

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
22 de julio de 2021 (22.07.2021)

(10) Número de publicación internacional
WO 2021/144487 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:

G01N 21/29 (2006.01) G01N 21/75 (2006.01)
G01N 21/45 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)
G01N 21/62 (2006.01) G01N 33/566 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2021/070009

(22) Fecha de presentación internacional:

13 de enero de 2021 (13.01.2021)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P202030023 16 de enero de 2020 (16.01.2020) ES

(71) Solicitante: **UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA** [ES/ES]; Servicio de Promoción y Apoyo a Investigación, Innovación y Transferencia, i2T Camí de Vera, s/n, Edificio 8G – Acceso A –Planta 3, 46022 VALENCIA (ES).

(72) Inventores: **AVELLÀ OLIVER, José Miguel**; UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA, Servicio de Promoción y Apoyo a Investigación, Innovación y Transferencia i2T Camí de Vera, s/n, Edificio 8G – Acceso A –Planta 3, 46022 VALENCIA (ES). **SANCHO FORNES, Gabriel**; UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA, Servicio de Promoción y Apoyo a Investigación, Innovación y Transferencia i2T Camí de Vera, s/n, Edificio 8G – Acceso A –Planta 3, 46022 VALENCIA (ES). **CARRASCOSA RUBIO, Javier**; UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA, Servicio de Promoción y Apoyo a Investigación, Innovación y Transferencia, i2T Camí de Vera, s/n, Edificio 8G – Acceso A –Planta 3 46022 VALENCIA (ES). **MAQUEIRA CATALA, Ángel**; UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA, Servicio de Promoción y Apoyo a Investigación, Innovación y Transferencia, i2T Camí

de Vera, s/n, Edificio 8G – Acceso A –Planta 3 46022 VALENCIA (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Angel**; Glorieta Rubén Darío, 4, 28010 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, ST, 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))

(54) Title: NANOSTRUCTURED MATERIAL WITH INTERFEROMETRIC PROPERTIES FOR THE VISUAL DETECTION OF BIORECOGNITION ASSAYS WITHOUT LABELLING

(54) Título: MATERIAL NANOESTRUCTURADO CON PROPIEDADES INTERFEROMÉTRICAS PARA LA DETECCIÓN VISUAL DE ENSAYOS DE BIORECONOCIMIENTO SIN MARCAJE

(57) Abstract: The present invention refers to a nanomaterial that allows chemical and biochemical analysis to be carried out and the result thereof to be determined by direct visual detection, without using labels (label-free) and without requiring any type of instruments. The material is formed by a layer of bioreceptors that selectively interact with analytes and which is disposed on an interferometric layer deposited on a substrate. Incubation of samples on the material produces changes in its interferometric response, which translate into colour changes that are directly observable visually under natural or artificial light, the magnitude thereof depending on the concentration of the analyte present in the sample.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a un nanomaterial que permite realizar análisis químicos y bioquímicos y determinar su resultado mediante detección visual directa, sin usar marcadores (label-free) y sin requerir ningún tipo de instrumentación. El material está conformado por una capa de bioreceptores que interaccionan selectivamente con los analitos, y que se dispone sobre una capa interferométrica depositada sobre un sustrato. La incubación de muestras sobre el material, genera cambios en su respuesta interferométrica, que se traducen en cambios de color directamente observables visualmente bajo iluminación con luz natural o artificial, y cuya magnitud depende de la concentración del analito presente en la muestra



WO 2021/144487 A1

DESCRIPCIÓN

Material nanoestructurado con propiedades interferométricas para la detección visual de ensayos de bioreconocimiento sin marcaje

5

La presente invención se refiere a un biosensor que permite realizar análisis químicos y bioquímicos y determinar su resultado mediante detección visual directa, sin usar marcadores (label-free) y sin requerir ningún tipo de instrumentación. El material está conformado por una capa de bioreceptores que interaccionan selectivamente con los analitos, y que se dispone sobre una capa interferométrica depositada sobre un sustrato. La incubación de muestras sobre el material, genera cambios en su respuesta interferométrica, que se traducen en cambios de color directamente observables visualmente bajo iluminación con luz natural o artificial, y cuya magnitud depende de la concentración del analito presente en la muestra.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los biosensores son dispositivos de análisis químico y biológico basados en generar una respuesta (señal) debida a una biointeracción. Se caracterizan por su sensibilidad y selectividad, y generalmente están diseñados para ser simples, compactos, portables, rápidos y económicos. Uno de los objetivos clave de los biosensores es permitir la obtención de los resultados analíticos en el mismo momento y lugar en que éstos son requeridos, por parte de usuarios no especializados, lo que es conocido como point of care. Esto les confiere un gran potencial en multitud de campos como el diagnóstico clínico, la seguridad alimentaria y el control agroalimentario, entre otros. Algunos ejemplos paradigmáticos de biosensores con gran repercusión comercial son el glucómetro y el test de fertilidad en humanos.

La capacidad de los biosensores point of care se encuentra fuertemente comprometida por la complejidad y precio de la instrumentación que involucran estos desarrollos (detectores, fuentes de radiación, baterías, circuitos electrónicos, etc.). Otra cuestión importante en este sentido es reducir al máximo el número de operaciones (diluciones, preparación de muestra, incubaciones, etc.) necesarias para realizar el análisis, con el fin de simplificar al máximo el proceso analítico, así como para minimizar la

30

instrumentación requerida para automatizar los ensayos. En esta línea, los sistemas para detección sin marcaje (label-free) permiten el análisis directo de muestras, evitando así etapas adicionales relacionadas con incubaciones de bioreactivos secundarios marcados y desarrollo de señal. Esto aporta importantes ventajas porque simplifica en gran medida el proceso analítico. Sin embargo, los sistemas label-free suelen basarse en materiales con nanoestructuras no escalables a nivel industrial, así como en instrumentación compleja para medir las biointeracciones.

Se han encontrado artículos que reportan el uso de este tipo de materiales junto con instrumentación específica para cuantificar los cambios interferométricos generados por los eventos de bioreconocimiento (ACS Nano, 2008, 2, 1885–1895; Anal. Chem. 2009, 81, 4963–4970), destacando que en ambos los desarrollos descritos no contemplan la detección visual directa, sino a través de instrumentación específica.

Por otro lado, la patente EP0727038B1 describe métodos para analizar una superficie óptica para un analito de interés en una muestra e instrumentos relacionados. El método implica el uso de un dispositivo de inmunoensayo óptico de película delgada mediante el cual se detecta un analito de interés en una muestra a través de cambios espectrales en la luz que afectan la superficie antes y después de la unión del analito a las capas de sustrato reactivo. El dispositivo incluye un sustrato que tiene un primer color en respuesta a la luz que incide sobre él.

Asimismo, el documento WO9403774A1 perteneciente a la misma familia reivindica un utensilio para detectar la presencia de un determinado analito, así como para medir su concentración. El resultado se puede determinar mediante un cambio de color detectable a simple vista o mediante aparatos destinados a ese fin. Este utensilio está conformado por una estructura multicapa. La capa más externa contiene moléculas capaces de ligar al analito. Las capas internas tienen unas características ópticas tales, que van a mostrar un cambio de color en presencia de analito ligado.

Finalmente, Maier Irene et al. (Anal. Chem., 2008, 80 (8), 2694-2703) describen unos chips biosensores, que se utilizan para la detección de un determinado analito. Los chips comprenden un soporte que contiene nanopartículas de oro. Sobre esta capa existe otra que contiene biomoléculas capaces de reconocer y unirse al analito. Esta unión se traduce en un cambio de color en el chip, que puede observarse a simple vista. Sin

embargo, para la detección emplean una configuración interferométrica para amplificar la señal basada en resonancia de plasmón superficial, y además usan un marcaje (nanopartículas coloidales de oro conjugadas a anticuerpos), lo que diferencia este biosensor de la presente invención donde el ensayo de bioreconocimiento genera por
5 sí mismo los cambios de color, sin usar marcadores, gracias al diseño de los materiales interferométricos.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

10 Teniendo en cuenta estos antecedentes, la presente invención consiste en un material que permite realizar ensayos químicos y biológicos y detectar el resultado a través de cambios de color observables directamente con el ojo, sin necesidad de marcaje, sin requerir ningún tipo de instrumentación para el proceso de análisis, y siendo el material fabricable a escala industrial. Estas capacidades resultan en un biosensor simple y
15 portátil, muy adecuado para aplicaciones tipo point of care en las que los usuarios finales realicen análisis químicos y bioquímicos en un único paso (incubar la muestra sobre el material) y determinen el resultado visualmente por cambio de color. Así, la presente invención comprende un sustrato sobre el que se dispone una capa interferométrica, sobre la cual se inmoviliza una capa de reconocimiento compuesta de bioreceptores
20 para el reconocimiento de los analitos.

Por lo tanto, en un primer aspecto la presente invención se refiere a un biosensor que permite la detección visual directa de analitos en una muestra, que comprende:

- 25 i) Un sustrato (a) que actúa como soporte de la capa interferométrica (b), que es de acero;
- ii) Una capa interferométrica (b) que consiste en una o varias películas superpuestas, con una disposición diseñada para generar fenómenos interferométricos constructivos y/o destructivos en el intervalo visible y para modificar esta respuesta interferométrica en función de las propiedades (grosor, índice de refracción, densidad, etc.) de la capa de reconocimiento;
- 30 iii) Una capa de reconocimiento (c) compuesta de receptores biológicos que se fijan a la última película de la capa interferométrica (b), y que reconocen de forma específica a los analitos presentes en la muestra.

En una realización preferida el sustrato (a) es un material sólido, típicamente plano, que actúa como soporte de la capa interferométrica (b).

En otra realización preferida el grosor de la capa de sustrato (a) es de entre 50 micrómetros y 5 milímetros, y más preferiblemente de entre 500 micrómetros y 1.2 milímetros.

En otra realización más preferida el sustrato (a) consiste en una lámina de policarbonato, y más preferiblemente en una lámina de policarbonato con un grosor de entre 100 micrómetros y 3 milímetros, y aún más preferentemente una lámina de policarbonato de 600 μm de grosor.

En otra realización preferida la capa interferométrica (b) está constituida por una o varias películas superpuestas que independientemente consisten en un material que se selecciona de entre metales, aleaciones, compuestos metálicos, silicio, y compuestos de silicio;

con la condición de que cuando el sustrato (a) del biosensor y la primera película de la capa interferométrica (b) consisten en un metal, estos metales son diferentes.

En otra realización preferida los metales de una o varias de las películas de la capa interferométrica (b) se seleccionan de entre oro, plata, platino y cromo. En una realización más preferida el metal es oro.

En otra realización preferente, cuando se emplea como sustrato una lámina de acero pulido, se omite la película inferior de oro.

En otra realización preferida las aleaciones de una o varias de las películas de la capa interferométrica (b) se seleccionan de entre Ni-Va, Ni-Fe, Ni-Cr, Fe-Co, Fe-Co-Ta-Zr, Co-Ta-Zr, Cu-Ga, Cu-In, Cu-In-Ga, Ti-Al, Al-Cu, Al-Sn-Cu y W-Ti. En una realización más preferida la aleación consiste en Ag-In-Sb-Te.

En otra realización preferida los compuestos metálicos de una o varias de las películas de la capa interferométrica (b) se seleccionan de entre sulfuro de zinc, óxido de titanio, óxido de germanio, óxido de fósforo, óxido de boro y pentóxido de tántalo. En una realización más preferida el compuesto metálico es sulfuro de zinc.

En otra realización preferida los compuestos de silicio de una o varias de las películas

de la capa interferométrica (b) se seleccionan de entre óxido de silicio, nitruro de silicio, y cuarzo.

La disposición de las diferentes películas que comprende la capa interferométrica (b) se diseña para generar fenómenos interferométricos constructivos y/o destructivos en el intervalo visible, y para modificar esta respuesta interferométrica en función de las propiedades (grosor, índice de refracción, densidad, etc.) de la capa de reconocimiento (c).

En una realización más preferida, las películas que conforman la capa interferométrica (b) generan fenómenos interferométricos destructivos, y consisten en una película de 50 nm de oro, seguido de una película de 60 nm de sulfuro de zinc, seguido de una película de 15 nm de la aleación Ag-In-Sb-Te, seguido de una película de sulfuro de zinc de 65 nm, y finalmente una película de 5 nm de oro.

En una realización más preferida, las películas que conforman la capa interferométrica (b) generan fenómenos interferométricos constructivos, y consisten en una película de 50 nm de oro, seguido de una película de 85 nm de sulfuro de zinc, seguido de una película de 20 nm de la aleación Ag-In-Sb-Te, seguido de una película de sulfuro de zinc de 85 nm, y finalmente una película de 5 nm de oro.

En una realización más preferente se usan de forma combinada, en un mismo ensayo, configuraciones de materiales interferométricos constructivos junto con materiales interferométricos destructivos y se consideran las señales de ambos sistemas con el fin de incrementar la fiabilidad de los resultados.

En otra realización preferida los receptores biológicos de la capa de reconocimiento (c) se seleccionan de entre anticuerpos, enzimas, otras proteínas, ácidos nucleicos, polímeros de impronta molecular, polisacáridos, complejos proteína-hapteno, bacterias, virus y tejidos.

En otra realización preferida la disposición de los receptores biológicos sobre la capa interferométrica puede realizarse a través de procesos de anclaje covalente o mediante fisisorción. Asimismo, la capa de reconocimiento (c) puede disponerse en la totalidad de la superficie de la capa interferométrica (b), o en porciones discretas de la misma.

35

En una realización más preferida se emplea una capa de reconocimiento (c) constituida por una monocapa de anticuerpos específicos inmovilizados de forma covalente sobre la capa interferométrica, para detectar analitos proteicos en muestras biológicas.

- 5 En otra realización preferida, la capa de reconocimiento (c) consiste en una monocapa de proteínas inmovilizadas por fisisorción, para detectar anticuerpos específicos presentes en las muestras.

- 10 En otra realización preferida, la capa de reconocimiento (c) se dispone según una estructura de micromatriz, en la que cada punto contiene receptores biológicos diferentes para determinar múltiples analitos en una muestra.

- 15 En otra realización preferida, estos ensayos tipo micromatriz se agrupan en conjuntos de tres puntos (ensayo, control positivo, y control negativo) y se considera la combinación resultante para evaluar el resultado del análisis.

- En la presente invención el término “analito” se refiere a una sustancia o grupo de sustancias cuya presencia o concentración se quiere determinar en la muestra. Ejemplos de analitos incluyen, pero no se limitan a moléculas orgánicas, biomacromoléculas (proteínas, enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos, carbohidratos, etc.) y microorganismos (bacterias, virus, células), entre otros. En cuanto a su función e interés en su determinación, estos analitos pueden ser fármacos, metabolitos, biomarcadores, alergenicos, drogas, fitosanitarios, contaminantes, patógenos, armas químicas y biológicas, agentes alergénicos, etc.

25

En la presente invención, el término “aleación” se refiere a una combinación o mezcla de dos o más elementos químicos, donde al menos uno de los cuales es un metal.

- 30 Otro aspecto de la invención es un procedimiento de obtención del biosensor de la invención que comprende las siguientes etapas:

- i) Diseño de las películas que conforman el sustrato (a) y la capa interferométrica (b) a partir de cálculos teóricos basados en las ecuaciones de Fresnel;
- ii) Preparación de la estructura multicapa de la capa interferométrica (b) mediante depositado por sputtering de las películas que la conforman;
- 35 iii) Inmovilización de los bioreceptores mediante anclaje covalente o mediante

fisisorción sobre la superficie de la capa interferométrica (b), conformando la capa de reconocimiento (c).

5 Por otro lado, para el proceso de análisis se incuba una muestra sobre la capa de reconocimiento del material. Los bioreceptores interaccionan con los analitos presentes en la muestra, lo que genera un cambio en la cantidad de materia que constituye la capa de reconocimiento. Este cambio modifica la respuesta interferométrica del material y resulta en un cambio de color detectable visualmente, cuya magnitud depende de la concentración del analito en la muestra.

10

Por lo tanto, un tercer aspecto de la invención es un procedimiento de detección de analitos que comprende las siguientes etapas:

- i) Poner en contacto el biosensor de la invención con la muestra a analizar;
- ii) Incubar dicha muestra sobre el biosensor de la invención; y
- 15 iii) Evaluar visualmente el cambio de color de la capa de reconocimiento (c) del biosensor tras retirar la disolución.

Opcionalmente, con el objetivo de mejorar la fiabilidad del proceso, se pueden realizar en paralelo estas tres etapas sobre puntos constituidos por distintos bioreceptores, de
20 manera que se obtenga una micromatriz conformada por grupos de tres puntos, con un punto dedicado al ensayo de interés de acuerdo con el proceso descrito anteriormente, otro punto como control negativo, y un tercero como control positivo.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes
25 no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

30

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Esquema de la configuración de películas superpuestas que constituye la capa interferométrica con configuración (I) destructiva y (II) constructiva, incluyendo el
35 sustrato y la capa de reconocimiento.

Fig. 2. Esquema de un biosensor de material interferométrico con configuración (I) destructiva y (II) constructiva, ambos con un microarray de receptor, tras incubar muestras con diferentes concentraciones de analito. En estos esquemas la
5 concentración más alta de analito se ha incubado en el punto situado en la esquina superior izquierda, esta concentración disminuye secuencialmente punto a punto hacia la derecha (primero) y hacia abajo (segundo), siendo el punto menos concentrado el de la esquina inferior izquierda, con una concentración de 0 µg/mL.

10 **Fig. 3.** Esquema de la configuración de ensayo para discriminar falsos positivos y falsos negativos de forma rápida e intuitiva mediante ensayos en formato de micromatriz, en los materiales interferométricos con configuración (I) destructiva y (II) constructiva.

EJEMPLOS

15

A continuación, se ilustra la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

Materiales y métodos

20

En primer lugar, se simula y optimiza el grosor de cada una de las películas del material para obtener la respuesta deseada en ensayos de reconocimiento realizados sobre la superficie de la capa más externa del material. Estos cálculos teóricos utilizan las ecuaciones de Fresnel, calculan las variaciones de intensidad de luz reflejada a una
25 longitud de onda dada, y consideran el grosor e índice de refracción de cada película, junto con los cambios generados al variar el grosor de la capa de reconocimiento de 0 a 20 nanómetros (tomando un índice de refracción de 1,47). A partir de estos resultados, se seleccionan las configuraciones multicapa a fabricar.

30 Para fabricar los nanomateriales, se cortan primero chips de 1,5 x 1,2 cm a partir de planchas de policarbonato de 600 µm de grosor, empleando una fresadora de control numérico. Estos chips se limpian con etanol, con agua destilada y se secan con aire a presión. A continuación, los chips se recubren con las diferentes capas que conforman el material, una a una y de forma secuencial, empleando un equipo de sputtering
35 (magnetron de ultra alto vacío) y un target particular para cada material depositado. Los

grosos de capa durante la fabricación se caracterizan por reflectometría/difractometría de rayos X, los índices de refracción por elipsometría, y las estructuras multicapa resultantes por FIB-FESEM.

- 5 Para preparar la capa de reconocimiento sobre la superficie de la capa interferométrica, se imprimen matrices de 4 x 3 gotas de 40 nL de una disolución de bioreceptor, en tampón carbonato, mediante un microimpresor sin contacto, y se incuban 16 horas a 4 °C para que el receptor quede inmovilizado por fisisorción (BSA a 100 µg/mL para el sistema BSA/anti-BSA). Tras la incubación, los biosensores se lavan con tampón PBS-
10 T, se enjuagan con agua y se secan con aire.

Ejemplo 1. Diseño de los materiales

- Se seleccionaron soportes planos de policarbonato (600 µm de grosor) como sustrato, por ser un material fabricado a escala industrial de forma muy barata y homogénea. Por
15 otro lado, se eligen películas de oro para la capa interferométrica, por la versatilidad de este metal para inmovilizar bioreceptores, así como su alta reflexividad y fácil deposición en capas nanométricas de grosor controlado. También se selecciona sulfuro de zinc (ZnS) y la aleación Ag-In-Sb-Te, por ser dos materiales conocidos en el estado del arte
20 que presentan índices de refracción muy distintos y permiten fabricar estructuras que generan las reflexiones multicapa necesarias para la respuesta interferométrica deseada.

- Los cálculos teóricos dieron lugar a una capa interferométrica estructurada según la
25 configuración mostrada en la Figura 1.

Ejemplo 2. Biosensor con respuesta interferométrica destructiva

- Se fabricaron, por sputtering, chips cuadrados de 1 x 1 cm con la estructura multicapa
30 que se muestra en la Figura 1 (I) y se obtuvieron experimentalmente materiales con la respuesta interferométrica mostrada en la Figura 2(I).

- En una realización preferente se emplea como sustrato una lámina de policarbonato de 600 µm de grosor, sobre la que se depositan por sputtering una capa interferométrica
35 constituida por una película de 50 nm de oro, seguido de una película de 60 nm de

sulfuro de zinc, seguido de una película de 15 nm de la aleación Ag-In-Sb-Te, seguido de una película de sulfuro de zinc de 65 nm, y finalmente una película de 5 nm de oro. Esta configuración se diseña para generar una respuesta interferométrica destructiva frente a ensayos de reconocimiento, de manera que el material interaccione con la luz blanca y refleje un color morado claro que cambie a color azul intenso en ensayos positivos.

Se demostró experimentalmente la capacidad de biosensado de estos materiales con un sistema modelo inmunoquímico basado en la proteína BSA (albumina de suero bovino) como bioreceptor, e inmunoglobulinas G específicas anti-BSA como analitos. Tras fabricar la capa interferométrica sobre el sustrato, se inmovilizó el receptor por adsorción pasiva sobre la superficie superior de oro, según una disposición de micromatriz (12 puntos por chip, ~1 mm de diámetro por punto). A continuación, se incubó sobre el material una disolución que contiene el analito, y se evaluó visualmente el cambio de color tras retirar la disolución.

La interacción entre el bioreceptor y el analito incrementa la cantidad de materia que conforma la capa de receptor. Así pues, parte de la interfase que antes estaba ocupada por aire (índice de refracción = 1), queda ahora ocupada por biomacromoléculas (índice de refracción entre 1,35 y 1,47). Este incremento en el índice de refracción modifica la respuesta interferométrica del material, lo que cambia la respuesta policromática de la radiación reflejada por éste, y como consecuencia se observa un cambio de color en los puntos con ensayos positivos. En este caso, el material está diseñado para generar cambios de color desde morado claro para ensayos negativos, hasta azul oscuro en ensayos positivos.

La Figura 2 (I) muestra el esquema de un chip tras incubar el analito (IgG anti-BSA) a diferentes concentraciones sobre los puntos de una micromatriz en la que se ha inmovilizado el receptor (BSA). Se observa el cambio de color esperado de morado a azul, detectable directamente con el ojo para ensayos positivos. Todos los individuos encuestados fueron capaces de identificar como positivas las cuatro concentraciones de analito más intensas analizadas en este experimento (fila superior de la micromatriz), lo que supone un límite de detección de alrededor de 30 µg/mL de analito para este sistema inmunoquímico y esta configuración del material.

Esta invención permite la detección visual de ensayos analíticos, en una única etapa, sin marcaje y sin necesidad de ningún tipo de instrumentación para el proceso de análisis. Por otro lado, esta invención es compatible con una estrategia que permite incrementar de forma muy simple la fiabilidad de los resultados obtenidos mediante
5 detección visual directa. Esta estrategia consiste en crear micromatrices conformadas por grupos de tres puntos, con un punto dedicado al ensayo de interés, otro punto como control negativo, y un tercero como control positivo. De esta manera, tal y como se muestra en la Figura 3 (I), se pueden discriminar falsos negativos y falsos positivos de forma rápida e intuitiva.

10

En este ejemplo de realización, para el punto dedicado al ensayo de interés se imprime BSA, para el control negativo se imprime la proteína ovoalbúmina, y para el control positivo se imprime un anticuerpo anti inmunoglobulinas de conejo (40 μ L a 100 μ g/mL en tampón carbonato en todos los casos). De esta manera, tal y como se muestra en la
15 Figura 3, se pueden discriminar falsos negativos y falsos positivos de forma rápida e intuitiva.

Ejemplo 3. Biosensor con respuesta interferométrica constructiva

20 En otra realización preferente se emplea como sustrato una lámina de policarbonato de 600 μ m de grosor, sobre la que se depositan por sputtering una capa interferométrica constituida por una película de 50 nm de oro, seguido de una película de 85 nm de sulfuro de zinc, seguido de una película de 20 nm de la aleación Ag-In-Sb-Te, seguido de una película de sulfuro de zinc de 85 nm, y finalmente una película de 5 nm de oro,
25 como se muestra en la Figura 1 (II). Esta configuración se diseña para generar una respuesta interferométrica constructiva frente a ensayos de reconocimiento, de manera que el material interaccione con la luz blanca y refleje un color plateado que cambie a color rojo en ensayos positivos, como se esquematiza en la Figura 2 (II).

30 Se demostró experimentalmente la capacidad de biosensado de estos materiales con un sistema modelo inmunoquímico basado en la proteína BSA (albumina de suero bovino) como bioreceptor, e inmunoglobulinas G específicas anti-BSA como analitos. Tras fabricar la capa interferométrica sobre el sustrato, se inmovilizó el receptor por adsorción pasiva sobre la superficie superior de oro, según una disposición de
35 micromatriz (12 puntos por chip, $\sim$ 1 mm de diámetro por punto). A continuación, se

incubó sobre el material una disolución que contiene el analito, y se evaluó visualmente el cambio de color tras retirar la disolución.

La interacción entre el bioreceptor y el analito incrementa la cantidad de materia que conforma la capa de receptor. Así pues, parte de la interfase que antes estaba ocupada por aire (índice de refracción = 1), queda ahora ocupada por biomacromoléculas (índice de refracción entre 1,35 y 1,47). Este incremento en el índice de refracción modifica la respuesta interferométrica del material, lo que cambia la respuesta policromática de la radiación reflejada por éste, y como consecuencia se observa un cambio de color en los puntos con ensayos positivos. En este caso, el material está diseñado para generar cambios de color desde color plateado para ensayos negativos, hasta color rojo en ensayos positivos.

La Figura 2 (II) muestra el esquema de un chip tras incubar el analito (IgG anti-BSA) a diferentes concentraciones sobre los puntos de una micromatriz en la que se ha inmovilizado el receptor (BSA). Se observa el cambio de color esperado de plateado a rojo, detectable directamente con el ojo para ensayos positivos.

Esta invención permite la detección visual de ensayos analíticos, en una única etapa, sin marcaje y sin necesidad de ningún tipo de instrumentación para el proceso de análisis. Por otro lado, esta invención es compatible con una estrategia que permite incrementar de forma muy simple la fiabilidad de los resultados obtenidos mediante detección visual directa. Esta estrategia consiste en crear micromatrices conformadas por grupos de tres puntos, con un punto dedicado al ensayo de interés, otro punto como control negativo, y un tercero como control positivo. De esta manera, tal y como se muestra en la Figura 3 (II), se pueden discriminar falsos negativos y falsos positivos de forma rápida e intuitiva.

Ejemplo 4. Detección del analito

Para realizar los ensayos, se incuban muestras disueltas en PBS-T (tampón fosfato salino con polisorbato 20) sobre la superficie del chip, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Para incubar una única muestra, se dispensan entre 60 y 120 microlitros de muestra sobre el biosensor. Pueden también incubarse gotas individuales sobre los diferentes puntos (1 microlitro/punto) para analizar muestras diferentes en un único biosensor. Tras incubar la muestra, el biosensor se lava con PBS-T, seguido de agua, y

se seca en corriente de aire. El resultado del análisis se conoce por inspección visual del color resultante en los puntos de la matriz.

REIVINDICACIONES

1. Un biosensor que permite la detección visual directa de analitos en una muestra, que comprende:
 - 5 i) Un sustrato (a) que actúa como soporte de la capa interferométrica (b), que es de acero;
 - ii) Una capa interferométrica (b) que consiste en una o varias películas superpuestas, con una disposición diseñada para generar fenómenos interferométricos constructivos y/o destructivos en el intervalo visible y para
10 modificar esta respuesta interferométrica en función de las propiedades de la capa de reconocimiento;
 - iii) Una capa de reconocimiento (c) compuesta de receptores biológicos que se fijan a la última película de la capa interferométrica (b), y que reconocen de forma específica a los analitos presentes en la muestra.
- 15 2. Biosensor según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el grosor de la capa de sustrato (a) es de entre 50 micrómetros y 5 milímetros.
3. Biosensor según la reivindicación 2, donde el grosor del sustrato (a) es de 600 μm .
- 20 4. Biosensor según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la capa interferométrica (b) está constituida por una o varias películas superpuestas que independientemente consisten en un material que se selecciona de entre metales, aleaciones, compuestos metálicos, silicio, y compuestos de silicio;
25 con la condición de que cuando el sustrato (a) del biosensor y la primera película de la capa interferométrica (b) consisten en un metal, estos metales son diferentes.
5. Biosensor según la reivindicación anterior, donde el metal de una o varias de las películas de la capa interferométrica (b) se selecciona de entre oro, plata, platino y
30 cromo
6. Biosensor según la reivindicación anterior, donde el metal es oro.
7. Biosensor según la reivindicación 4, donde la aleación de una o varias de las
35 películas de la capa interferométrica (b) se selecciona de entre Ni-Va, Ni-Fe, Ni-Cr, Fe-Co, Fe-Co-Ta-Zr, Co-Ta-Zr, Cu-Ga, Cu-In, Cu-In-Ga, Ti-Al, Al-Cu, Al-Sn-Cu y W-

Ti.

8. Biosensor según la reivindicación 4, donde la aleación de una o varias de las películas de la capa interferométrica (b) consiste en Ag-In-Sb-Te.
- 5 9. Biosensor según la reivindicación 4, donde el compuesto metálico de una o varias de las películas de la capa interferométrica (b) se selecciona de entre sulfuro de zinc, óxido de titanio, óxido de germanio, óxido de fósforo, óxido de boro y pentóxido de tántalo.
- 10 10. Biosensor según la reivindicación anterior, donde el compuesto metálico es sulfuro de zinc.
11. Biosensor según la reivindicación 4, donde el compuesto de silicio de una o varias de las películas de la capa interferométrica (b) se selecciona de entre óxido de silicio, 15 nitruro de silicio y cuarzo.
12. Biosensor según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las películas de la capa interferométrica se disponen para provocar fenómenos interferométricos constructivos junto con fenómenos interferométricos destructivos.
- 20 13. Biosensor según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los receptores biológicos de la capa de reconocimiento (c) se seleccionan de entre anticuerpos, enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, polímeros de impronta molecular, polisacáridos, complejos proteína-hapteno, bacterias, virus y tejidos.
- 25 14. Procedimiento de obtención de un biosensor según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende las siguientes etapas:
- i) Diseño de las películas que conforman el sustrato (a) y la capa interferométrica (b) a partir de cálculos teóricos basados en las ecuaciones de Fresnel;
- 30 ii) Preparación de la estructura multicapa de la capa interferométrica (b) mediante depositado por sputtering de las películas que la conforman;
- iii) Sobre la superficie de la capa interferométrica (b) se inmovilizan los bioreceptores mediante anclaje covalente o mediante fisisorción, conformando la capa de reconocimiento (c).
- 35 15. Procedimiento de detección de analitos que comprende las siguientes etapas:
- i) Poner en contacto el biosensor descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13

con la muestra a analizar;

- ii) Incubar dicha muestra sobre el biosensor; y
- iii) Evaluar visualmente el cambio de color de la capa de reconocimiento (c) del biosensor tras retirar la disolución.

5

16. Procedimiento según la reivindicación anterior, donde se llevan a cabo y en paralelo las etapas i), ii) y iii) sobre puntos constituidos por distintos bioreceptores, de manera que se obtenga una micromatriz conformada por grupos de tres puntos, con un punto dedicado al ensayo de interés de acuerdo con el proceso descrito anteriormente, otro
- 10 punto como control negativo, y un tercero como control positivo.

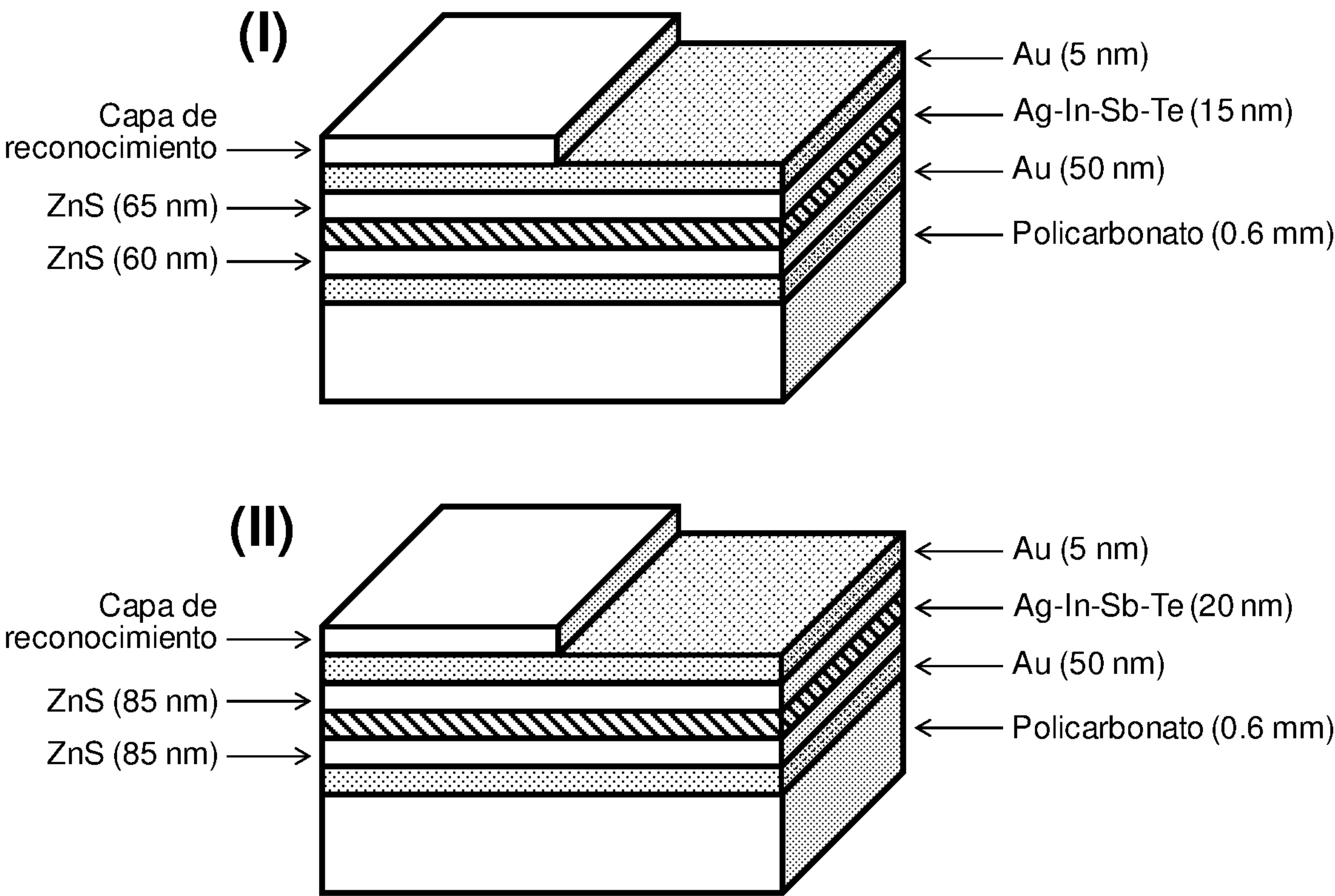


Fig. 1

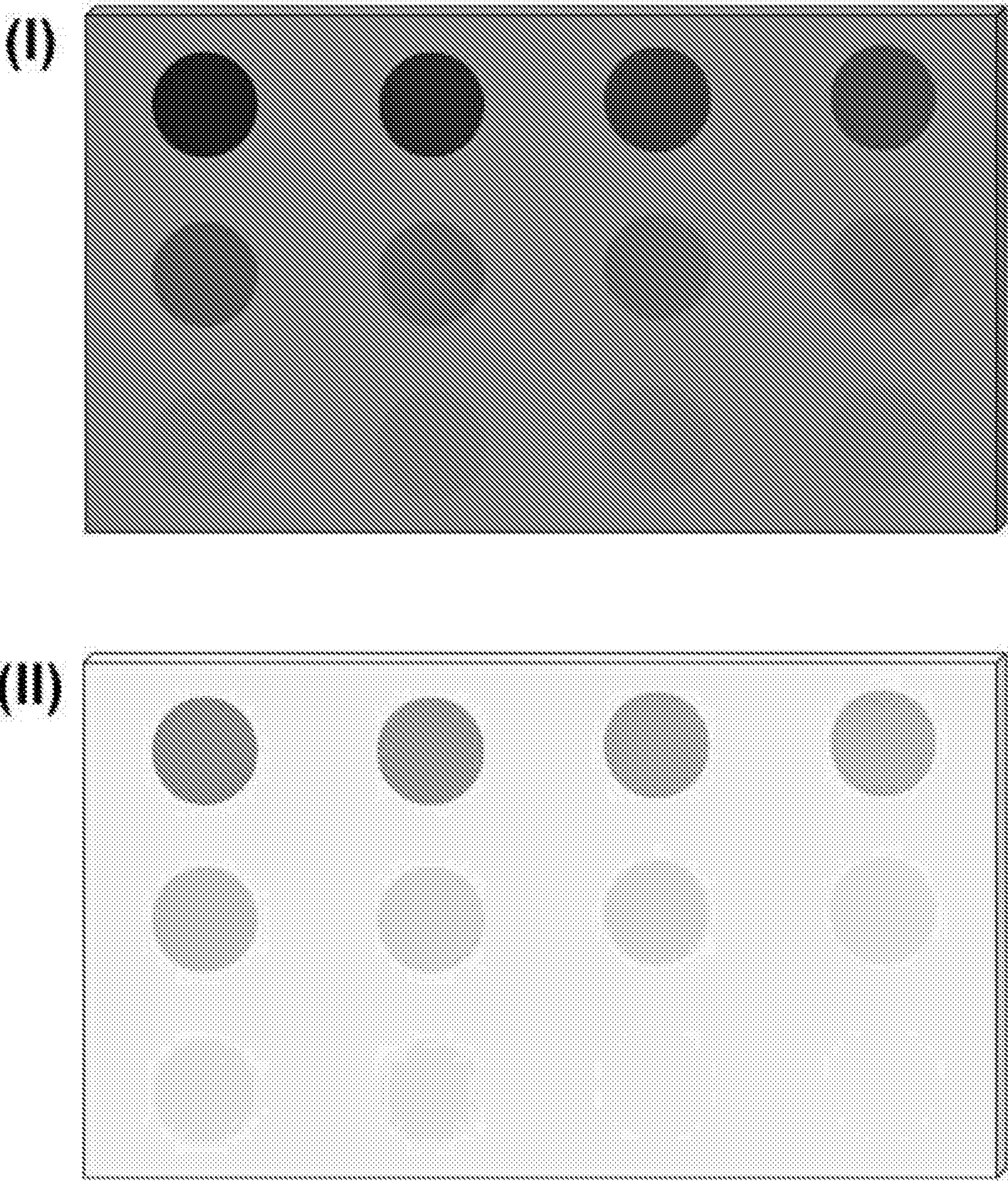


Fig. 2

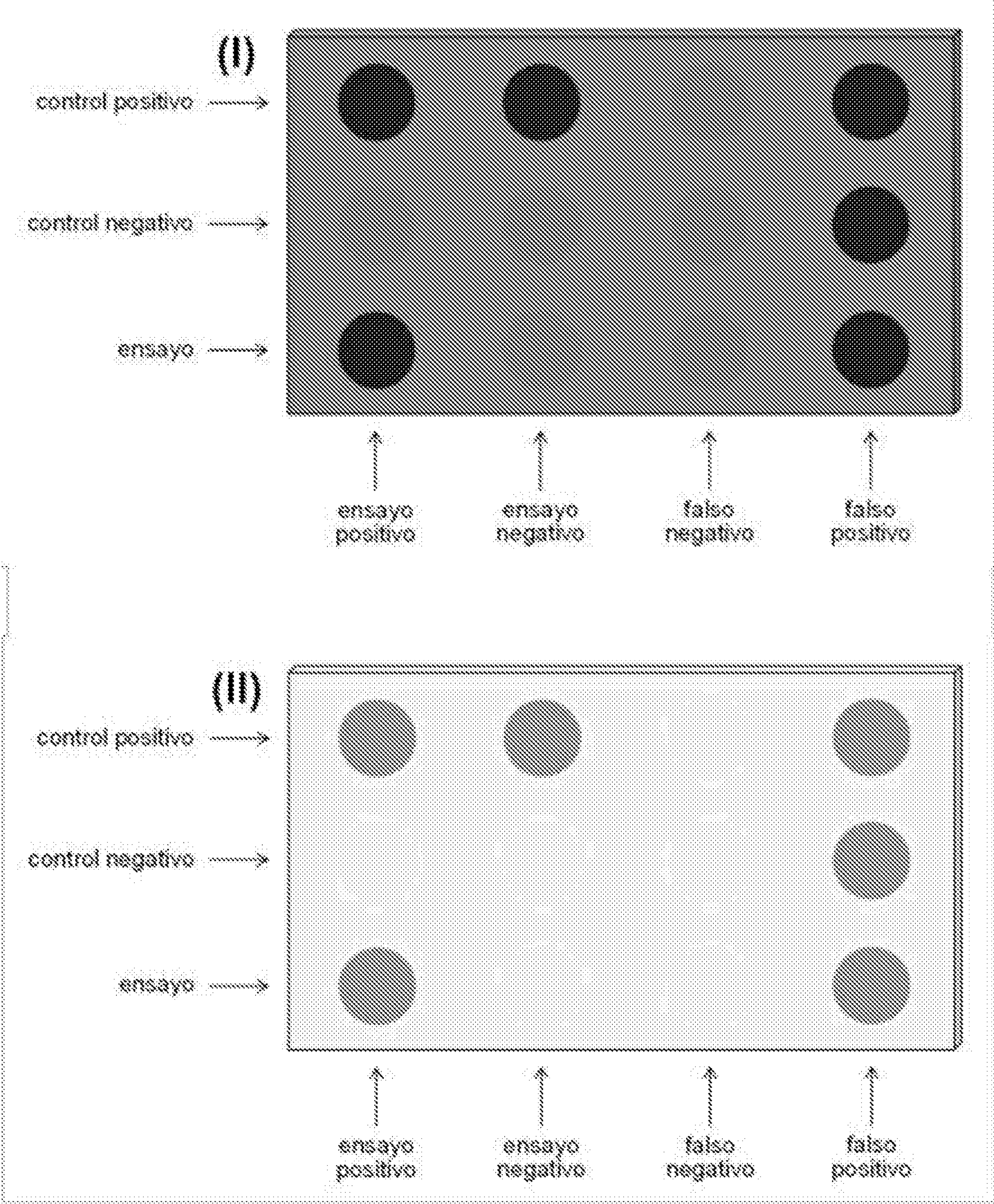


Fig. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2021/070009

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

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)

EPODOC, INVENES, WPI, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, INSPEC, CA, SCISEARCH, INTERNET

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MAIER I et al.: "Optical resonance-enhanced absorption-based near-field immuno chip biosensor for allergen detection", Analytical Chemistry United States, 15/04/2008, Vol. 80, N° 8, Pages 2694 - 2703, ISSN 1520-6882, doi:10.1021/ac702107k pubmed:18358010, the whole document, in particular, abstract, lines 1-13; page 2694, second column, lines 12-18; figures 1-3.	1-16
A	WO 9403774 A1 (BIOSTAR INC) 17/02/1994, the whole document, in particular, page 2, line 1 to page 3, line 16; page 4, line 22 to page 5, line 28; page 6, line 5 to page 7, line 2; page 28, line 27 a page 29, line 6; page 35, line 6 to page 36, line 13; claims 45 & 46.	1-16
X	GOPINATH S C B et al.: "A sensitive multilayered structure suitable for biosensing on the BioDVD platform", Analytical Chemistry, American Chemical Society USA, 15/06/2009, Vol. 81, N° 12, Pages 4963 - 4970, ISSN 0003-2700, doi:10.1021/ac802757z, the whole document; in particular, page 4963, line 8-22; table I; figure 1; page 4964, last paragraph; page 4966, first paragraph.	14, 15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"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)	"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
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"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 documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13/04/2021

Date of mailing of the international search report
(14/04/2021)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer
A. Maquedano Herrero

Telephone No. 91 3495474

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2021/070009

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GOPINATH SUBASH C B et al.: “Monitoring biomolecular interactions on a digital versatile disk: a BioDVD platform technology”, ACS nano United States, 23/09/2008, Vol. 2, N° 9, Pages 1885 - 1895, ISSN 1936-086X, doi:10.1021/nn800285p pubmed:19206429, abstract; figure 1; page 1893, "Methods. Fabrication of the multilayered bio-DVD"	14, 15
A	SANDSTROM T et al.: “Visual detection of organic monomolecular films by interference colors”, Applied Optics, USA, 15/02/1985, Vol. 24, N° 4, Páginas 472 - 479, ISSN 0003-6935, the whole document; in particular, abstract; pages 472-473, "II. Theory A. Interference of Light in Thin Films" y "B. Color Contrast" first paragraph; page 477, second column, lines 7 to 10.	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2021/070009

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO9403774 A1	17.02.1994	US5629214 A	13.05.1997
		US5869272 A	09.02.1999
		US5541057 A	30.07.1996
		JP2005049356 A	24.02.2005
		JP3787143B B2	21.06.2006
		JP2002098699 A	05.04.2002
		JP4060053B B2	12.03.2008
		JP2002122603 A	26.04.2002
		JP3547723B B2	28.07.2004
		JP2002116208 A	19.04.2002
		JP3507048B B2	15.03.2004
		JP2002122601 A	26.04.2002
		JP3673489B B2	20.07.2005
		JP2002139498 A	17.05.2002
		JP3456984B B2	14.10.2003
		JPH07509565 A	19.10.1995
		JP3506703B B2	15.03.2004
		HK1003304 A1	23.10.1998
		EP0727038 A1	21.08.1996
		EP0727038 A4	18.03.1998
		EP1635162 A2	15.03.2006
		EP1635162 A3	24.02.2010
		EP1126278 A2	22.08.2001
		EP1126278 A3	17.10.2001
		CA2141324 A1	17.02.1994
		AU4536093 A	03.03.1994
-----	-----	-----	-----

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N21/29 (2006.01)
G01N21/45 (2006.01)
G01N21/62 (2006.01)
G01N21/75 (2006.01)
G01N33/543 (2006.01)
G01N33/566 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL		Solicitud internacional nº PCT/ES2021/070009
A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD Ver Hoja Adicional 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 y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) EPODOC, INVENES, WPI, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, INSPEC, CA, SCISEARCH, INTERNET		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	MAIER I et al.: “Optical resonance-enhanced absorption-based near-field immunochip biosensor for allergen detection”, Analytical Chemistry United States, 15/04/2008, Vol. 80, Nº 8, Páginas 2694 - 2703, ISSN 1520-6882, doi:10.1021/ac702107k pubmed:18358010, todo el documento, en particular, resumen, líneas 1-13; página 2694, segunda columna, líneas 12-18; figuras 1-3.	1-16
A	WO 9403774 A1 (BIOSTAR INC) 17/02/1994, todo el documento, en particular, página 2, línea 1 a página 3, línea 16; página 4, línea 22 a página 5, línea 28; página 6, línea 5 a página 7, línea 2; página 28, línea 27 a página 29, línea 6; página 35, línea 6 a página 36, línea 13; reivindicaciones 45 y 46.	1-16
X	GOPINATH S C B et al.: “A sensitive multilayered structure suitable for biosensing on the BioDVD platform”, Analytical Chemistry, American Chemical Society USA, 15/06/2009, Vol. 81, Nº 12, Páginas 4963 - 4970, ISSN 0003-2700, doi:10.1021/ac802757z, todo el documento; en particular, página 4963, líneas 8-22; tabla I; figura 1; último párrafo de la página 4964; primer párrafo, página 4966.	14, 15
☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo		
* "A" "E" "L" "O" "P"	Categorías especiales de documentos citados: documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante. solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior. 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). documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio. documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	"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. "X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado. "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. "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 13/04/2021		Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional. 14 de abril de 2021 (14/04/2021)
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Nº de fax: 91 349 53 04		Funcionario autorizado A. Maquedano Herrero Nº de teléfono 91 3495474

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2021/070009

C (Continuación).

DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	GOPINATH SUBASH C B et al.: “Monitoring biomolecular interactions on a digital versatile disk: a BioDVD platform technology”, ACS nano United States, 23/09/2008, Vol. 2, Nº 9, Páginas 1885 - 1895, ISSN 1936-086X, doi:10.1021/nn800285p pubmed:19206429, resumen; figura 1; página 1893, "Methods. Fabrication of the multilayered bio-DVD"	14, 15
A	SANDSTROM T et al.: “Visual detection of organic monomolecular films by interference colors”, Applied Optics, USA, 15/02/1985, Vol. 24, Nº 4, Páginas 472 - 479, ISSN 0003-6935, todo el documento; en particular, resumen; página 472-473, "II. Theory A. Interference of Light in Thin Films" y "B. Color Contrast" primer párrafo; página 477, segunda columna, líneas 7 a 10.	1-16

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2021/070009

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO9403774 A1	17.02.1994	US5629214 A	13.05.1997
		US5869272 A	09.02.1999
		US5541057 A	30.07.1996
		JP2005049356 A	24.02.2005
		JP3787143B B2	21.06.2006
		JP2002098699 A	05.04.2002
		JP4060053B B2	12.03.2008
		JP2002122603 A	26.04.2002
		JP3547723B B2	28.07.2004
		JP2002116208 A	19.04.2002
		JP3507048B B2	15.03.2004
		JP2002122601 A	26.04.2002
		JP3673489B B2	20.07.2005
		JP2002139498 A	17.05.2002
		JP3456984B B2	14.10.2003
		JPH07509565 A	19.10.1995
		JP3506703B B2	15.03.2004
		HK1003304 A1	23.10.1998
		EP0727038 A1	21.08.1996
		EP0727038 A4	18.03.1998
		EP1635162 A2	15.03.2006
		EP1635162 A3	24.02.2010
		EP1126278 A2	22.08.2001
		EP1126278 A3	17.10.2001
		CA2141324 A1	17.02.1994
		AU4536093 A	03.03.1994
-----	-----	-----	-----

CLASIFICACIONES DE INVENCION

G01N21/29 (2006.01)
G01N21/45 (2006.01)
G01N21/62 (2006.01)
G01N21/75 (2006.01)
G01N33/543 (2006.01)
G01N33/566 (2006.01)