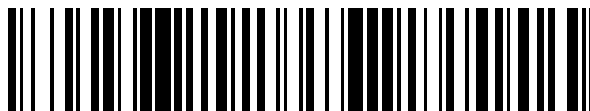


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 368**

21 Número de solicitud: 201231209

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 21/55 (2014.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

26.07.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

28.01.2014

88 Fecha de publicación diferida del informe sobre el estado de la técnica:

08.05.2014

Fecha de la concesión:

27.02.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

06.03.2015

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA (80.0%)

Campus plaza San Francisco, Edificio

interfacultades C/Pedro Cerbuna, 12

50009 Zaragoza (Zaragoza) ES;

FUNDACIÓN AGENCIA ARAGONESA PARA LA

INVESTIGACIÓN Y EL DESARROLLO (10.0%) y

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES

CIENTÍFICAS (10.0%)

72 Inventor/es:

DEL PINO GONZÁLEZ DE LA HIGUERA , Pablo;

PELAZ GARCÍA , Beatriz;

POLO TOBAJAS, Ester;

GRAZÚ BONAÍA, Valeria ;

MARTINEZ DE LA FUENTE, Jesús y

PARRO GARCÍA, Víctor

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

54 Título: **Biosensor con nanopartículas metálicas**

57 Resumen:

Biosensor con nanopartículas metálicas.

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 nanopartículas al ser irradiadas con una fuente de luz externa.

ES 2 440 368 B1

DESCRIPCIÓN

Biosensor con nanopartículas metálicas.

5 **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.

10

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.

15

20

25

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.

30

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.

35

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

40

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un biosensor 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);
- 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;

45

50

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 nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.

55

En una 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

60

- 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;

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 por las nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un biosensor que comprende:

- 10 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;
- 15 d. Una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección), capaz de reconocer el analito diana, opcionalmente unida a una molécula etiqueta; y
- 20 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;

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 nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.

25 Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un biosensor 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;
- 35 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;

40 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 nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.

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

- 45 a. Una molécula de reconocimiento (biomolécula de captura), capaz de reconocer el analito diana;
- b. Un soporte con una superficie termosensible;
- 50 c. Una fuente de luz externa;
- d. Una segunda molécula de reconocimiento donde la molécula es un anticuerpo (anticuerpo de detección), capaz de reconocer el analito diana; y
- 55 e. Nanopartículas metálicas con banda de plasmón de superficie funcionalizadas con anticuerpos anti-Fc que se unen al anticuerpo 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 por las nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.

60 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 (ADN, ARN), aptámeros o ácidos nucleicos peptídicos (PNAs). Preferiblemente moléculas de DNA y anticuerpos.

5 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.

10 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
- 15 c. Nanopartículas de cobre

Preferiblemente la nanopartícula metálica es un nanoprismo triangular de oro.

20 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.

25 Un quinto aspecto de la presente invención se refiere al uso de un biosensor según el primer 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 del analito (biomolécula de captura);
- 30 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
- 35 d. Irradiar el soporte de la etapa b) o c) con la fuente de luz externa.

40 Un sexto aspecto de la invención se refiere al uso de un biosensor 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;
- 45 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 de detección; y
- 50 d. Opcionalmente, colocar el soporte sobre una superficie termosensible si el soporte no comprendiese ya dicha superficie; e
- 55 e. Irradiar el soporte de la etapa c) o d) con la fuente de luz externa.

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

- 60 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) 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
- 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 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);
- 15 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
- 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 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 reconocimiento (biomolécula de detección) del analito;
- 30 b. Extraer el analito unido a las nanopartículas de la muestra de la etapa a), preferentemente a través de un proceso de centrifugación;
- 35 c. Añadir la extracción de la etapa b), a un soporte que presente inmovilizada la molécula de reconocimiento (biomolécula de captura) del analito;
- d. Opcionalmente, colocar el soporte sobre una superficie termosensible si el soporte no comprendiese ya dicha superficie; e
- 40 e. Irradiar el soporte de la etapa c) o d) con la fuente de luz externa.
- 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.
- 45

Breve descripción de las figuras

- 50 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.
- 55 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.
- 60

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

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.

5

Descripción de la invención

10 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 por las nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.

15 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.

20 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.

25 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*.

30 Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un biosensor que comprende:

- 50 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);
- 55 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;

60 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 nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.

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

- 5 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
- 10 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 por las nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.

- 15 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.

- 25 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 1000 nm, 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.

- 30 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.

- 35 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.

- 40 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.

- 45 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.

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

- 50 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 inmunológicos, 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.
- 55
- 60

- 5 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.
- 10 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
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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 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 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).
- 30 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.
- 35 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 reveladoras ser sometida a un incremento de temperatura.
- 40 Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un biosensor que comprende:
- 45 a. Una molécula de reconocimiento (biomolécula de captura), capaz de reconocer el analito diana;
- 50 b. Un soporte con una superficie termosensible;
- c. Una fuente de luz externa;
- 55 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.
- 60 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 nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.

En el contexto de la presente invención se entiende como molécula etiquetas aquellas que son reconocidas por afinidad por una interacción de tipo ligando-proteína o por 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 interactuar 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 ADN, ácido ribonucleico o ARN) o artificiales (ácido nucleico peptídico o PNA, morfolinos, etc) o combinaciones de ambos (ADN-ADN, PNA-ADN, ADN-PNA, PNA-PNA, etc)

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un biosensor 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;
- 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;

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 nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un biosensor 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;
- 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;

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 nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.

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 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 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 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 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.

5 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.

10 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 (biomolécula de captura) en un soporte, por ejemplo en una membrana de nitrato de celulosa. Después se lleva a cabo una
 15 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.

20 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.

25 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.

30 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
 35 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.

40 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.

45 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 cuantitativa.

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

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis de nanopartículas metálicas

55 - 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
 60 solución 1% de citrato trisódico 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 14-16 nm de diámetro con una banda de plasmón de superficie a 519 nm.

- 5 - 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 2 mM de ácido tetracloroaurico se mezcla con 120 ml de una solución 0.5 mM Na₂S₂O₃, dejándose en agitación durante 9 minutos, tras lo cual se realiza una segunda adición de un volumen entre 20-50ml de la solución 0.5 mM de Na₂S₂O₃. Se obtienen nanotriángulos de oro de tamaño comprendido entre 100-160 nm, que presentan una banda de plasmón de superficie entre 750-1075 nm. Antes de su conjugación con distintas biomoléculas, los nanoprismas deben ser pasivados, mediante la unión de un polietilenglicol (HS-PEG-COOH, 5000 g/mol). Para ello, 10 ml 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.
- 15 - 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 (NaBH₄, 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.
- 25 - Síntesis de nanocubos de cobre: La síntesis se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Murphy *et al.* "Solution-phase synthesis of Cu₂O nanocubes", Nano Letters 2002, 3 (2), 231-234. De acuerdo con este método, se añade 0.25 mL de una solución acuosa de CuSO₄ 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.

40 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.

- 45 - 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 μmoles de EDC y 3.5 umoles de sulfo-NHS, en un volumen final de 1 ml de MES pH6 10 mM, 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 10 mM; 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 μg de anticuerpo en un volumen final de 1 ml de MES pH6 10 mM durante 1 hora a 37°C. Tras (α-metoxi-ω-amino polietilenglicol). Finalmente las nanopartículas son purificadas tras varios ciclos de centrifugación a 6000 rpm durante 5 minutos.
- 55 - 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 pH6 10 mM, 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 10 mM; o mediante el uso de una columna de filtración en

5 gel. Una vez activados los grupos carboxilos de las nanopartículas, éstas se incuban con 1.25 µg de estreptavidina en un volumen final de 1 ml de MES pH6 10 mM durante 1 hora a 37°C. Tras la unión de la proteína, la superficie de la nanopartícula es bloqueada con 50 mM 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.

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

10 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 incubación con las nanopartículas funcionalizadas se irradiaron con el láser las membranas depositadas en la superficie termosensible.

15 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.

20 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.

25 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).

30 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.

35 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 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-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).

40 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 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 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 utilice un tiempo de irradiación de 2 segundos 0.1 cm.

5 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 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

15 Para el presente experimento 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.

20 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.

25 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 0.05 ng 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.

30 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.

35 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).

REIVINDICACIONES

1. Un biosensor adecuado para la detección visual de un analito, 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 y que da lugar al 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.
2. Un biosensor según la reivindicación 1, donde la molécula de reconocimiento (biomolécula de captura), capaz de reconocer el analito diana, está inmovilizada sobre el soporte con una superficie termosensible y la nanopartícula metálica que presenta banda de plasmón de superficie está funcionalizada con una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección), capaz de reconocer el analito diana.
3. Un biosensor según la reivindicación 1, donde la segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección), capaz de reconocer el analito diana, está opcionalmente unida a al menos una molécula receptora y la nanopartícula metálica que presenta banda de plasmón de superficie está funcionalizada con al menos una molécula ligando capaz de unirse de forma selectiva a la molécula receptora.
4. Un biosensor según la reivindicación 3, donde la molécula receptora es biotina y la molécula ligando es avidina o estreptavidina o donde la molécula receptora es avidina o estreptavidina y la molécula ligando es biotina.
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.
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).
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:
 - 45 a. Nanopartículas de oro
 - b. Nanopartículas de plata; o
 - 50 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, acetato de celulosa, poliestireno, cerámica, silicio o vidrio.
13. Procedimiento para la detección de un analito que comprende:

- 5 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 que presenten banda de plasmón de superficie funcionalizadas con una segunda molécula de reconocimiento del analito (biomolécula de detección); y
- 10 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;
- donde la detección de analito se realiza de forma visual por el cambio de color en las zonas de soporte en el que el analito esté presente producido por las nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.
14. Procedimiento para la detección de un analito que comprende:
- 15 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);
- 20 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 receptora;
- c. Incubar el soporte de la etapa b) con nanopartículas metálicas que presenten banda de plasmón de superficie funcionalizadas con al menos una molécula ligando; 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 donde la detección de analito se realiza de forma visual por el cambio de color en las zonas de soporte en el que el analito esté presente producido por las nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.
15. Procedimiento según la reivindicación 14, donde la molécula receptora es biotina y la molécula ligando es avidina o estreptavidina o donde la molécula receptora es avidina o estreptavidina y la molécula ligando es biotina.
- 35 16. Procedimiento para la detección de un analito que comprende:
- 40 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;
- 45 c. Incubar el soporte de la etapa b) con nanopartículas metálicas que presenten banda de plasmón de superficie funcionalizadas con anticuerpos anti-Fc; y
- d. Opcionalmente, colocar el soporte sobre una superficie termosensible si el soporte no comprendiese ya dicha superficie; e
- 50 e. Irradiar el soporte de la etapa c) o d) con la fuente de luz externa;
- donde la detección de analito se realiza de forma visual por el cambio de color en las zonas de soporte en el que el analito esté presente producido por las nanopartículas metálicas al ser irradiadas con la fuente de luz externa.
- 55 17. Procedimiento para la detección de un analito que comprende:
- a. Añadir a una muestra, donde esté presente el analito a determinar, nanopartículas metálicas que presenten banda de plasmón de superficie funcionalizadas con una segunda molécula de reconocimiento del analito (biomolécula de detección);
- 60 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
- e. Irradiar el soporte de la etapa c) o d) con la fuente de luz externa;

5

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

15 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 bioquímica de oxígeno.

Fig. 1

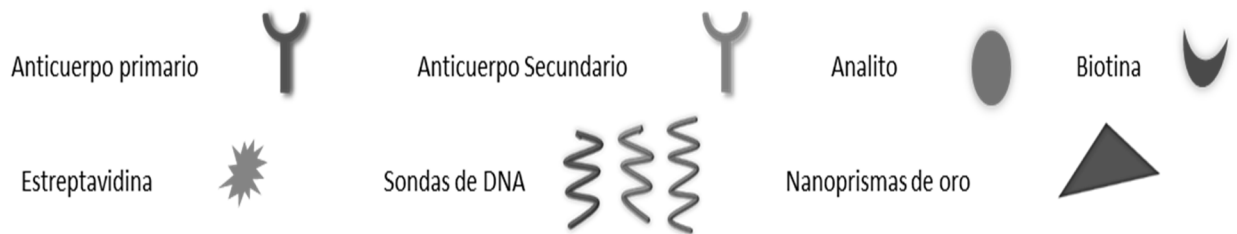
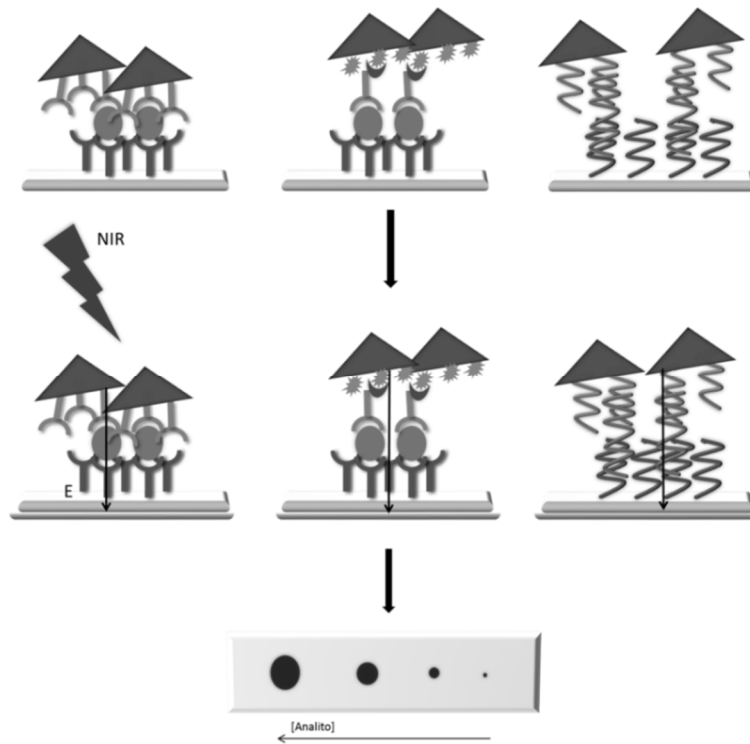


Fig.2

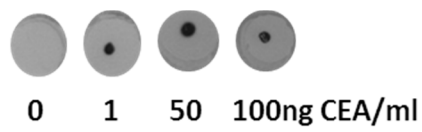


Fig. 2a

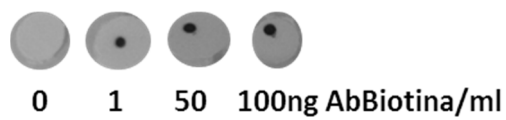


Fig. 2b

Fig.3

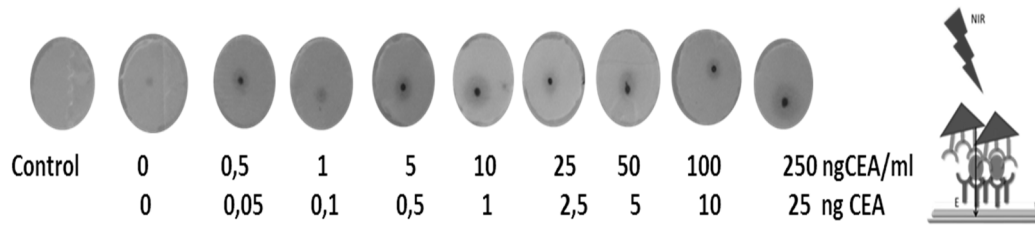


Fig. 3a

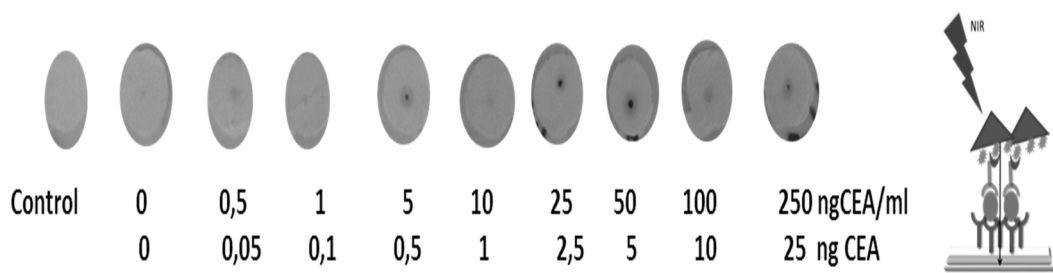


Fig. 3b

Fig. 4

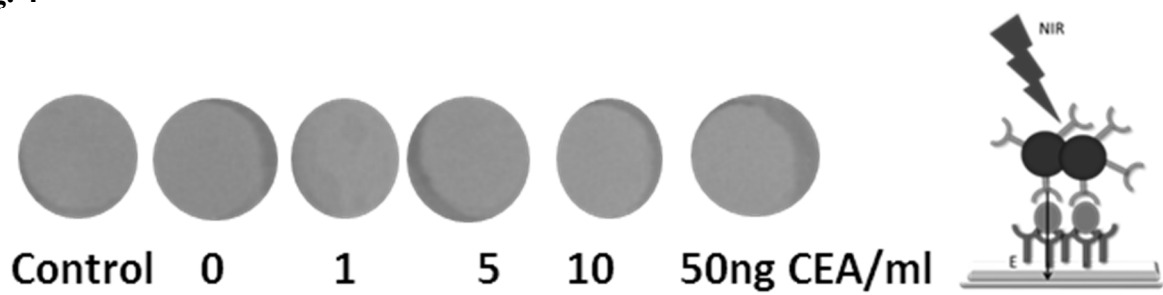


Fig. 5

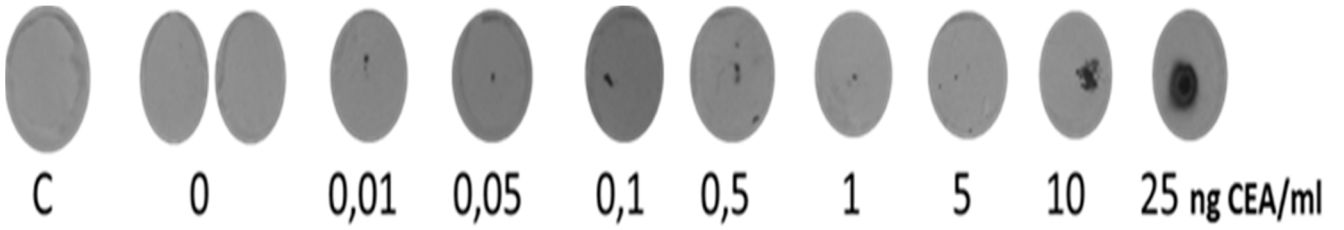


Fig. 5a

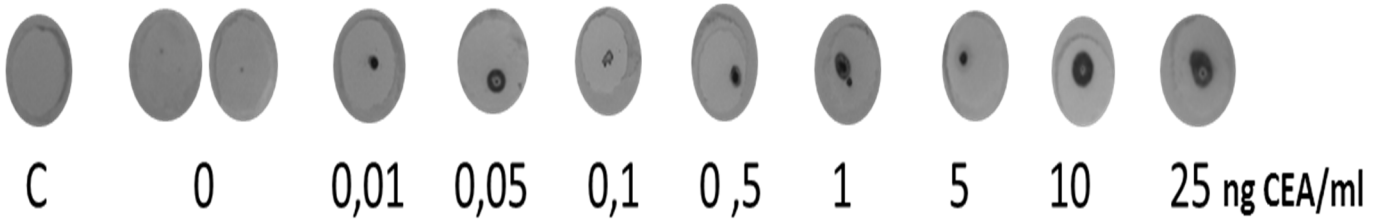
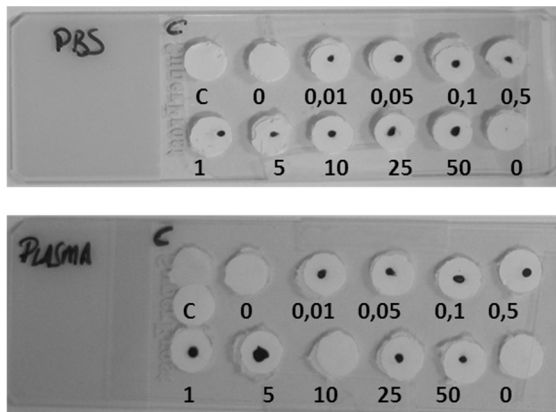


Fig. 5b

Fig. 6



C	0	0,01	0,05	0,1	0,5	1	5	10	25	50	ng CEA/ml
C	0	1	5	10	50	100	500	1000	2500	5000	pg CEA
C	0	0,0055	0,028	0,055	0,278	0,555	2,78	5,56	13,9	27,8	femtomoles CEA

Fig. 7

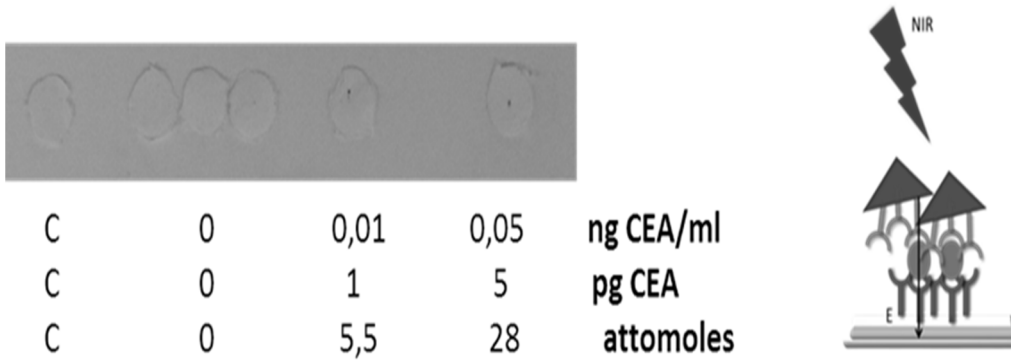


Fig. 7a

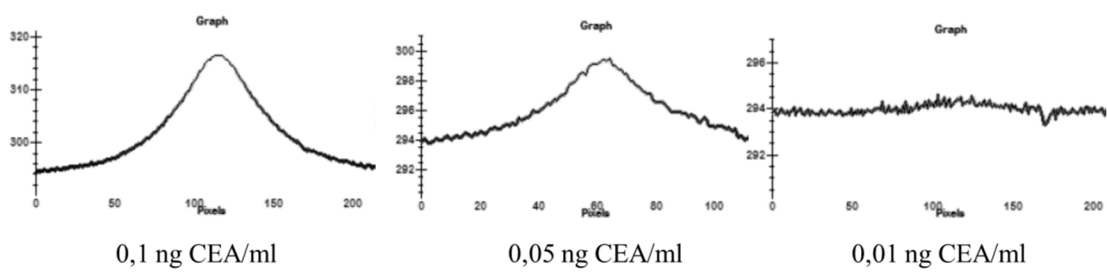


Fig. 7b



- ②1 N.º solicitud: 201231209
②2 Fecha de presentación de la solicitud: 26.07.2012
③2 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤1 Int. Cl.: **G01N33/543** (2006.01)
G01N21/55 (2014.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤6 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	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, 20050223 ACS Publications, US 23.02.2005 VOL: 127 No: 7 Págs: 2264-2271 ISSN 0002-7863 Doi: doi:10.1021/JA044087Q. Página 2266, columna izquierda; página 2266, columna derecha, párrafo 3 – página 2267, columna izquierda, párrafo 2 y figura 1.	1-18
A	PISSUWAN D et al. Functionalised gold nanoparticles for controlling pathogenic bacteria. TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, 20100401 ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB 01.04.2010 VOL: 28 No: 4 Págs: 207-213 ISSN 0167-7799. Página 207, columna derecha, primer párrafo y figura 2; página 207, columna derecha, segundo párrafo – página 209, columna derecha, segundo párrafo; página 212, columna izquierda y resumen.	1-18
A	SABINE SZUNERITS et al. Sensing using localized surface plasmon resonance sensors. CHEMICAL COMMUNICATIONS, vol. 48, 01.01.2012, páginas 8999-9010. Página 9000, apartado 2; página 9002, apartados 3.1 y 3.2 y figura 5.	1-18
A	ELEONORA PETRYAYEVA et al. Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing – A review., ANALYTICA CHIMICA ACTA, vol 706, 2011, páginas 8-24. Página 11, apartado 3.1; páginas 15-22, apartado 5; tabla 1 y resumen.	1-18
A	HONGWEI LIAO et al. Biomedical applications of plasmon resonant metal nanoparticles. NANOMEDICINE, vol 1, no. 2, 2006, páginas 201-208. Páginas 202-205 y figura 1.	1-18
A	MICHAEL CORTIE et al. Plasmonic heating of gold nanoparticles and its exploitation. PROCEEDINGS OF SPIE, vol 5649, 2005, páginas 565-573. Páginas 571 y 572, apartado 5.2.	1-18
A	NEARINGBURG B et al. Characterization of surface plasmon energy transduction in gold nanoparticle/polymer composites by photo-DSC. THERMOCHIMICA ACTA, 20110110 ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL 10.01.2011 VOL: 512 No: 1-2 Págs: 247-253 ISSN 0040-6031. Página 252, apartado 4 y resumen.	1-18
A	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, 19.06.2012, páginas 8965-8970. Resumen.	1-18

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
23.04.2014

Examinador
S. González Peñalba

Página
1/5

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

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 23.04.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-18	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-18	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	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, 20050223 ACS Publications, US 23.02.2005 VOL: 127 No: 7 Págs: 2264-2271 ISSN 0002-7863 Doi: doi:10.1021/JA044087Q	23.02.2005
D02	PISSUWAN D et al. Functionalised gold nanoparticles for controlling pathogenic bacteria. TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, 20100401 ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB 01.04.2010 VOL: 28 No: 4 Págs: 207-213 ISSN 0167-7799.	01.04.2010
D03	SABINE SZUNERITS et al. Sensing using localized surface plasmon resonance sensors. CHEMICAL COMMUNICATIONS, vol. 48, 01.01.2012, páginas 8999-9010.	01.01.2012
D04	ELEONORA PETRYAYEVA et al. Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing – A review., ANALYTICA CHIMICA ACTA, vol 706, 2011, páginas 8-24.	2011
D05	HONGWEI LIAO et al. Biomedical applications of plasmon resonant metal nanoparticles. NANOMEDICINE, vol 1, no. 2, 2006, páginas 201-208.	2006
D06	MICHAEL CORTIE et al. Plasmonic heating of gold nanoparticles and its exploitation. PROCEEDINGS OF SPIE, vol 5649, 2005, páginas 565-573.	2005
D07	NEARINGBURG B et al. Characterization of surface plasmon energy transduction in gold nanoparticle/polymer composites by photo-DSC.THERMOCHIMICA ACTA, 20110110 ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL 10.01.2011 VOL: 512 No: 1-2 Págs: 247-253 ISSN 0040-6031.	10.01.2011
D08	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, 19.06.2012, páginas 8965-8970.	19.06.2012

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente hace referencia, tal y como ha sido presentada a un biosensor para la detección visual de un analito, que comprende una molécula de reconocimiento (biomolécula de captura) capaz de reconocer el analito diana, un soporte con una superficie termosensible, una fuente externa, una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección) y una nanopartícula metálica que presenta banda de plasmón de superficie (reivindicación 1). La biomolécula de captura está inmovilizada sobre el soporte con superficie termosensible y la nanopartícula metálica está funcionalizada con la segunda molécula de reconocimiento (reivindicación 2). La segunda molécula de reconocimiento está opcionalmente unida a una molécula receptora y la nanopartícula metálica está funcionalizada con una molécula ligando capaz de unirse de forma selectiva a la molécula receptora (reivindicación 3). La molécula receptora es biotina y la molécula ligando es avidina o estreptavidina o viceversa (reivindicación 4). La segunda molécula de reconocimiento es un anticuerpo y la nanopartícula metálica está funcionalizada con un anticuerpo anti-Fc (reivindicación 5). Las moléculas de reconocimiento se seleccionan de entre anticuerpos, péptidos, enzimas, etc. (reivindicaciones 6 y 7). La fuente de luz externa es una luz monocromática (reivindicación 8). La nanopartícula metálica puede ser de oro, plata o cobre (reivindicaciones 9 y 10). La superficie termosensible del soporte es un papel termosensible (reivindicación 11 y 12). Se reivindican también los procedimientos de detección del analito (reivindicaciones 13-17) y el uso de dicho biosensor (reivindicación 18).

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA ARTS. 6 Y 8 DE LA LP

El documento D01 hace referencia a un biosensor óptico a nanoescala basado en espectroscopía de resonancia de plasmón de superficie localizada (LSPR) que ha sido diseñado para monitorizar las interacciones entre el antígeno, ADDLs (amyloid-beta derived diffusible ligands) y los anticuerpos específicos anti ADDL (véase resumen). Para ello se utilizaron nanopartículas de oro o plata con tamaño y forma controlados. Dichas partículas eran concretamente nanotriángulos de plata depositadas sobre un sustrato de mica, que fueron funcionalizadas con SAM (self-assembled monolayer) (véase página 2266, columna izquierda; página 2266, columna derecha, párrafo 3 - página 2267, columna izquierda, párrafo 2 y figura 1).

El documento D02 se refiere a nanopartículas de oro funcionalizadas para controlar bacterias patógenas (véase resumen y página 207, columna derecha, segundo párrafo - página 209, columna derecha segundo párrafo). Dichas nanopartículas pueden tener distintas formas (véase página 207, columna derecha, primer párrafo y figura 2) y presentan una banda de plasmón de superficie que puede generar un cambio de color o calentamiento localizado entre otras posibilidades (véase página 207, columna derecha, primer párrafo). Véase también página 212, columna izquierda.

El documento D03 analiza diferentes métodos usados para fabricar nanosensores plasmónicos. Se prefieren las nanopartículas de oro ya que son químicamente estables y resistentes a la oxidación de superficie (véase página 9000, apartado 2). El uso de nanopartículas de oro para detección colorimétrica es uno de los métodos disponibles más sencillos y eficaces. La mayoría de los sensores colorimétricos basados en nanopartículas están diseñados de tal manera que la unión de un analito provoca la agregación de partículas (véase página 9002, apartados 3.1 y 3.2 y figura 5).

El documento D04 describe la teoría física de la formación de resonancia de plasmón de superficie localizada (LSPR localized surface Plasmon resonance) en la superficie de nanoestructuras y el potencial de esta tecnología óptica para el desarrollo de bioensayos de alta sensibilidad (véase resumen). Se pueden utilizar nanopartículas con distintas formas (véase página 11, apartado 3.1.) Las nanopartículas pueden ser de oro o plata, concretamente nanopartículas de plata en forma de nanoprisma y revestidas con oro (véase página 15, tabla 1). Además pueden ser funcionalizadas (véase páginas 15-22, apartado 5).

El documento D05 trata diferentes aplicaciones biomédicas de nanopartículas metálicas que presentan el efecto denominado resonancia de plasmón de superficie localizada (LSPR). Se pueden utilizar nanopartículas de plata u oro, y de diferentes formas, nanopartículas conjugadas, funcionalizadas, etc (véase figura 1 y páginas 202-205).

El documento D06 hace referencia a el calentamiento plasmónico de las nanopartículas de oro y sus posibles aplicaciones, una de ellas sería el proponer dichas nanopartículas de oro como medio para liberar dosis térmicas o químicas altamente localizadas sobre un tipo de célula viva seleccionada, tal como una célula tumoral, en un organismo vivo. La idea es revestir la superficie de la nanopartícula con un anticuerpo u otra molécula que atacará selectivamente a la célula (véase páginas 571 y 572, apartado 5.2.)

El documento D07 se refiere a la formulación y optimización de compuestos que responden a estímulos que consisten en nanopartículas de oro en matrices de diacrilato de polietileno glicol (PEGDA). En este tipo de materiales la radiación láser es absorbida por las nanopartículas y traducida en energía térmica (véase resumen). Estas propiedades de las nanopartículas de oro podrían emplearse en tratamientos de cáncer (véase página 252, apartado 4).

El documento D08 divulga un método de síntesis de nanopartículas de oro en forma de nanoprimas. Debido a su biocompatibilidad, estas nanopartículas pueden funcionalizarse fácilmente (véase resumen).

Por lo tanto, a la vista de los documentos citados del estado de la técnica, la presente solicitud de patente, tal y como ha sido presentada, parece cumplir los requisitos de novedad y actividad inventiva, ya que no se ha encontrado ningún documento que divulgue un biosensor adecuado para la detección visual de un analito que comprenda una molécula de reconocimiento de dicho analito, un soporte con una superficie termosensible donde inmovilizar dicha molécula, una fuente de luz externa, una segunda molécula de reconocimiento y una nanopartícula metálica que presente una banda de plasmón de superficie que dé lugar a cambio de color en las zonas del soporte en las que esté presente el analito, siendo dichas nanopartículas, preferiblemente nanoprimas triangulares de oro. Ni tampoco, en los documentos citados, existen sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en las reivindicaciones 1-18. Por lo que las reivindicaciones 1-18 cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la LP.