica, a un determinado analito.

20

Las moléculas utilizadas como elementos de reconocimiento en los biosensores de la presente invención deben poseer afinidad suficientemente selectiva para reconocer un analito determinado, en presencia de otros compuestos, además de permanecer estables a lo largo del tiempo y conservar su estructura así como su actividad biológica una vez inmovilizadas sobre el soporte y sobre la superficie de las nanopartículas.

25

En el sistema desarrollado pueden utilizarse como moléculas de reconocimiento anticuerpos, péptidos, enzimas, proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos (DNAs), aptámeros o ácidos nucleicos peptídicos (PNAs).

30

En la mayoría de los casos los biorreceptores más utilizados son ácidos nucleicos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos siendo los anticuerpos o fragmentos de los mismos los que han dado lugar al mayor número de técnicas útiles para el diagnóstico. La razón estriba en la flexibilidad del sistema inmune para producir un número

prácticamente ilimitado de anticuerpos con selectividades diferentes y una elevada afinidad por su correspondiente antígeno. Actualmente, es posible obtener anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos de prácticamente cualquier molécula con independencia de su tamaño. Por otro lado, una de las ventajas ofrecidas por los anticuerpos, es debida a la homogeneidad estructural que presentan estas proteínas, que es independiente de su especificidad. Esto permite estandarizar procedimientos relacionados con su utilización como reactivos inmunoquímicos, tales como su conservación o su inmovilización sobre la superficie del transductor. Mediante el uso de técnicas de biología molecular pueden prepararse, como moléculas de reconocimiento, fragmentos de anticuerpo (Fab o fragmento de cadena sencilla Fv) que conservan la estructura y la capacidad de reconocimiento del antígeno; así como anticuerpos recombinantes, como los anticuerpos monoclonales de segunda generación o minibodies.

Por otro lado, los aptámeros son moléculas que por su tamaño pequeño y su baja inmunogenicidad pueden sustituir a los anticuerpos en ciertas aplicaciones. Los aptámeros son ácidos nucleicos de una sola cadena que tienen formas tridimensionales bien definidas, lo cual les permite unirse a la molécula objetivo en una forma similar que los anticuerpos. Los aptámeros combinan las características óptimas de las moléculas pequeñas (inmunogenicidad baja, difusión alta, etc.) y de los anticuerpos (alta especificidad y afinidad, y estabilidad química). Otra ventaja con respecto a los anticuerpos monoclonales, es que son sintetizados químicamente en lugar de ser expresados biológicamente.

Los ácidos nucleicos son capaces de detectar variaciones de una sola base en una secuencia complementaria de DNA. Pueden utilizarse tanto en procesos de secuenciación genética y análisis de la expresión génica, como en la detección de mutaciones y alteraciones del DNA asociadas con determinadas enfermedades; ya que es posible construir sintéticamente secuencias de nucleótidos que respondan a la estructura de genes previamente identificados. Actualmente, se está sustituyendo su utilización por cadenas de PNA, debido a que presentan una mayor estabilidad biológica (frente a la degradación de diversas enzimas), y química (son más resistentes a variaciones de pH o fuerza iónica). Además al no contener unidades de 2'-desoxi-D-ribosa ni enlaces fosfodiéster, como ocurre en el DNA, presentan una estructura neutra,

lo que reduce la repulsión electrostática durante la hibridación, estableciendo enlaces más fuertes; además de presentar una adsorción inespecífica menor.

5 El elemento de reconocimiento del sensor (biomolécula de captura) será normalmente inmovilizado sobre un soporte con una superficie termosensible, ya sea por retención física en el interior de una matriz (atrapamiento), adsorción física sobre una matriz mediante interacciones iónicas ó hidrofóbicas, ó unión mediante enlace covalente.

10 En este sentido, en el contexto de la presente invención se entiende como soporte con superficie termosensible a toda aquella superficie capaz de sufrir un cambio estructural al ser calentado, que derive en revelado de una imagen. Preferiblemente se utilizará como superficie termosensible, papel térmico que debido a su sensibilidad al calor dará lugar a una señal de revelado tras ser sometido a un incremento de temperatura. Se considera papel térmico aquel papel que conste de una capa térmica donde incorpora
15 un colorante, un sensibilizador y un desarrollador de color (independientemente de los componentes químicos con los que haya sido elaborado) capaces de reaccionar entre si dando lugar a una imagen, tras ser sometidos a un incremento de la temperatura. En otra realización preferida, se utilizará como superficie termosensible cualquier polímero inteligente, que tras ser sometido a un estímulo externo, como un cambio de
20 temperatura, da lugar a una respuesta en las propiedades del polímero como: contracción, flexión, cambio de color, de estado, luminiscencia, etc. Tipos de polímeros sensibles a la temperatura pueden ser: PNIPAM, poli (N-isopropilacrilamida), poli (N-vinilpiperidina), poli(N-vinilcaprolactama) o poli (N-isopropilacrilamida).

25 En una realización de la invención el soporte con una superficie termosensible del sistema comprende al menos un soporte termosensible donde tiene lugar el reconocimiento molecular, tal y como una membrana de celulosa o derivados de la misma (nitrato de celulosa, acetato de celulosa, etc) o papel termosensible.

30 En otra realización de la invención el soporte con una superficie termosensible del sistema comprende dos soportes. Un primer soporte donde se habrá inmovilizado la biomolécula de captura, que puede tratarse de una membrana de celulosa o derivados de la misma (nitrato de celulosa, acetato de celulosa, etc), u otros materiales como poliestireno, cerámica, silicio o vidrio. A este primer soporte irá adherido un segundo

soporte que consiste en una superficie termosensible que dará lugar a la señal de revelado tras ser sometida a un incremento de temperatura.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un biosensor para la
5 detección visual que comprende:

- a. Una molécula de reconocimiento (biomolécula de captura), capaz de reconocer el analito diana;
- b. Un soporte con una superficie termosensible;
- c. Una fuente de luz externa;
- 10 d. Una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección), capaz de reconocer el analito diana, opcionalmente unida a una molécula etiqueta; y
- e. Nanopartículas metálicas con banda de plasmón de superficie funcionalizadas con (biomoléculas que reconocen específicamente a la
15 biomolécula de detección o la etiqueta con la que fue modificada la biomolécula de detección;

donde la detección del analito se realiza de forma visual por el cambio de color en las zonas del soporte en que el analito esté presente, producido como consecuencia del
20 calor generado por las nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa. De nuevo se hace notar que se entiende como detección de forma visual a aquella detección que es diferenciable a simple vista sin necesidad de emplear ningún tipo de instrumentación para su detección tal y como una cámara de infrarrojos. Por lo tanto, el biosensor del segundo aspecto de la invención no comprende ningún tipo de
25 instrumentación capaz de detectar la conversión de luz a calor de las nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.

En el contexto de la presente invención se entiende como moléculas etiquetadas aquellas que son reconocidas por afinidad por una interacción de tipo ligando-proteína o por
30 reconocimiento molecular por hibridación entre hebras de ácidos nucleicos. En el primer caso se entiende que la biomolécula de detección se encuentra modificada con un antígeno, hormona, vitamina, cola de polihistidina, o dominios de lectinas, entre otros. Se entiende por lo tanto que las NPs se encuentran funcionalizadas con anticuerpos, aptámeros, receptores, proteínas de unión, ácidos tricarbóxicos

modificados con iones metálicos divalentes, o azúcares capaces de interaccionar de forma específica con la etiqueta de la biomolécula de detección respectivamente. En el segundo caso se entiende que tanto la biomolécula de detección como la NP de oro están funcionalizadas con cadenas complementarias de ácidos nucleicos presentes en la naturaleza (ácido desoxirribonucleico o DNA, ácido ribonucleico o RNA) o artificiales (ácido nucleico peptídico o PNA, morfolidos, etc) o combinaciones de ambos (DNA-DNA, PNA-DNA, DNA-PNA, PNA-PNA, etc)

- 10 Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un biosensor para la detección visual tal y como se define en el segundo aspecto de la invención, que comprende:
- a. Una molécula de reconocimiento (biomolécula de captura), capaz de reconocer el analito diana;
 - b. Un soporte con una superficie termosensible;
 - 15 c. Una fuente de luz externa;
 - d. Una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección), capaz de reconocer el analito diana, unida a una o varias moléculas de biotina; y
 - e. Nanopartículas metálicas con banda de plasmón de superficie funcionalizadas con moléculas de estreptavidina, avidina o similares, que reconocen específicamente a las moléculas de biotina;
- 20

donde la detección del analito se realiza de forma visual por el cambio de color en las zonas del soporte en que el analito esté presente producido como consecuencia del calor generado por las nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.

25

- Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un biosensor para la detección visual tal y como se define en el segundo aspecto de la invención, que comprende:
- a. Una molécula de reconocimiento (biomolécula de captura), capaz de reconocer el analito diana;
 - 30 b. Un soporte con una superficie termosensible;
 - c. Una fuente de luz externa;
 - d. Una segunda molécula de reconocimiento (anticuerpo de detección), capaz de reconocer el analito diana; y

- e. Nanopartículas metálicas con banda de plasmón de superficie funcionalizadas con anticuerpos anti-Fc o anti-IgG que se unen al anticuerpo de detección;

- 5 donde la detección del analito se realiza de forma visual por el cambio de color en las zonas del soporte en que el analito esté presente, producido como consecuencia del calor generado por las nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.
- 10 El dispositivo propuesto se trata de un sistema de reconocimiento tipo "sándwich", entre una molécula de "reconocimiento", biomolécula de captura, (ya sea una proteína como puede ser un anticuerpo, una sonda de DNA, PNA, etc.), inmovilizada sobre el soporte donde tendrá lugar el reconocimiento del analito, y una segunda molécula de detección, biomolécula de detección, (un segundo anticuerpo, o una sonda complementaria de
- 15 DNA) unida a la superficie de la nanopartícula metálica ya sea de forma directa o de forma indirecta indirecta a través de la proteína lectora y/o etiqueta. Funcionalizando los soportes y las nanopartículas con las correspondiente moléculas de reconocimiento, pueden detectarse numerosos analitos siguiendo la misma estrategia.
- 20 Adicionalmente, la presente invención se refiere específicamente en los aspectos segundo a cuarto de la invención, a un sistema universal de detección. De hecho se comprueba como, de acuerdo al tercer aspecto de la invención, utilizando biomoléculas de detección marcadas con biotina, y funcionalizando las nanopartículas metálicas con estreptavidina; se pueden utilizar las mismas nanopartículas conjugadas con esta
- 25 proteína, para el reconocimiento de diferentes analitos, basándose en la interacción avidina-biotina evitando, de esta manera, tener que preparar el conjugado nanopartícula-biomolécula de detección para cada analito a determinar. Otro ejemplo sería el cuarto aspecto de la invención, donde un sistema de detección basado en la funcionalización de las nanopartículas metálicas con un anticuerpo anti-Fc, capaz de
- 30 reconocer la región Fc de cualquier otro anticuerpo, podrá utilizar las mismas nanopartículas para el reconocimiento de distintos analitos, siempre que la biomolécula de detección de este sistema sea un anticuerpo.

Por lo tanto, el dispositivo de la presente invención, permite el análisis de múltiples muestras en un solo ensayo con un límite de sensibilidad del orden de picogramos.

En una realización meramente ilustrativa de la presente invención la detección de un analito en una muestra determinada se puede llevar a cabo inmovilizando en una primera etapa la molécula de reconocimiento (bimolécula de captura) en un soporte, por ejemplo en una membrana de nitrato de celulosa. Después se lleva a cabo una segunda etapa añadiéndose la muestra, donde está presente el analito a determinar, al soporte, dejándose el tiempo suficiente para que se produzca el reconocimiento antígeno-anticuerpo. Finalmente en una tercera etapa, se incuba el soporte con las nanopartículas funcionalizadas con la segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección). Tras el reconocimiento molecular, se coloca el soporte sobre una superficie termosensible, siempre y cuando el soporte no tenga ya una superficie termosensible, para ser irradiada con la fuente externa de luz, por ejemplo un láser de emisión en el infrarrojo cercano, produciéndose de esta forma la detección del analito.

En el caso de los aspectos segundo a cuarto de la presente invención, el ensayo consta de una etapa más. Por ejemplo en el caso de utilizar el dispositivo tal y como se define en el tercer aspecto de la invención, en la tercera etapa se incuba el soporte con una solución de la molécula de reconocimiento (biomolécula de detección), por ejemplo un anticuerpo secundario marcado con biotina. Tras realizar los lavados correspondientes, se lleva a cabo una cuarta etapa de incubación con las nanopartículas funcionalizadas con estreptavidina, para finalmente, una vez lavado el soporte del exceso de nanopartículas, éste sea irradiado con el láser de emisión.

En el caso del cuarto aspecto de la invención, donde se ha funcionalizado la nanopartícula con anticuerpos anti-Fc tras la etapa de incubación con la muestra, para la captura del analito a determinar, se lleva a cabo una tercera etapa de incubación con un anticuerpo como biomolécula de detección. Tras realizar los lavados correspondientes, en una cuarta etapa, se añaden las nanopartículas funcionalizadas con el anticuerpo anti-Fc, para finalmente, una vez lavado el soporte, éste sea irradiado con el láser de emisión.

Una posibilidad para mejorar el límite de detección del biosensor de la presente invención consiste en realizar en primer lugar el reconocimiento del analito en la muestra, añadiendo directamente sobre ésta las nanopartículas funcionalizadas. Así, una vez producido el reconocimiento antígeno-anticuerpo puede extraerse el analito con las nanopartículas, mediante centrifugación. Esta etapa permite concentrar el analito independientemente del volumen de muestra y, extraer el analito del resto de componentes de la muestra donde se encuentra. El resto del procedimiento se realizaría de la misma forma que se ha descrito anteriormente, una vez recuperados las nanopartículas con el analito se incubarían con la superficie sensora donde se ha inmovilizado la molécula de reconocimiento.

Por lo tanto, con el biosensor descrito, basado en las propiedades de las nanopartículas metálicas con banda de plasmón de superficie, como sistema de transducción (en el efecto de resonancia de plasmón de superficie), es posible detectar diversos analitos directamente en una muestra de forma selectiva y rápida, a concentraciones muy bajas, del orden de picogramos.

Por otro lado, la presente invención también se refiere a biosensores útiles en métodos no exclusivamente visuales de detección de analitos. En concreto, la presente invención se refiere a un biosensor (de aquí en adelante "biosensor de termopilas 1") que comprende:

- a. Una molécula de reconocimiento (biomolécula de captura), capaz de reconocer el analito diana;
- b. Un soporte donde inmovilizar la molécula de reconocimiento de la etapa a);
- c. Una fuente de luz externa;
- d. Una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección), capaz de reconocer el analito diana;
- e. Una termopila; y
- f. Una nanopartícula metálica que presenta banda de plasmón de superficie;

donde la detección del analito se realiza al detectar la termopila la conversión de luz a calor de las nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.

El ensamblaje de este tipo de biosensor se ilustra en la figura 8 y en el ejemplo 5.

En otra realización preferida de la invención, el biosensor de termopilas 1 comprende:

a. Una molécula de reconocimiento (biomolécula de captura), capaz de reconocer el analito diana, inmovilizada sobre un soporte con una superficie termosensible;

5 b. Una fuente de luz externa; y

c. Una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección), capaz de reconocer el analito diana, unida a la superficie de una nanopartícula metálica que presenta banda de plasmón de superficie.

10 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un biosensor (de aquí en adelante "biosensor de termopilas 2") que comprende:

a. Una molécula de reconocimiento (biomolécula de captura), capaz de reconocer el analito diana;

b. Un soporte;

15 c. Una fuente de luz externa;

d. Una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección), capaz de reconocer el analito diana, opcionalmente unida a una molécula etiqueta;

e. Una termopila; y

20 f. Nanopartículas metálicas con banda de plasmón de superficie funcionalizadas con biomoléculas que reconocen específicamente a la biomolécula de detección o la etiqueta con la que fue modificada la biomolécula de detección.

25 donde la detección del analito se realiza al detectar la termopila la conversión de luz a calor de las nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al biosensor de termopilas 2 tal y como éste se ha definido, que comprende:

30 a. Una molécula de reconocimiento (biomolécula de captura), capaz de reconocer el analito diana;

b. Un soporte;

c. Una fuente de luz externa;

- d. Una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección), capaz de reconocer el analito diana, unida a una o varias moléculas de biotina;
- e. Una termopila; y
- f. Nanopartículas metálicas con banda de plasmón de superficie funcionalizadas con moléculas de estreptavidina, avidina o similares, que reconocen específicamente a las moléculas de biotina.

Otro aspecto adicional de la presente invención se refiere al biosensor de termopilas 2 tal y como éste se ha definido, que comprende:

- a. Una molécula de reconocimiento (biomolécula de captura), capaz de reconocer el analito diana;
- b. Un soporte;
- c. Una fuente de luz externa;
- d. Una segunda molécula de reconocimiento (anticuerpo de detección), capaz de reconocer el analito diana;
- e. Una termopila; y
- f. Nanopartículas metálicas con banda de plasmón de superficie funcionalizadas con anticuerpos anti-Fc o anti-IgG que se unen al anticuerpo de detección.

El dispositivo propuesto se trata de un sistema de reconocimiento tipo "sándwich", entre una molécula de "reconocimiento", biomolécula de captura, (ya sea una proteína como puede ser un anticuerpo, una sonda de DNA, PNA, etc.), inmovilizada sobre el soporte donde tendrá lugar el reconocimiento del analito, y una segunda molécula de detección, biomolécula de detección, (un segundo anticuerpo, o una sonda complementaria de DNA) unida a la superficie de la nanopartícula metálica ya sea de forma directa o de forma indirecta indirecta a través de la proteína lectora y/o etiqueta. Funcionalizando los soportes y las nanopartículas con las correspondiente moléculas de reconocimiento, pueden detectarse numerosos analitos siguiendo la misma estrategia.

Adicionalmente, la presente invención se refiere específicamente en los dos últimos aspectos propuestos, a un sistema universal de detección. De hecho se comprueba como, de acuerdo con estos aspectos de la invención, utilizando biomoléculas de detección marcadas con biotina, y funcionalizando las nanopartículas metálicas con

estreptavidina; se pueden utilizar las mismas nanopartículas conjugadas con esta proteína, para el reconocimiento de diferentes analitos, basándose en la interacción avidina-biotina evitando, de esta manera, tener que preparar el conjugado nanopartícula-biomolécula de detección para cada analito a determinar. Asimismo, el sistema de detección basado en la funcionalización de las nanopartículas metálicas con un anticuerpo anti-Fc, capaz de reconocer la región Fc de cualquier otro anticuerpo, podrá utilizar las mismas nanopartículas para el reconocimiento de distintos analitos, siempre que la biomolécula de detección de este sistema sea un anticuerpo.

Además, la presente invención se refiere a los siguientes procedimientos de detección de análisis.

(1) Procedimiento para la detección de un analito que comprende:

- a. Añadir la muestra, donde está presente el analito a determinar, a un soporte que presente inmovilizada la molécula de reconocimiento del analito (biomolécula de captura);
- b. Incubar el soporte de la etapa a) con nanopartículas metálicas funcionalizadas con una segunda molécula de reconocimiento del analito (biomolécula de detección);
- c. Irradiar el soporte de la etapa b) o c) con la fuente de luz externa; y
- d. Llevar a cabo la detección del analito a través de la utilización de una termopila capaz de detectar la conversión de luz a calor de las nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.

(2) Procedimiento para la detección de un analito que comprende:

- a. Añadir la muestra, donde está presente el analito a determinar, a un soporte que presente inmovilizada la molécula de reconocimiento del analito (biomolécula de captura);
- b. Incubar el soporte de la etapa a) con una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección) del analito unida al menos a una molécula etiqueta;
- c. Incubar el soporte de la etapa b) con nanopartículas metálicas funcionalizadas con al menos una molécula que se une específicamente a la etiqueta;

- d. Irradiar el soporte de la etapa c) o d) con la fuente de luz externa; y
- e. Llevar a cabo la detección del analito a través de la utilización de una termopila capaz de detectar la conversión de luz a calor de las nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.

5

En una realización preferida del procedimiento arriba indicado, la molécula etiqueta es biotina y la molécula que se une específicamente a la etiqueta es avidina o estreptavidina o la molécula etiqueta es avidina o estreptavidina y la molécula que se une específicamente a la etiqueta es biotina.

10

(3) Procedimiento para la detección de un analito que comprende:

- a. Añadir la muestra, donde está presente el analito a determinar, a un soporte que presente inmovilizada la molécula de reconocimiento del analito (biomolécula de captura);
- b. Incubar el soporte de la etapa a) con una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección) que se trata de un anticuerpo de detección;
- c. Incubar el soporte de la etapa b) con nanopartículas metálicas funcionalizadas con anticuerpos anti-Fc;
- d. Irradiar el soporte de la etapa c) con la fuente de luz externa y
- e. Llevar a cabo la detección del analito a través de la utilización de una termopila capaz de detectar la conversión de luz a calor de las nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.

15

20

25

(4) Procedimiento para la detección de un analito que comprende:

- a. Añadir a una muestra, donde esté presente el analito a determinar, nanopartículas metálicas funcionalizadas con una segunda molécula de reconocimiento del analito (biomolécula de detección);
- b. Extraer el analito con las nanopartículas de la muestra de la etapa a);
- c. Añadir la extracción de la etapa b, a un soporte que presente inmovilizada la molécula de reconocimiento del analito (biomolécula de captura);
- e. Irradiar el soporte de la etapa c) con la fuente de luz externa; y

30

f. Llevar a cabo la detección del analito a través de la utilización de una termopila capaz de detectar la conversión de luz a calor de las nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.

5 Los biosensores de la presente invención se pueden utilizar, pero sin limitación alguna, para la detección de aditivos, fármacos, microorganismos patógenos, componentes de los alimentos, pesticidas, compuestos tóxicos o en el análisis de la demanda bioquímica de oxígeno. Los biosensores de la presente invención se pueden utilizar para la detección de cualquier tipo de analito tanto de forma cualitativo como
10 cuantitativa.

Los siguientes ejemplos tienen una función meramente ilustrativa de la presente invención.

15 Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis de nanopartículas metálicas

- 20 - Síntesis de nanopartículas de oro: La síntesis de nanopartículas de oro se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Turkevich et al. "*A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold*", Discussions of the Faraday Society 1951, 11, 55-75. De acuerdo con este método 200 ml de una solución de 0.01% de ácido tetracloraúrico en agua se lleva a 100°C en agitación, y posteriormente se añade 5 ml de una solución 1% de citrato trisódico
25 como agente reductor. Una vez formadas las nanopartículas, la disolución que presenta color rojo, se deja agitando hasta que alcance la temperatura ambiente. Se obtienen nanopartículas esféricas de oro de 14-16nm de diámetro con una banda de plasmón de superficie a 519nm.

- 30 - Síntesis de nanoprismas triangulares de oro: La síntesis de nanoprismas triangulares de oro se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Pelaz et al. "*Tailoring the synthesis and heating ability of gold nanoprisms for bioapplications*", Langmuir 2012, 28, 8965-70. De acuerdo con este método, 100 ml de una solución 2mM de ácido tetracloroaurico se mezcla con 120 ml de una

solución 0.5mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, dejándose en agitación durante 9 minutos, tras lo cual se realiza una segunda adición de un volumen entre 20-50ml de la solución 0.5mM de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Se obtienen nanotriángulos de oro de tamaño comprendido entre 100-160 nm, que presentan una banda de plasmón de superficie entre 750-1075nm. Antes de su conjugación con distintas biomoléculas, los nanoprismas deben ser pasivados, mediante la unión de un polietilenglicol (HS-PEG-COOH, 5000g/mol). Para ello, 10ml de la solución de nanoprismas es incubada con 1mg de PEG en una solución de NaOH pH12, durante toda la noche. Finalmente estos nanoprismas son centrifugados durante 15 minutos a 10.000 rpm para eliminar el exceso de reactivos.

- Síntesis de nanoprismas triangulares de plata: La síntesis se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Zhang, Q et al, "A systematic study of the synthesis of silver nanoplates: Is citrate a "Magic" reagent?", Journal of the American chemical Society 2011, 133 (46), 18931-18939. De acuerdo con este método, 24.14 mL de agua milli Q, se añade a una solución acuosa de nitrato de plata (0.05 M, 50 uL), citrato trisódico (75 mM, 0.5 mL), y agua oxigenada (30% wt, 60 uL), y se mezclan agitando vigorosamente a temperatura ambiente. Finalmente se añade rápidamente una solución de borohidruro sódico (NaBH_4 , 100 mM, 250 uL) para conseguir la formación de estos nanoprismas. Después de 3 minutos aproximadamente, la solución coloidal pasa de un color amarillo oscuro debido a la formación de pequeñas partículas de plata a un color azulado generado por los nanoprismas finales. Se obtienen nanotriángulos de plata de 70 nm, que presentan una banda de plasmón de superficie sobre 700 nm.

- Síntesis de nanocubos de cobre: La síntesis se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Murphy et al. "Solution-phase synthesis of Cu_2O nanocubes", Nano Letters 2002, 3 (2), 231-234. De acuerdo con este método, se añade 0.25 mL de una solución acuosa de CuSO_4 a 9 mL de una solución acuosa de CTAB (bromuro de cetil-trimetil amonio) con una concentración variable de 0.01-0.1 M. Seguidamente, se añade 0.5 mL de una solución acuosa 0.1 M de ascorbato sódico sobre la solución de Cu(II) -CTAB. Las soluciones se calentaron durante 5 minutos a 55°C. Una vez concluido este tiempo, se añade 0.2 mL de hidróxido sódico 0.5 M, produciendo la aparición inmediata de un color amarillo en la solución. Las soluciones se mantienen a 55 °C otros 10 min y se dejan enfriar a

temperatura ambiente. Después de 30 minutos, las soluciones viran a un color morado rojizo, amarillo claro, o a amarillo oscuro dependiendo de la concentración de CTAB utilizada. Las partículas se centrifugan a 6000 rpm durante 15 minutos, y luego son resuspendidas en agua. Este proceso se repite dos veces para la eliminación del surfactante. En este punto los nanocubos en solución presentan un color rojo ladrillo en todos los casos. Se obtienen nanocubos de cobre con un tamaño aproximado de 420 nm, con diferentes cambios en su geometría según la cantidad del surfactante CTAB empleada en la síntesis.

Ejemplo 2: Funcionalización de las nanopartículas metálicas

Para poner en práctica la presente invención se funcionalizaron distintos tipos de nanopartículas sintetizadas con diversos elementos de reconocimiento tales como anticuerpos, DNA o PNA. Aquí exponemos algunos ejemplos de funcionalización.

- Funcionalización de nanoprismas triangulares de oro con anticuerpos: La funcionalización se llevó a cabo a través de la inmovilización del anticuerpo sobre los grupos carboxilo presentes en la superficie de la nanopartícula, a través de la química de la carbodiimida. Primero se realiza una activación de 0.5 mg de nanopartícula con 1.5 μ moles de EDC y 3.5 μ moles de sulfo-NHS, en un volumen final de 1 ml de MES pH 6 10mM, durante 30 minutos a 37°C. El exceso de reactivos puede ser eliminado tanto por centrifugación a 6000 rpm durante 5 minutos, tras lo cual las partículas son suspendidas en MES pH6 10mM; o mediante el uso de una columna de filtración en gel. Una vez activados los grupos carboxilos de las nanopartícula, éstas se incuban con 2.5 μ g de anticuerpo en un volumen final de 1ml de MES pH6 10mM durante 1 hora a 37°C. Tras la unión del anticuerpo, la superficie de la nanopartícula es bloqueada con 50mM de PEG aminado de 750 Da (α -metoxi- ω -amino polietilenglicol). Finalmente las nanopartículas son purificadas tras varios ciclos de centrifugación a 6000 rpm durante 5 minutos.
- Funcionalización de nanoprismas triangulares de oro con estreptavidina: La funcionalización se llevó a cabo a través de la inmovilización de las moléculas de estreptavidina sobre los grupos carboxilo presentes en la superficie de la

nanopartícula, a través de la química de la carbodiimida. Primero se realiza una activación de 0.5 mg de nanopartículas con 1.5 umoles de EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) y 3.5 umoles de sulfo-NHS (sulfo-N-hidroxisuccinimida), en un volumen final de 1 ml de MES pH 6 10mM, durante 30 minutos a 37°C. El exceso de reactivos puede ser eliminado tanto por centrifugación a 6000 rpm durante 5 minutos, tras lo cual las partículas son suspendidas en MES pH6 10mM; o mediante el uso de una columna de filtración en gel. Una vez activados los grupos carboxilos de las nanopartículas, éstas se incuban con 1.25 µg de estreptavidina en un volumen final de 1ml de MES pH6 10mM durante 1 hora a 37°C. Tras la unión de la proteína, la superficie de la nanopartícula es bloqueada con 50mM de PEG aminado de 750 Da (α -metoxi- ω -amino polietilenglicol). Finalmente las nanopartículas son purificadas tras varios ciclos de centrifugación a 6000 rpm durante 5 minutos.

15 Ejemplo 3: Detección del marcador CEA en una muestra utilizando el biosensor de la presente invención.

Una vez sintetizados y caracterizados los nanoprismas de oro (tanto por microscopia electrónica de transmisión y barrido como por espectroscopia ultravioleta-visible), fueron funcionalizados con anticuerpos monoclonales anti-CEA, Ab3C6 (Monoclonal mouse anti-carcinoembryonic antigen 4CA30-3C6, HyTest) y también con la proteína estreptavidina. Para comprobar que las moléculas inmovilizadas sobre los nanoprismas mantenían su actividad biológica, se inmovilizó la correspondiente biomolécula a distintas concentraciones (el marcador CEA o el anticuerpo conjugado con biotina) sobre una membrana de nitrocelulosa; tras incubarse con las nanopartículas funcionalizadas se irradiaron con el láser las membranas depositadas en la superficie termosensible.

El reconocimiento CEA + Anticuerpo anti-CEA 3C6-nanoprismas se ilustra en la figura 2a. El reconocimiento anticuerpo anti-CEA 3C6-Biotina + Estreptavidina-nanoprismas se ilustra en la figura 2b.

Al producirse el reconocimiento molecular, los nanoprismas de oro quedan sobre la membrana, y tras ser irradiada con el láser, la energía absorbida por las nanopartículas es liberada en forma de calor registrándose una señal en la superficie termosensible (ver figuras 2a y 2b). En ambos casos las señales obtenidas tras irradiar las muestras con el láser indicaban que se había producido el reconocimiento antígeno-anticuerpo ó estreptavidina-biotina, y por tanto las biomoléculas conjugadas a los nanoprismas mantenían su actividad. Por otro lado tanto las superficies donde tiene lugar el reconocimiento como la superficie de la nanopartícula habían sido pasivadas de forma que no se producen interacciones inespecíficas cuando no hay proteína inmovilizada en la membrana de nitrocelulosa, tal como puede observarse en la muestra 0.

El elemento de reconocimiento del sensor, en este caso el anticuerpo anti-CEA Ab3C1, Monoclonal mouse anti-carcinoembryonic antigen 4CA30-3C1, HyTest se inmovilizó sobre la superficie sensora siguiendo diversas metodologías. Se unió mediante enlaces covalentes a superficies de vidrio, así como mediante adsorción física sobre diferentes membranas de celulosa y nitrocelulosa. A continuación se muestran los resultados obtenidos utilizando membranas de nitrocelulosa con el anticuerpo adsorbido sobre la superficie. Se probaron las dos estrategias descritas anteriormente; se utilizaron los nanoprismas funcionalizados con el anticuerpo directamente y se utilizaron los nanoprismas funcionalizados con estreptavidina después de añadir el anticuerpo anti CEA 3C6 conjugado con biotina. Fueron analizadas distintas muestras con una concentración decreciente del marcador tumoral CEA diluido en PBS. Tras realizar las etapas de reconocimiento descritas en el procedimiento experimental, y una vez secas las membranas se depositaron sobre la superficie termosensible, en este caso sobre papel térmico, para ser irradiadas durante unos segundos con un láser de emisión en el infrarrojo cercano (con una longitud de onda de 1000 nm).

El reconocimiento Anticuerpo antiCEA 3C1 + CEA + Anticuerpo anti-CEA 3C6-Nanoprismas se ilustra en la figura 3a. El reconocimiento anticuerpo anti-CEA 3C1 + CEA + Anticuerpo anti-CEA 3C6-Biotina + Estreptavidina-Nanoprismas se ilustra en la figura 3b.

Como puede observarse en las figuras anteriores, la señal producida en la superficie termosensible generada por la irradiación de los nanoprismas una vez producido el reconocimiento del analito, es más intensa para el sistema Anticuerpo 3C1-CEA-

Ab3C6-nanoprismas que para el sistema Anticuerpo 3C1-CEA-Ab3C6 Biotina-Estreptavidina-nanoprismas de oro; pero en ambos casos se llega a detectar una concentración de 0.5 ng CEA/ml. Por otro lado, como control negativo, se comprobó que al realizar el mismo experimento pero utilizando nanopartículas esféricas de oro de
5 16 nm de diámetro funcionalizadas con anticuerpo anti-CEA 3C6 (que no presentan banda de absorción a la longitud de onda de emisión del láser utilizado), no se obtenía ninguna señal, tal como se muestra en la figura 4 (ver figura 4 donde se muestra el reconocimiento Anticuerpo anti-CEA 3C1 + CEA+ Anticuerpo anti-CEA 3C6-
10 Nanopartículas de oro, donde se utilizaron nanopartículas esféricas de oro de 16 nm de diámetro que no presentan banda de absorción a la longitud de onda de emisión del láser utilizado).

Para mejorar la sensibilidad del método pueden variarse diferentes parámetros como son el tiempo de irradiación de la muestra con el láser y la distancia del mismo a la
15 superficie sensora. En la figura 5 puede observarse como a una menor distancia entre el láser y la superficie, es necesario menos tiempo de irradiación y se obtiene una señal más intensa.

La figura 5 ilustra el reconocimiento anticuerpo anti-CEA 3C1 + CEA + Ab anti-CEA
20 3C6-nanoprismas de oro con distintos tiempos de irradiación, y diferente distancia entre la superficie y el láser. En la figura 5a se utiliza un tiempo de irradiación de 10 segundos a una distancia de 0.5cm ; en la figura 5b se utilize un tiempo de irradiación de 2 segundos 0.1 cm.

25 Finalmente se llevo a cabo el mismo experimento tipo "sándwich" (Ab3C1 + CEA + Ab3C6-Nanoprismas de oro) para la detección del marcador tumoral CEA en muestras de plasma sanguíneo, para comprobar la especificidad del sistema así como el límite de detección del analito en una muestra compleja. Se comparó con los resultados obtenidos para la determinación de CEA disuelto en tampón PBS. En ambos casos se
30 obtuvo un límite de detección de 10 pg de CEA/ml, como puede observarse en la figura 6. Además ni en el control ni en la muestra de plasma sin CEA se obtuvo ningún tipo de interacción inespecífica.

Ejemplo 4. Ejemplo comparativo utilizando como medio de detección una cámara de infrarrojos.

Para el presente experimento se se utilizaron las mismas muestras preparadas para el ejemplo 3. El elemento de reconocimiento del sensor, en este caso el anticuerpo anti-CEA Ab3C1, se inmovilizó mediante adsorción física sobre una membrana de nitrocelulosa. A continuación fueron analizadas distintas muestras con una concentración decreciente del marcador tumoral CEA diluido en plasma sanguíneo. Tras realizar las etapas de reconocimiento, mediante las nanopartículas funcionalizadas con el anticuerpo anti-CEA Ab3C6, descritas en el procedimiento experimental, y una vez secas las membranas se depositaron sobre papel térmico,

Se utilizó un láser de emisión en el infrarrojo cercano, a una longitud de onda de 1000 nm para irradiar las nanopartículas. Como sistemas de detección del calor generado por las nanopartículas tras ser irradiadas con el láser, se utilizó una cámara térmica de detección en el infrarrojo (cámara IR), capaz de transformar el calor generado por las nanopartículas irradiadas, en una medida cuantificable.

Se comprobó el incremento de temperatura, con la cámara IR, tras irradiar las muestras preparadas para la detección del antígeno CEA en plasma sanguíneo a distintas concentraciones. Tras ser irradiadas unos segundos con el láser, la cámara IR registró un incremento de temperatura de 2-3°C para la muestra de 0.05ng CEA/ml, pero no se obtuvo señal en el caso de la muestra de 0.01 ng CEA/ml. Para estas mismas concentraciones de analito si se había visto señal en el caso del papel térmico, tras ser irradiadas las muestras con el láser.

Se obtuvo un límite de detección de menor orden mediante la detección visual utilizando el soporte sobre una superficie termosensible como es el papel térmico, que utilizando la cámara de infrarrojos como medio de detección.

La figura 7 compara el reconocimiento anticuerpo anti-CEA 3C1 + CEA + Ab anti-CEA 3C6-nanoprismas de oro entre la detección visual mediante el papel térmico (figura 7a) y la cámara IR como sistema de detección (figura 7b).

Ejemplo 5. Experimentos de detección con termopila:

En este caso se midió el calor generado por las nanopartículas tras ser irradiadas por el laser mediante una termopila, capaz de transformar el incremento de temperatura, generado en un área determinada a su alrededor, en una señal eléctrica cuantificable.

Con el diseño descrito en la figura 8, se irradiaron con el laser (a una potencia de 350mW) tanto la muestra concentrada como la diluida, en la membrana y en el cubre de vidrio. El primer problema que se encontró es que si el laser incide directamente en la pila, se obtiene una señal de fondo muy elevada (por lo que era necesario un incremento de la temperatura suficientemente alto para ser distinguible de la señal de fondo). También se obtiene una respuesta si se irradia solo la membrana o el cubre sin nanopartículas (el vidrio dan una señal más alta que la membrana de nitrocelulosa).

Con la muestra diluida se obtuvo una respuesta muy similar al control, mientras que con la concentrada podía medirse perfectamente el incremento de temperatura. Hay que tener en cuenta que en este diseño la muestra quedaba alejada 3-4 cm del laser, por lo que la sensibilidad va a ser más baja que si está directamente en contacto con el laser.

Se intentó realizar un calibrado con distintas concentraciones de nanopartículas depositados sobre la membrana de nitrocelulosa, para los diseños representados en la figura 8, esquemas 2 y 3. En el caso del esquema 2, no se obtuvieron resultados ya que no podía irradiar la muestra de forma reproducible con el laser en esa posición. Se llevo a cabo el experimento con el diseño como se indica en el esquema 3.

Se prepararon tres disoluciones de 140µg/ml, 14µg/ml y 1.4µg/ml de NNs y se depositó 1µl de cada una sobre membranas de nitrocelulosa (140ng, 14ng y 1.4ng NNs → 6×10^9 , 6×10^8 y 6×10^7 nanopartículas). Se irradió con el laser durante unos segundos, y se realizó la lectura con la termopila antes y después de poner la muestra. Entre muestra y muestra, se recuperaba la señal de fondo. Para la solución más diluida (1.4ng NNs) se registraba una señal un poco superior a la señal de fondo; con la muestra de 14ng se obtenía claramente distinguible; la muestra más concentrada daba una señal muy elevada. Para realizar un calibrado que se ajuste a un rango lineal

habría que utilizar una serie de disoluciones de baja concentración, ya que a partir de un cierto valor de concentración, se obtiene un incremento exponencial de la temperatura con la concentración de nanopartículas.

Reivindicaciones

1. Un biosensor para la detección visual que comprende:

- 5
- a. Una molécula de reconocimiento (biomolécula de captura), capaz de reconocer el analito diana;
 - b. Un soporte con una superficie termosensible donde inmovilizar la molécula de reconocimiento de la etapa a);
 - c. Una fuente de luz externa;
 - 10 d. Una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección), capaz de reconocer el analito diana; y
 - e. Una nanopartícula metálica que presenta banda de plasmón de superficie;

15 donde la detección del analito se realiza de forma visual por el cambio de color en las zonas del soporte en que el analito esté presente. producido como consecuencia del calor generado por las nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.

2. Un biosensor que para la detección visual comprende:

- 20
- a. Una molécula de reconocimiento (biomolécula de captura), capaz de reconocer el analito diana, inmovilizada sobre un soporte con una superficie termosensible;
 - b. Una fuente de luz externa; y
 - 25 c. Una nanopartícula metálica que presenta banda de plasmón de superficie funcionalizada con una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección), capaz de reconocer el analito diana;

30 donde la detección del analito se realiza de forma visual por el cambio de color en las zonas del soporte en que el analito esté presente, producido como consecuencia del calor generado por las nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.

3. Un biosensor que para la detección visual comprende:

- a. Una molécula de reconocimiento (biomolécula de captura), capaz de reconocer el analito diana;

- b. Un soporte con una superficie termosensible;
- c. Una fuente de luz externa;
- d. Una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección), capaz de reconocer el analito diana, opcionalmente unida a una molécula etiqueta; y
- e. Nanopartículas metálicas con banda de plasmón de superficie funcionalizadas con biomoléculas que reconocen específicamente a la biomolécula de detección o la etiqueta con la que fue modificada la biomolécula de detección;

5

10

donde la detección del analito se realiza de forma visual por el cambio de color en las zonas del soporte en que el analito esté presente, producido como consecuencia del calor generado por las nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.

15

- 4. Un biosensor según la reivindicación 3, donde la molécula etiqueta es biotina y la molécula que se une específicamente a la etiqueta es avidina o estreptavidina o donde la molécula etiqueta es avidina o estreptavidina y la molécula que se une a la etiqueta es biotina.

20

- 5. Un biosensor según la reivindicación 3, donde la segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección) es un anticuerpo y la nanopartícula metálica que presenta banda de plasmón de superficie está funcionalizada con un anticuerpo anti-Fc capaz de reconocer la región Fc de la biomolécula de detección.

25

- 6. Un biosensor según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde las moléculas de reconocimiento se seleccionan de la lista que consiste en anticuerpos, péptidos, enzimas, polisacáridos, ácidos nucleicos (DNA), aptámeros o ácidos nucleicos peptídicos (PNAs).

30

- 7. Un biosensor según reivindicación 6, donde las moléculas de reconocimiento son anticuerpos, DNAs o PNAs.

8. Un biosensor según reivindicaciones 1-7, donde la fuente de luz externa es una luz monocromática.
9. Un biosensor según reivindicaciones 1-8, donde la nanopartícula metálica se selecciona de la lista que consiste en:
- a. Nanopartículas de oro
 - b. Nanopartículas de plata; o
 - c. Nanopartículas de cobre.
10. Un biosensor según la reivindicación 9, donde la nanopartícula metálica es un nanoprisma triangular de oro.
11. Un biosensor según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la superficie termosensible del soporte es un papel termosensible.
12. Un biosensor según la reivindicación 11 donde el papel termosensible se combina con un soporte seleccionado de la lista que consiste en membranas de celulosa, nitrato de celulosa, acetate de celulosa, poliestireno, ceramica, silicio o vidrio.
13. Procedimiento para la detección de un analito que comprende:
- a. Añadir la muestra, donde está presente el analito a determinar, a un soporte que presente inmovilizada la molécula de reconocimiento del analito (biomolécula de captura);
 - b. Incubar el soporte de la etapa a) con nanopartículas metálicas funcionalizadas con una segunda molécula de reconocimiento del analito (biomolécula de detección); y
 - c. Opcionalmente, colocar el soporte sobre una superficie termosensible si el soporte no comprendiese ya dicha superficie; e
 - d. Irradiar el soporte de la etapa b) o c) con la fuente de luz externa.
14. Procedimiento para la detección de un analito que comprende:
- a. Añadir la muestra, donde está presente el analito a determinar, a un soporte que presente inmovilizada la molécula de reconocimiento del analito (biomolécula de captura);

- b. Incubar el soporte de la etapa a) con una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección) del analito unida al menos a una molécula etiqueta;
- c. Incubar el soporte de la etapa b) con nanopartículas metálicas funcionalizadas con al menos una molécula que se une específicamente a la etiqueta; y
- d. Opcionalmente, colocar el soporte sobre una superficie termosensible si el soporte no comprendiese ya dicha superficie; e
- e. Irradiar el soporte de la etapa c) o d) con la fuente de luz externa.

15. Procedimiento según la reivindicación 14, donde la molécula etiqueta es biotina y la molécula que se une específicamente a la etiqueta es avidina o estreptavidina o donde la molécula etiqueta es avidina o estreptavidina y la molécula que se une específicamente a la etiqueta es biotina.

16. Procedimiento para la detección de un analito que comprende:

- a. Añadir la muestra, donde está presente el analito a determinar, a un soporte que presente inmovilizada la molécula de reconocimiento del analito (biomolécula de captura);
- b. Incubar el soporte de la etapa a) con una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección) que se trata de un anticuerpo de detección;
- c. Incubar el soporte de la etapa b) con nanopartículas metálicas funcionalizadas con anticuerpos anti-Fc; y
- d. Opcionalmente, colocar el soporte sobre una superficie termosensible si el soporte no comprendiese ya dicha superficie; e
- e. Irradiar el soporte de la etapa c) o d) con la fuente de luz externa

17. Procedimiento para la detección de un analito que comprende:

- a. Añadir a una muestra, donde esté presente el analito a determinar, nanopartículas metálicas funcionalizadas con una segunda molécula de reconocimiento del analito (biomolécula de detección);
- b. Extraer el analito con las nanopartículas de la muestra de la etapa a);

- c. Añadir la extracción de la etapa b, a un soporte que presente inmovilizada la molécula de reconocimiento del analito (biomolécula de captura);
 - d. Opcionalmente, colocar el soporte sobre una superficie termosensible si el soporte no comprendiese ya dicha superficie; e
 - 5 e. Irradiar el soporte de la etapa c) o d) con la fuente de luz externa.
18. Uso de un biosensor según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, para la detección de aditivos, fármacos, microorganismos patógenos, componentes de los alimentos, pesticidas, compuestos tóxicos o en el análisis de la demanda
- 10 bioquímica de oxígeno.

Figuras

Fig. 1

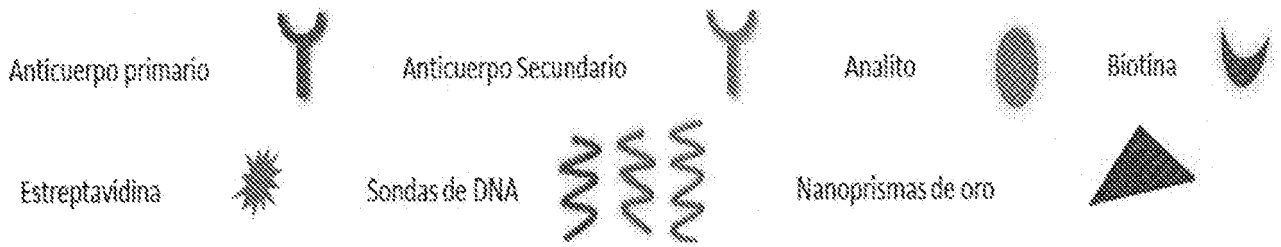
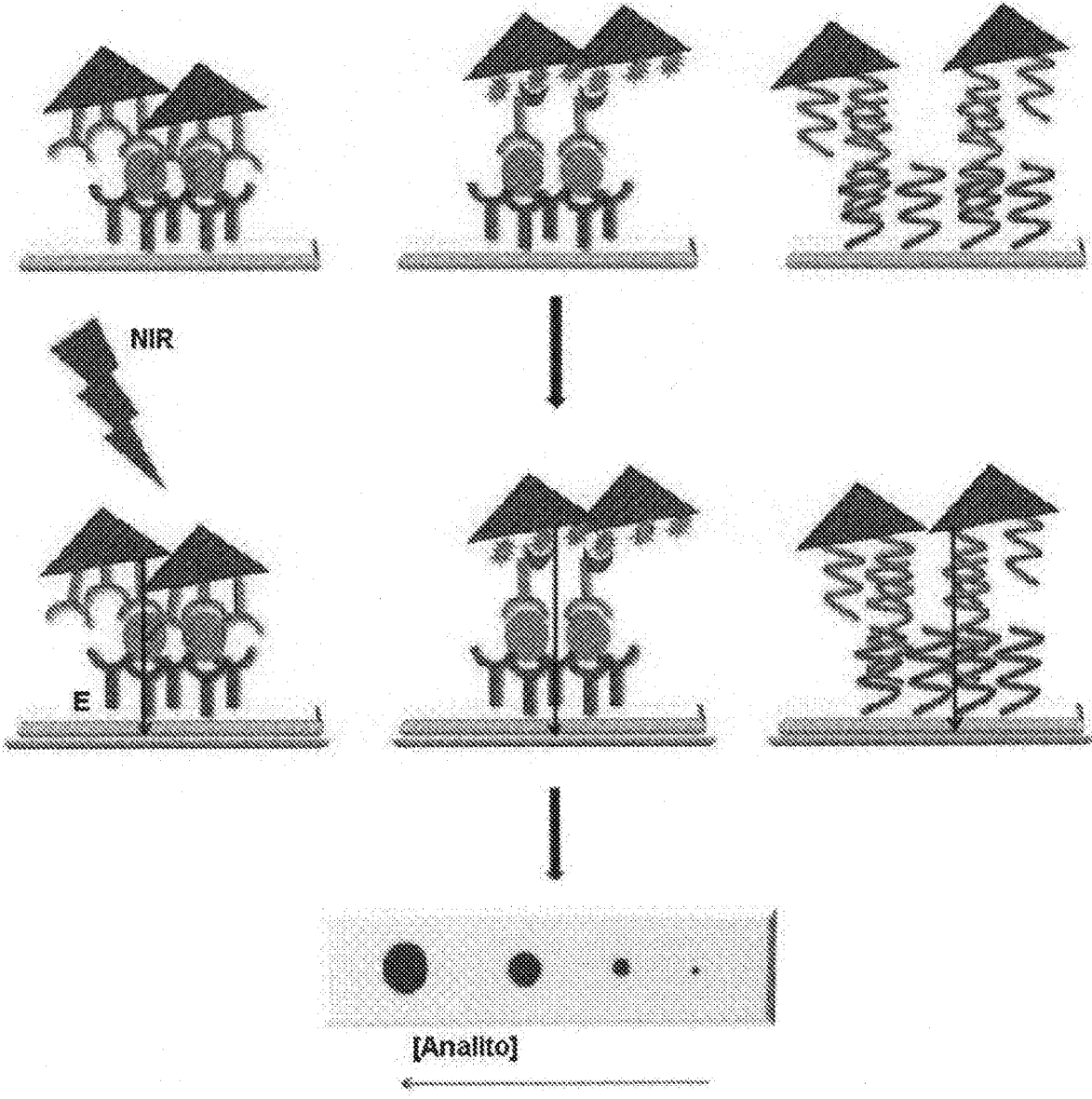


Fig.2

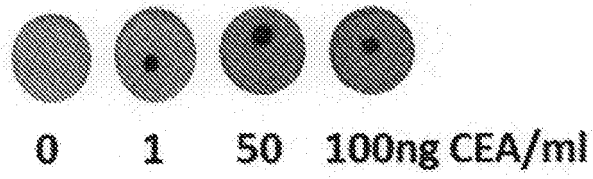


Fig. 2a

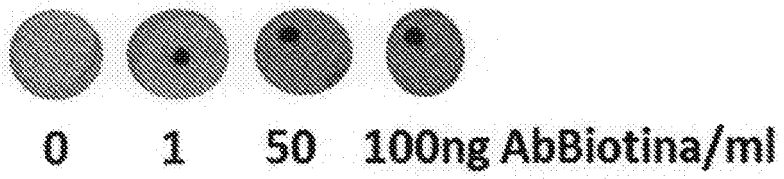


Fig. 2b

Fig.3

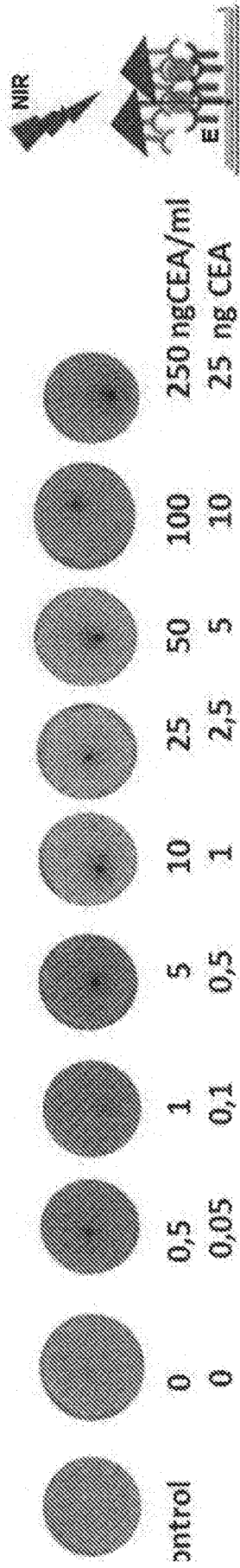


Fig. 3a

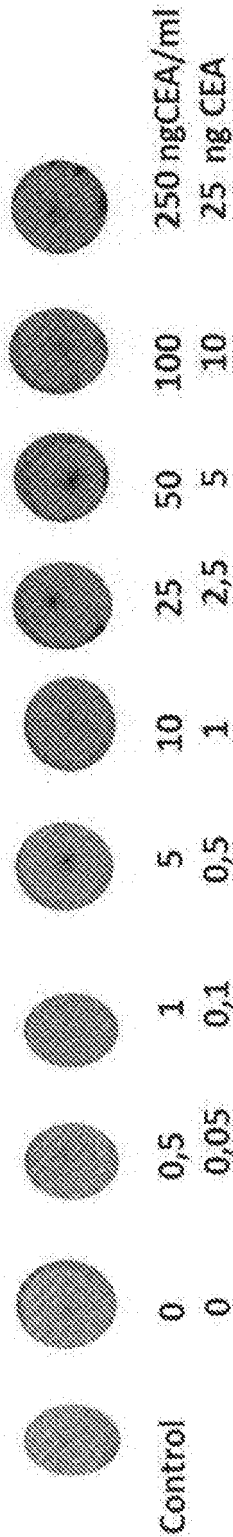
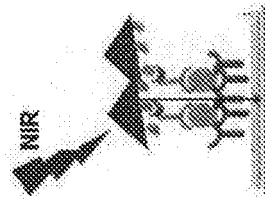


Fig. 3b

Fig. 4

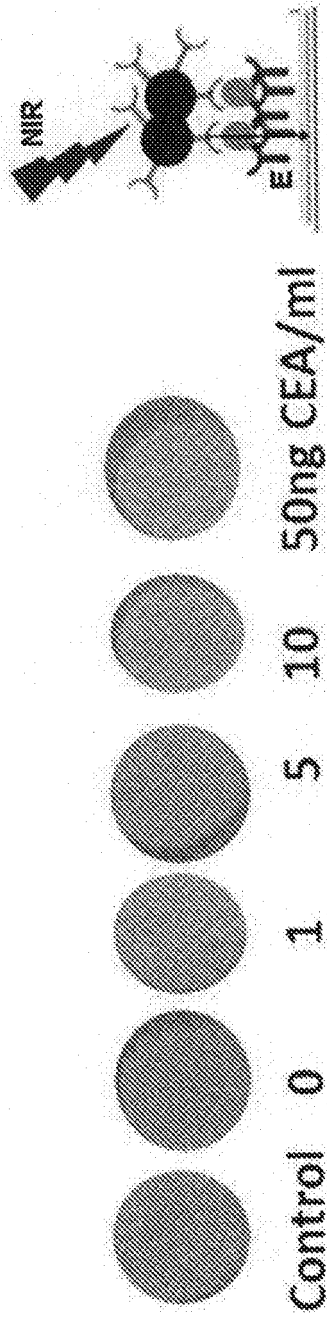


Fig. 5

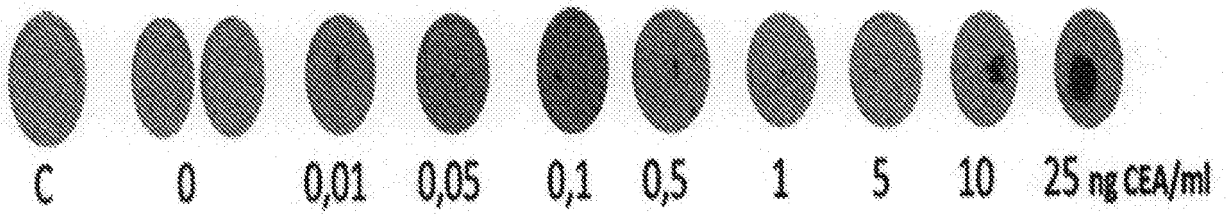


Fig. 5a

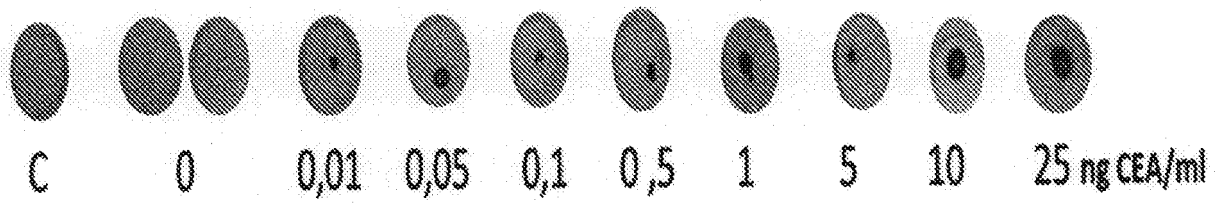


Fig. 5b

Fig. 6

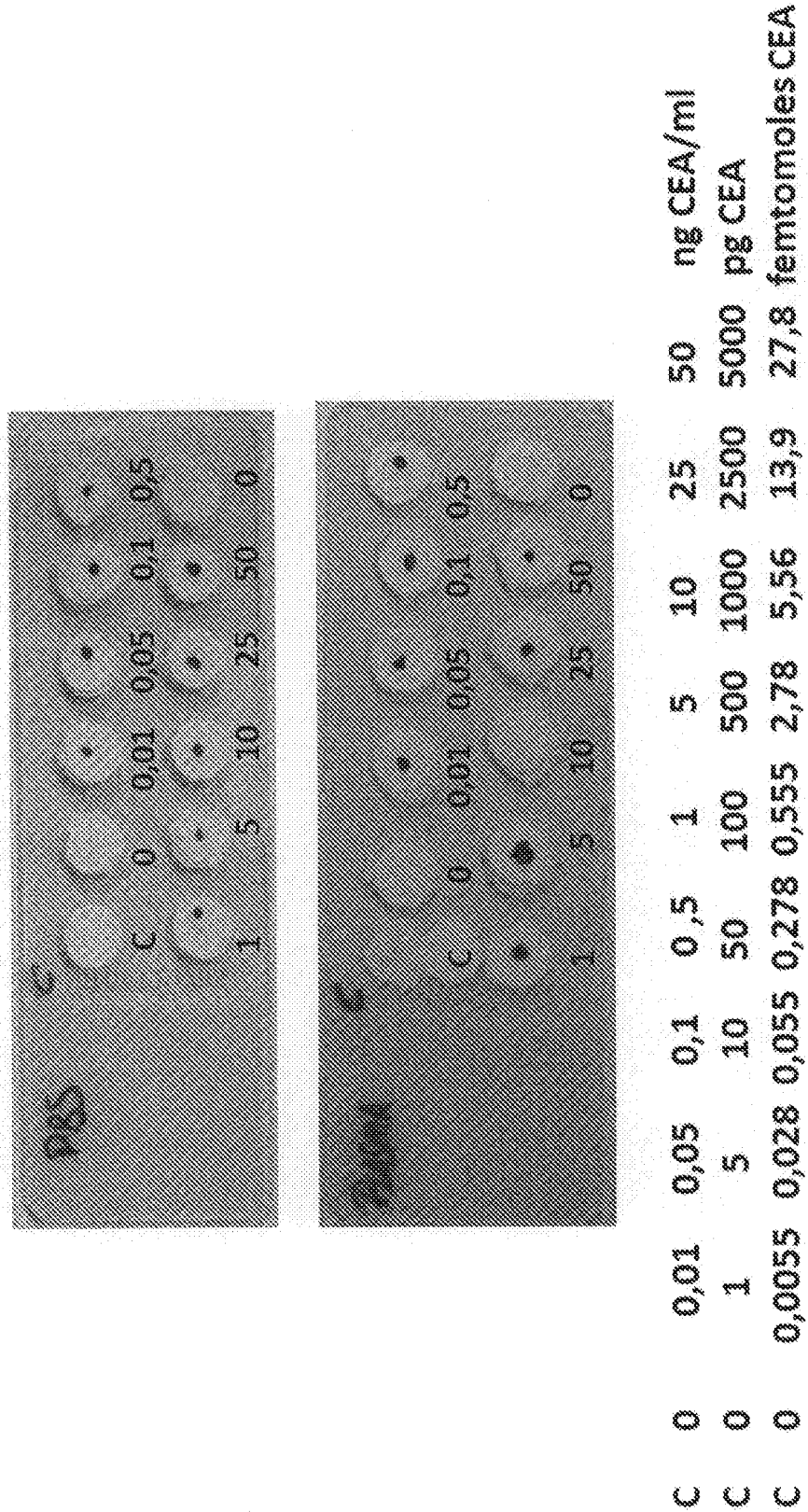


Fig. 7

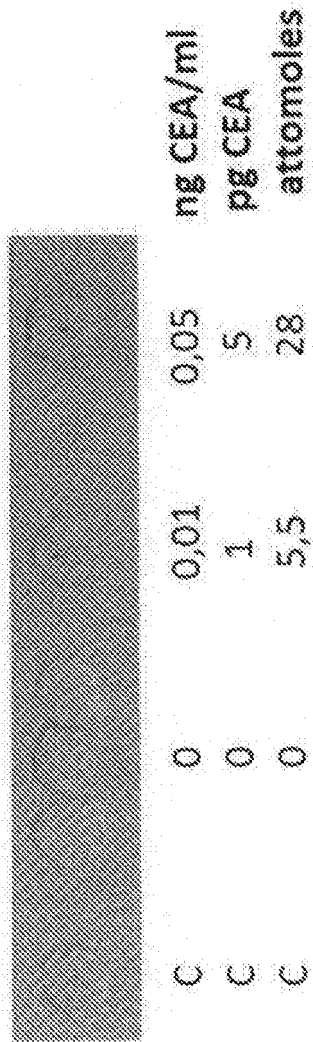
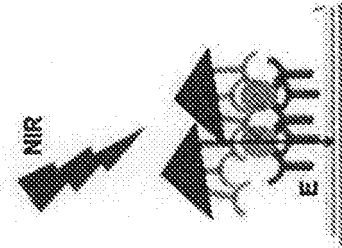


Fig. 7a

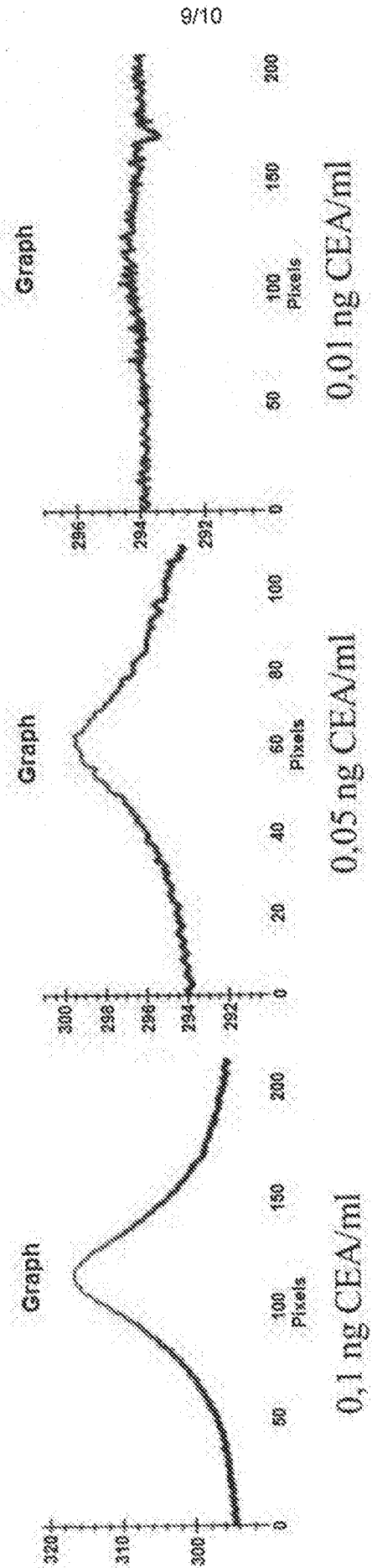
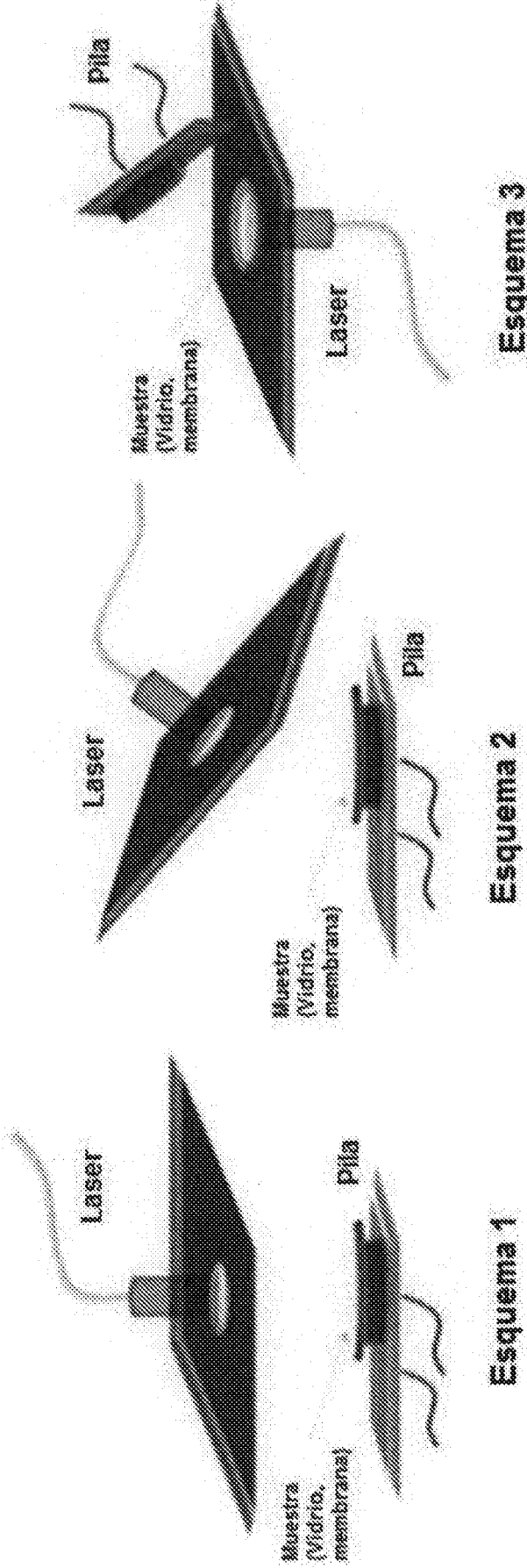


Fig. 7b

Fig. 8



INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2013/070549

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD **INV. G01N33/543 G01N21/55**

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación) **G01N**

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos v. si es posible, términos de búsqueda utilizados) **EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, COMPENDEX, INSPEC**

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	<p>HAES A J ET AL: "DETECTION OF A BIOMARKER FOR ALZHEIMER'S DISEASE FROM SYNTHETIC AND CLINICAL SAMPLES USING A NANOSCALE OPTICAL BIOSENSOR", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, ACS PUBLICATIONS, US, vol. 127, no. 7, 23 Feb 2005 (2005-02-23), páginas 2264-2271, XP002568084, ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/JA044087Q [recuperado el 2005-01-27] todo el documento resumen página 2266, columna de derecha, párrafo 3 - página 2267, columna de izquierda, párrafo 2 figura 1</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: right;">-/--</p>	1-18

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional 13/12/2014	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 07/01/2014
---	--

<p>Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016</p> <p>N° de fax</p>	<p>Funcionario autorizado Gall-Truchot, A</p> <p>N° de teléfono</p>
---	---

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2013/070549

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	<p>PISSUWAN D ET AL: "Functionalised gold nanoparticles for controlling pathogenic bacteria", TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 28, no. 4, 1 April 2010 (2010-04-01), páginas 207-213, XP026970359, ISSN: 0167-7799 [recuperado el 12.01.2010] Todo el documento Resumen página 207, columna de derecha, parágrafo 2 - página 209, columna de derecha, parágrafo 2 figuras 2-3 página 209, columna de derecha, último parágrafo página 211, columna de izquierda, último parágrafo - columna de derecha, parágrafo 3 página 212, columna de izquierda, último parágrafo - columna de derecha, parágrafo 1</p>	1-18
A	<p>SABINE SZUNERITS ET AL: "Sensing using localised surface plasmon resonance sensors", CHEMICAL COMMUNICATIONS, vol. 48, no. 72, 1 Enero 2012 (2012-01-01), páginas 8999-9010, XP055090920, ISSN: 1359-7345, DOI: 10.1039/c2cc33266c Todo el documento Resumen página 9002, columna de izquierda, parágrafo 3 - columna de derecha, parágrafo 2</p>	1-18
A	<p>ELEONORA PETRYAYEVA ET AL: "Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensingA review", ANALYTICA CHIMICA ACTA, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 706, no. 1, 9 August 2011 (2011-08-09), pages 8-24, XP028312481, ISSN: 0003-2670, DOI: 10.1016/J.ACA.2011.08.020 [recuperado el 2011-09-01] Todo el documento Resumen página 15, columna de izquierda, último parágrafo - página 22, columna de derecha, parágrafo 2</p>	1-18

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2013/070549

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	<p>HONGWEI LIAO ET AL: "Biomedical applications of plasmon resonant metal nanoparticles", NANOMEDICINE, vol. 1, no. 2, 1 Agosto 2006 (2006-08-01), páginas 201-208, XP055092689, ISSN: 1743-5889, DOI: 10.2217/17435889.1.2.201</p> <p>Todo el documento Resumen página 202, columna de izquierda, último párrafo - columna de derecha, párrafo 2 página 202, columna de derecha, último párrafo - página 204, columna de izquierda, párrafo 1</p> <p>página 204, columna de izquierda, párrafo 2 página 205, columna de derecha, párrafo 1 -----</p>	1-18
A	<p>MICHAEL B. CORTIE ET AL: "<title>Plasmonic heating of gold nanoparticles and its exploitation</title>", PROCEEDINGS OF SPIE, vol. 5649, 28 Febr 2005 (2005-02-28), páginas 565-573, XP055093379, ISSN: 0277-786X, DOI: 10.1117/12.582207</p> <p>Todo el documento Resumen página 571, último párrafo - página 572, párrafo 2 -----</p>	1-18
A	<p>NEARINGBURG B ET AL: "Characterization of surface plasmon energy transduction in gold nanoparticle/polymer composites by photo-DSC", THERMOCHIMICA ACTA, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 512, no. 1-2, 10 Enero 2011 (2011-01-10), páginas 247-253, XP027557761, ISSN: 0040-6031 [recuperado el 13.12.2010]</p> <p>Todo el documento Resumen -----</p>	1-18
A	<p>BEATRIZ PELAZ ET AL: "Tailoring the synthesis and heating ability of gold nanoprisms for bioapplications", LANGMUIR : THE ACS JOURNAL OF SURFACES AND COLLOIDS, vol. 28, no. 24, 19 June 2012 (2012-06-19), páginas 8965-8970, XP055093391, United States DOI: 10.1021/la204712u</p> <p>citado en la aplicación Todo el documento</p>	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/ES2013/070549

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/543 G01N21/55
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, COMPENDEX, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>HAES A J ET AL: "DETECTION OF A BIOMARKER FOR ALZHEIMER'S DISEASE FROM SYNTHETIC AND CLINICAL SAMPLES USING A NANOSCALE OPTICAL BIOSENSOR", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, ACS PUBLICATIONS, US, vol. 127, no. 7, 23 February 2005 (2005-02-23), pages 2264-2271, XP002568084, ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/JA044087Q [retrieved on 2005-01-27] the whole document abstract page 2266, right-hand column, paragraph 3 - page 2267, left-hand column, paragraph 2 figure 1</p> <p style="text-align: center;">----- -/--</p>	1-18

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search 13 December 2013	Date of mailing of the international search report 07/01/2014
---	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Gall-Truchot, A
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/ES2013/070549

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>PISSUWAN D ET AL: "Functionalised gold nanoparticles for controlling pathogenic bacteria", TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 28, no. 4, 1 April 2010 (2010-04-01), pages 207-213, XP026970359, ISSN: 0167-7799 [retrieved on 2010-01-12] the whole document abstract page 207, right-hand column, paragraph 2 - page 209, right-hand column, paragraph 2 figures 2-3 page 209, right-hand column, last paragraph page 211, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 3 page 212, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1 -----</p>	1-18
A	<p>SABINE SZUNERITS ET AL: "Sensing using localised surface plasmon resonance sensors", CHEMICAL COMMUNICATIONS, vol. 48, no. 72, 1 January 2012 (2012-01-01), pages 8999-9010, XP055090920, ISSN: 1359-7345, DOI: 10.1039/c2cc33266c the whole document abstract page 9002, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 2 -----</p>	1-18
A	<p>ELEONORA PETRYAYEVA ET AL: "Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensingA review", ANALYTICA CHIMICA ACTA, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 706, no. 1, 9 August 2011 (2011-08-09), pages 8-24, XP028312481, ISSN: 0003-2670, DOI: 10.1016/J.ACA.2011.08.020 [retrieved on 2011-09-01] the whole document abstract page 15, left-hand column, last paragraph - page 22, right-hand column, paragraph 2 -----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-18

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>HONGWEI LIAO ET AL: "Biomedical applications of plasmon resonant metal nanoparticles", NANOMEDICINE, vol. 1, no. 2, 1 August 2006 (2006-08-01), pages 201-208, XP055092689, ISSN: 1743-5889, DOI: 10.2217/17435889.1.2.201 the whole document abstract page 202, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 2 page 202, right-hand column, last paragraph - page 204, left-hand column, paragraph 1 page 204, left-hand column, paragraph 2 - page 205, right-hand column, paragraph 1 -----</p>	1-18
A	<p>MICHAEL B. CORTIE ET AL: "<title>Plasmonic heating of gold nanoparticles and its exploitation</title>", PROCEEDINGS OF SPIE, vol. 5649, 28 February 2005 (2005-02-28), pages 565-573, XP055093379, ISSN: 0277-786X, DOI: 10.1117/12.582207 the whole document abstract page 571, last paragraph - page 572, paragraph 2 -----</p>	1-18
A	<p>NEARINGBURG B ET AL: "Characterization of surface plasmon energy transduction in gold nanoparticle/polymer composites by photo-DSC", THERMOCHIMICA ACTA, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 512, no. 1-2, 10 January 2011 (2011-01-10), pages 247-253, XP027557761, ISSN: 0040-6031 [retrieved on 2010-12-13] the whole document abstract -----</p>	1-18
A	<p>BEATRIZ PELAZ ET AL: "Tailoring the synthesis and heating ability of gold nanoprisms for bioapplications", LANGMUIR : THE ACS JOURNAL OF SURFACES AND COLLOIDS, vol. 28, no. 24, 19 June 2012 (2012-06-19), pages 8965-8970, XP055093391, United States DOI: 10.1021/la204712u cited in the application the whole document -----</p>	1-18