



(51) Clasificación Internacional de Patentes:
G01N 21/55 (2014.01) **B01L 3/00** (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2014/070215

(22) Fecha de presentación internacional:
21 de marzo de 2014 (21.03.2014)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(71) Solicitantes: **UNIVERSIDAD DE CANTABRIA** [ES/ES]; Pabellón de Gobierno, Avda. de los Castros s/n, E-39005 Santander (ES). **SERVICIO CÁNTABRO DE SALUD** [ES/ES]; Avda. Cardenal Herrera Oria s/n, Edificio Ifimav 3ª Planta, E-39011 Santander (ES). **FUNDACIÓN INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN MARQUÉS DE VALDECILLA (IDIVAL)** [ES/ES]; Avda. Cardenal Herrera Oria s/n, Edificio Ifimav 3ª Planta, E-39011 Santander (ES). **FUNDACIÓN TEKNIKER** [ES/ES]; Polo tecnológico de Eibar, c/Iñaki Goenaga 5, E-20600 Eibar, Guipuzkoa (ES). **CELLBIOCAN, S.L.** [ES/ES]; Avda. Eduardo García, 3, E-39011 Santander (ES).

(72) Inventores: **MORENO GRACIA, Fernando**; Pabellón de Gobierno, Avda. de los Castros s/n, E-39005 Santander (ES). **GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, Francisco**; Pabellón de Gobierno, Avda. de los Castros s/n, E-39005 Santander

(ES). **BARREDA GÓMEZ, Ángela Inmaculada**; Pabellón de Gobierno, Avda. de los Castros s/n, E-39005 Santander (ES). **DÍEZ AHEDO, Ruth**; Polo Tecnológico De Eibar, c/ Iñaki Goenaga 5, E-20600 Eibar, Guipuzkoa (ES). **OTADUY DEL PASO, Deitze**; Polo Tecnológico de Eibar, c/ Iñaki Goenaga 5, E-20600 Eibar, Guipuzkoa (ES). **MERINO ÁLVAREZ, Santos**; Polo Tecnológico de Eibar, c/ Iñaki Goenaga 5, E-20600 Eibar, Guipuzkoa (ES). **FERNÁNDEZ LUNA, José Luis**; Avda. Cardenal Herrera Oria s/n, Edificio Ifimav 3ª Planta, E-39011 Santander (ES). **TALAMILLO CANCELO, Ana**; Avda. Cardenal Herrera Oria s/n, Edificio Ifimav 3ª Planta, E-39011 Santander (ES).

(74) Mandatario: **VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**; Paseo de la Castellana 120, E-28046 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR DETECTING BIOMARKERS

(54) Título : DISPOSITIVO Y MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE BIOMARCADORES

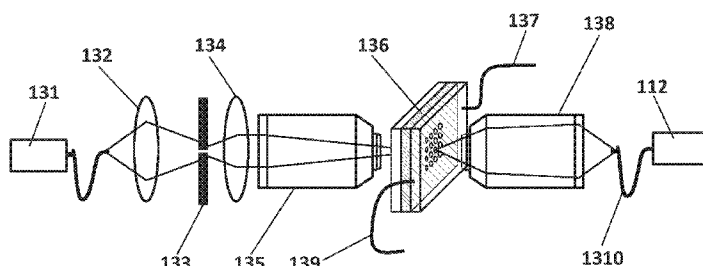


FIG. 1C

(57) Abstract: The invention relates to a biosensor for detecting the concentration or quantity of at least one biomarker present in a sample of fluid, said biosensor comprising: a chip (410, 510) having a substrate (411, 518) on which a metal layer has been deposited, said metal layer having at least one nanostructure (414, 514) designed to produce LSPR when subjected to optical radiation of a determined spectral range; and a resonant cavity delimited by two surfaces that act as a mirror, wherein one of the two surfaces is the metal layer having the nanostructuring (414, 514). The metal layer having at least one nanostructure (414, 514) is biofunctionalised using at least one biomolecule that recognises the at least one biomarker. In exposing the chip (410, 510) to optical radiation when the sample is in contact with the chip, the concentration or quantity of the biomarker present in the sample is measured, by comparing the spectral response of the light at the output of the chip (410, 510) with a previously determined spectral pattern. The spectral response responds to the combined effect of LSPR in the plasmonic nanostructure (414, 514) and the resonance of the resonant cavity.

(57) Resumen:

[Continúa en la página siguiente]





(84) **Estados designados** (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible):
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,

RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

Un biosensor para detectar la concentración o cantidad de al menos un biomarcador presente en una muestra de un fluido. Comprende: un chip (410, 510) que comprende: un sustrato (411, 518) sobre el que se ha depositado una capa de metal con al menos una nanoestructura (414, 514) diseñada para producir LSPR cuando es sometida a una radiación óptica de un determinado rango espectral; y una cavidad resonante delimitada por dos superficies que actúan como espejo, donde una de las dos superficies es la capa de metal con nanoestructura (414, 514). La capa de metal con al menos una nanoestructura (414, 514) está biofuncionalizada con al menos una biomolécula que reconoce dicho al menos un biomarcador. Al exponer el chip (410, 510) a radiación óptica cuando la muestra está en contacto con el chip, se mide la concentración o cantidad de dicho biomarcador presente en la muestra, mediante la comparación de la respuesta espectral de la luz a la salida del chip (410, 510) con un patrón espectral previamente determinado. La respuesta espectral responde al efecto combinado de LSPR en la nanoestructura plasmónica (414, 514) y de la resonancia de la cavidad resonante.

DISPOSITIVO Y MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE BIOMARCADORES

CAMPO TÉCNICO

La presente invención pertenece al campo de la detección de biomarcadores y, en particular, a la detección de biomarcadores en pacientes diagnosticados con cáncer, basada en la resonancia de plasmones de superficie localizados (LSPR, del inglés *Localized Surface Plasmon Resonance*).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El desarrollo de metástasis es la principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes con cáncer. Por ello, el desarrollo de métodos que permitan hacer un seguimiento de la evolución de la enfermedad y monitoricen la respuesta a los tratamientos tiene un gran valor clínico, ya que puede orientar al oncólogo a tomar decisiones que mejoren el curso de la enfermedad tumoral. La identificación de biomarcadores como las células tumorales circulantes (CTCs) y los micro-RNAs (también llamados en adelante miRs) en sangre periférica permite, mediante técnicas mínimamente invasivas, evaluar dichos parámetros.

Las CTCs son células epiteliales que se encuentran en la sangre periférica de pacientes con cáncer. La diseminación de las CTCs por el torrente sanguíneo a partir del tumor primario da lugar al desarrollo de metástasis, siendo ésta la principal causa de mortalidad en cáncer. Uno de los mayores problemas en la detección de CTCs es que se encuentran en número muy reducido en la sangre: nótese que en 1 ml de sangre hay del orden de 1 a 10 CTCs, 10^7 leucocitos y 10^9 eritrocitos. El tamaño de las CTCs varía entre 10-20 μm . Los métodos de detección de CTCs utilizados hasta ahora se basan principalmente en sus aspectos morfológicos o propiedades físicas (tamaño, densidad, carga), en la detección de ácidos nucleicos, y en la utilización de técnicas de inmunoseparación. Sin embargo, tanto la detección de ácidos nucleicos como la separación exclusivamente por propiedades físicas o morfológicas a partir de muestras de sangre presentan problemas de sensibilidad y/o especificidad.

En la actualidad, el único método que existe en el mercado, aprobado por la agencia gubernamental de control de alimentos y medicamentos de los EE.UU. (FDA), es el CELLSEARCH[®] (*CellSearchCirculating Tumor CellSystem*), comercializado por Veridex. CELLSEARCH[®] está basado en técnicas de inmunoseparación, que

incrementa la especificidad utilizando anticuerpos que reconocen proteínas de la célula tumoral. Este sistema es complejo, requiere de personal especializado y tiene un alto precio en el mercado.

Existe un segundo producto comercial - CellCollector™ de GILUPI- para detectar
5 células raras, tales como CTCs, in vivo. Se trata de una técnica invasiva que se aplica en el hospital mientras el paciente recibe su terapia y después de la misma.

Swée J.T. et al., en *Versatile label free biochip for the detection of circulating tumor cells from peripheral blood in cancer patients* (Biosensors and Bioelectronics 26 (2010) 1701-1705), describe la separación de CTCs usando un dispositivo microfluídico,
10 basándose en las diferencias de tamaño y capacidad de deformación entre células cancerosas y células sanguíneas.

A su vez, los miRs son RNAs no codificantes de 15-25 nucleótidos de longitud que regulan la expresión génica y que están implicados en multitud de procesos biológicos como proliferación y diferenciación celular, apoptosis y desarrollo. La expresión
15 alterada de los miRs se ha asociado con cáncer y otras patologías como diabetes, obesidad, enfermedades neurológicas, cardiovasculares o autoinmunes. Hasta la fecha, se han descrito más de 1500 miRs en humanos, pudiendo actuar como oncogenes (por ejemplo, miR-10b, -155, -21, miR-17-92) o como supresores de tumores (por ejemplo, miR-15, -16, -26a, -126, -335 y miembros de las familias *let-7* y
20 miR-34). El análisis de los patrones de expresión de miRs en diferentes tumores ha permitido caracterizar la “huella de miRs” para diversos tipos de cáncer, siendo tal la especificidad que incluso se puede identificar el tumor primario que origina la metástasis. Además, debido a su gran estabilidad, durante los últimos años se han identificado miRs en células circulantes de fluidos corporales como sangre, plasma
25 seminal, suero, saliva y orina, lo que permite su cuantificación, i.e. niveles de expresión, de un modo no invasivo, como describen Chen et al. (2008) y Di Leva and Croce, (2013). Los niveles de expresión de los miRs se correlacionan también con el estadio del tumor, y por lo tanto se pueden utilizar para estudiar la progresión del tumor, el pronóstico y la respuesta al tratamiento.

30 Por otra parte, la plasmónica es una ciencia relativamente moderna que se asienta en principios básicos de la óptica y la física de materiales, normalmente en el rango del visible-infrarrojo cercano (0,4-2μm). Su objeto de estudio son los plasmones o

resonancias plasmónicas: excitaciones colectivas de los electrones cuasi-libres presentes en los metales conformados a tamaño nanométrico, que en resonancia constituyen los plasmones superficiales localizados (LSPR). Para aplicaciones que requieran montajes de reducido tamaño, es aconsejable aprovechar los altos campos
5 electromagnéticos que se generan en la configuración LSPR al iluminar estructuras metálicas nanométricas. El caso de estructuras periódicas (de período menor que la longitud de onda excitadora) con nanoagujeros (usualmente de forma circular y de diámetro menor que la longitud de onda excitadora) constituye un caso de especial interés, dado que se ha demostrado su fácil fabricación y su alta sensibilidad a
10 cambios de las propiedades ópticas del medio circundante.

La solicitud de patente internacional WO-2011/106057-A2 describe un biosensor basado en una nanoestructura plasmónica sobre la que se hace incidir una radiación óptica (0,4-0,8 μ m). El sensor está formado por un sustrato y una película metálica depositada sobre el sustrato. La película metálica incorpora un conjunto de
15 nanoestructuras cuyas dimensiones son menores que la longitud de onda del haz de luz incidente.

Sipova, H. et al., en *Surface plasmon resonance biosensor for rapid label-free detection of microRNA at subfemtomol level* (Anal Chem. 2010 December 15; 82(24): 10110–10115) describe un método para detectar miRs basado en resonancia de
20 plasmones de superficie (SPR) mediante una red de difracción llamada acoplador y dispersor de plasmones de superficie (SPRCD).

Frolov, L., et al. En *Detection of Micro-RNA using LSPR Spectroscopy for Diagnostic Applications* (77th Meeting of the Israel Chemical Society, 7-8 February 2012) describe una plataforma biosensora basada en LSPR para la detección de miRs. La
25 identificación de los miRs implica la inmovilización de una secuencia de DNA unida a un grupo tiol y complementaria a la secuencia de miRs que se quiere detectar.

Escobedo C. et al., en *On-chip nanohole array based sensing: a review* (Lab Chip, 2013, 13, 2445-2463), describe sensores plasmónicos basados en arrays de nano-agujeros. También Escobedo, en la solicitud de patente estadounidense US-
30 2012/0292496-A1, describe un aparato para detectar muestras biológicas usando una matriz (en inglés, array) de nanoagujeros y excitación de plasmones. En concreto, la técnica de sensado utilizada es la basada en arrays de nanoagujeros con paso a

través (en inglés, *flow-through*). Esta técnica implica el paso del fluido portador de las muestras que se desea detectar a través del array de nanoagujeros. Debido a que las muestras deben fluir a través de dicho array, esta técnica no es válida para detectar células de tamaño superior al diámetro de los nanoagujeros. En otras palabras, la

5 técnica no es válida para detectar CTCs. Además, requiere de la aplicación de campos eléctricos externos y elevadas presiones, lo que dificulta la posibilidad de usar “chips” desechables y fáciles de manejar por un operario de hospital no especializado.

La solicitud de patente estadounidense US-2012129192-A describe un detector de CTCs basado en un sistema de microfluídica y un conjunto de nanoestructuras

10 funcionalizadas con anticuerpos. Dichas nanoestructuras son *nanoagujas* de gran flexibilidad. La detección de CTCs se basa en que éstas queden atrapadas por las nanoagujas. Sin embargo, este sistema puede no ser específico. Las nanoagujas están diseñadas para que las células de cierto tamaño queden atrapadas entre ellas. Sin embargo se corre el riesgo de que otras células diferentes de las CTCs, pero de

15 tamaño similar (p.ej., monocitos en sangre), también queden atrapadas, o que las CTCs, debido a su plasticidad, no queden atrapadas, distorsionando el resultado final.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención trata de resolver los inconvenientes mencionados anteriormente

20 mediante un sistema para la detección de biomarcadores, tales como CTCs o miRs, que sea simple y de gran especificidad. Por simple se entiende que el sistema sea de fácil manejo, de reducido tamaño, que no requiera de personal especializado y que pueda usarse en la cadena de análisis clínicos hospitalarios. Por gran especificidad se entiende que sea selectivo en la identificación del biomarcador en cuestión.

25

La invención se basa en los cambios producidos en una superficie nanoestructurada al pasar la luz debido al cambio de índice de refracción del medio en contacto con dicha superficie. Es decir, cuando la luz atraviesa una superficie nanoestructurada, se producen cambios (principalmente desplazamientos) en la frecuencia de resonancia

30 del plasmón en función de la variación del índice de refracción del medio. Por tanto, sirve para sensorizar cualquier cambio en este medio ya sea acuoso, orgánico o de cualquier otro origen. Los cambios en el índice de refracción pueden ser debidos a la presencia de un biomarcador, tipo CTCs o miRs, no siendo limitativa la invención a

este tipo de biomarcador. Para mejorar la sensibilidad de este cambio en el medio se puede activar (biofuncionalizar) la superficie con cualquier biomolécula ad-hoc para el biomacardor en cuestión que se esté monitorizando en cada momento.

- 5 En un primer aspecto de la invención, se proporciona un biosensor para detectar la concentración o cantidad de al menos un biomarcador presente en una muestra de un fluido. El biosensor comprende: un chip que comprende: un sustrato sobre el que se ha depositado una capa de metal sobre la que se implementado al menos una nanoestructura diseñada para producir resonancia de plasmones de superficie
10 localizados (LSPR) cuando es sometida a una radiación óptica de un determinado rango espectral; y una cavidad resonante delimitada por dos superficies que actúan como espejo en ese determinado rango espectral. Una de las dos superficies que delimitan la cavidad resonante es la capa de metal con al menos una nanoestructura. Esta capa de metal con al menos una nanoestructura está biofuncionalizada con al
15 menos una biomolécula que reconoce el citado biomarcador, El biosensor está configurado para, al exponer al chip a radiación óptica en ese rango espectral cuando la muestra está en contacto con el chip, medir la concentración o cantidad del biomarcador presente en la muestra, mediante la comparación de la respuesta espectral de la luz a la salida del chip con un patrón espectral previamente
20 determinado. Esta respuesta espectral responde al efecto combinado de la resonancia de plasmones de superficie localizados (LSPR) en la al menos una nanoestructura plasmónica y de la resonancia de la cavidad resonante.

- En una posible realización, el chip comprende un segundo sustrato sobre el que se ha depositado una capa de metal que consituye la segunda superficie que delimita la
25 cavidad resonante, estando el biosensor configurado para que, en uso, el flujo de la muestra pase a través de la cavidad resonante.

- En una realización más particular, sobre esa capa de metal depositada sobre el
30 segundo sustrato se ha implementado al menos una nanoestructura diseñada para producir resonancia de plasmones de superficie localizados (LSPR) cuando es sometida a una radiación óptica de un determinado rango espectral.

En otra posible realización, el chip comprende, sobre la otra superficie del sustrato, una segunda capa de metal que constituye la segunda superficie que delimita la cavidad resonante, estando el biosensor configurado para que, en uso, el flujo de la muestra pasa sobre la capa de metal sobre la que se ha implementado al menos una nanoestructura y que actúa como primera superficie que delimita la cavidad resonante.

En otra posible realización, el chip comprende un segundo sustrato sobre el que se ha depositado una capa de metal que constituye la segunda superficie que delimita la cavidad resonante, estando el biosensor configurado para que, en uso, el flujo de la muestra pasa sobre la capa de metal sobre la que se ha implementado al menos una nanoestructura y que actúa como primera superficie que delimita la cavidad resonante.

En una realización más particular, sobre esa capa de metal depositada sobre el segundo sustrato se ha implementado al menos una nanoestructura diseñada para producir resonancia de plasmones de superficie localizados (LSPR) cuando es sometida a una radiación óptica de un determinado rango espectral.

Preferentemente, el biosensor comprende, sobre el sustrato, una capa de metal para facilitar la adhesión de la capa de metal que delimita la cavidad resonante.

Preferentemente, la al menos una nanoestructura es un nanoagujero.

En una posible realización, el chip comprende una pluralidad de arrays de nanoestructuras diferentes, quedando el biosensor configurado para medir la concentración o cantidad de diferentes biomarcadores simultáneamente.

Preferentemente, una dimensión de la al menos una nanoestructura es menor que la longitud de onda de la luz a la que se expone el chip. En el caso de que la al menos una nanoestructura sea un nanoagujero, esta dimensión es el diámetro del nanoagujero.

Preferentemente, el biosensor comprende además una celda microfluídica para inmovilizar los biomarcadores sobre la superficie del chip.

En una posible realización, el biosensor comprende además: una fuente de luz para proporcionar una radiación óptica de un determinado rango espectral al chip; medios para hacer llegar la muestra de fluido al chip; medios ópticos para adecuar la luz
5 proveniente de la fuente de luz a la iluminación del chip; medios ópticos para captar una señal óptica con información sobre la muestra procedente del chip; y medios para visualizar y analizar la señal óptica procedente del chip.

En una realización preferente, el al menos un biomarcador son células tumorales
10 circulantes (CTCs).

En un segundo aspecto de la invención, se proporciona un kit de diagnóstico para analizar una muestra de un fluido para determinar la concentración y/o cantidad de al menos un biomarcador de una enfermedad, que comprende un biosensor como el descrito anteriormente.

15

En un tercer aspecto de la invención, se proporciona un uso del biosensor descrito anteriormente, para diagnosticar la presencia y/o evolución de metástasis.

En un cuarto aspecto de la invención, se proporciona un método para detectar la
20 cantidad y/o concentración de al menos un biomarcador presente en una muestra de un fluido, donde esa cantidad y/o concentración de al menos un biomarcador es indicativa de la presencia o ausencia de una enfermedad o de la evolución de una enfermedad. El método comprende las etapas de: hacer fluir una muestra de un fluido por un chip que comprende al menos un sustrato sobre el que se ha depositado una
25 capa de metal sobre la que se ha implementado al menos una nanoestructura, y una cavidad resonante delimitada por dos superficies que actúan como espejo en un determinado rango espectral, donde una de las dos superficies que delimitan la cavidad resonante es la capa de metal con al menos una nanoestructura;
someter al chip a una radiación óptica en ese determinado rango espectral, donde esa
30 radiación óptica produce resonancia de plasmones de superficie localizados (LSPR) en la al menos una nanoestructura y resonancia en la cavidad resonante;
determinar la concentración del al menos un biomarcador presente en la muestra,

mediante la comparación de la respuesta espectral de la luz a la salida del chip con un patrón espectral previamente determinado, donde esa respuesta espectral responde al efecto combinado de la resonancia de plasmones de superficie localizados en la al menos una nanoestructura plasmónica y de la resonancia de la cavidad resonante.

5

En una posible realización, la etapa de hacer fluir una muestra de un fluido por un chip comprende hacer pasar el flujo de la muestra a través de la cavidad resonante.

En otra posible realización, la etapa de hacer fluir una muestra de un fluido por un chip
10 comprende hacer pasar el flujo de la muestra sobre la capa de metal sobre la que se ha implementado al menos una nanoestructura y que actúa como primera superficie que delimita la cavidad resonante.

En un quinto aspecto de la invención, se proporciona un método para diagnosticar la presencia y/o evolución de metástasis que comprende aplicar el método para detectar
15 la cantidad y/o concentración de al menos un biomarcador presente en una muestra de un fluido descrito anteriormente.

Las ventajas de la invención resultarán aparentes a la vista de la descripción que se presenta a continuación.

20 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

Para complementar la descripción y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, de acuerdo con un ejemplo de realización práctica de la misma, se acompaña como parte integrante de la descripción, un juego de figuras en el que con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo
25 siguiente:

La figura 1A muestra un esquema de un sistema de detección de biomarcadores de cáncer, de acuerdo con una realización de la invención. La figura 1B muestra la incidencia y transmitancia de la luz sobre el chip multiplexado de la invención de acuerdo con la figura 1A. La figura 1C describe el montaje óptico de acuerdo con una
30 posible implementación del sistema de la invención, desde la iluminación hasta la recogida y el procesado de la señal. Las figuras 1D y 1E muestran un ejemplo de una celda microfluídica usada en la invención.

La figura 2 ilustra un esquema de una configuración básica del chip de la invención.

La figura 3A muestra un esquema del diseño de una nanoestructura, en este caso nanoagujeros implementada sobre un chip. La figura 3B muestra una vista de una posible nanoestructura del chip. La figura 3C representa una posible configuración multiplexada, es decir, con más de una nanoestructura con capacidad sensora, en un mismo chip de la invención.

Las figuras 4A, 4B, 5A, 5B y 5C muestran diversos diseños del chip, en este caso con cavidad resonante tipo Fabry-Perot, de acuerdo con posibles realizaciones de la invención.

10 Las figuras 6A y 6B muestran una configuración en la que el fluido fluye a través de la cavidad Fabry-Perot creada de acuerdo con las figuras 4A y 4B respectivamente.

Las figuras 7A, 7B y 7C muestran una configuración alternativa, en la que el fluido fluye mediante una celda microfluídica sobre la superficie del chip nanoestructurado de acuerdo con las figuras 5A, 5B y 5C respectivamente.

15 La figura 8 muestra un esquema de la iluminación utilizada en las simulaciones numéricas.

La figura 9 muestra el espectro de transmisión obtenido en la simulación de la geometría o configuración básica (ejemplo 1) a partir de la iluminación de la figura 8.

La figura 10 muestra un ejemplo del campo cercano para la resonancia de 760nm en la figura 9 (ejemplo 1).

La figura 11 muestra la sensibilidad obtenida (390.71nm/R.I.U.) del chip de la invención para la geometría simulada de acuerdo con una configuración básica (ejemplo 1).

La figura 12 muestra el espectro de reflexión obtenido en la simulación del chip de la invención con geometría o configuración con cavidad resonante tipo Fabry-Perot (figura 5A con el flujo sobre la superficie del chip como se muestra en la figura 7A) (ejemplo 2).

La figura 13 muestra la variación del espectro de reflexión con el cambio en el índice de refracción de la muestra en la configuración anterior (ejemplo 2).

La figura 14 muestra la sensibilidad obtenida (198.57nm/R.I.U.) para la geometría con cavidad resonante (ejemplo 2). Aunque se aprecia una disminución de la sensibilidad, se observa también un estrechamiento de los picos de resonancia, lo cual redunda en un aumento en el factor de calidad del sistema de detección.

- 5 La figura 15 muestra el espectro de transmisión obtenido para el caso de la geometría con cavidad resonante tipo Fabry-Perot (figura 4A con la muestra en el interior de la cavidad, como se muestra en la figura 6A) (ejemplo 3).

La figura 16 muestra en el espectro de transmisión la región de la resonancia que proporciona valores más altos de la transmisión (ejemplo 3).

- 10 La figura 17 muestra la sensibilidad obtenida (489.72nm/R.I.U.) para la geometría con cavidad resonante y la muestra en el interior de la cavidad (ejemplo 3). Se observa una mejora sustancial frente a la configuración básica de chip.

La figura 18 muestra un esquema del modelo usado en una simulación en la que se ha modelado la presencia física de una o más CTCs.

- 15 La figura 19 muestra la sensibilidad obtenida del chip de la invención para la geometría simulada de acuerdo con una configuración básica y el modelo de la figura 18. Se ha comprobado que la presencia de dos o más células produce desplazamientos que siguen un comportamiento lineal con el número de células.

20 DESCRIPCIÓN DE UN MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

- El sistema o sensor para detectar biomarcadores, preferentemente de cáncer, tales como CTCs y miRs, en un fluido, como por ejemplo la sangre, está basado en la resonancia de plasmones de superficie localizados (LSPR). El fluido es preferentemente un fluido de pacientes con cáncer de colon, mama, pulmón, próstata u otros tumores. El sistema sensor basado en nanoestructuras plasmónicas que se describe a continuación aprovecha los formidables efectos (fundamentalmente de modificación de las propiedades espectrales y de amplitud de la luz incidente) de la transmisión/reflexión de luz sobre nanoestructuras (preferentemente, pero no limitativamente, nanoagujeros) combinados con los efectos de cavidad resonante. El
- 25
- 30 sistema, preferentemente acoplado a un dispositivo microfluídico por donde circula el

fluido, permite la detección de biomarcadores tumorales con una gran sensibilidad, y por lo tanto, el seguimiento de la enfermedad y la monitorización de la respuesta al tratamiento.

El sistema biosensor de la invención detecta la concentración (o número, en el caso de
5 que se detecten “elementos” individuales) de un biomarcador presente en una muestra de un fluido. El sistema atrapa el o los biomarcadores de interés y a continuación detecta el cambio de la señal (principalmente desplazamiento del espectro de la luz incidente) que estos biomarcadores producen. Finalmente correlaciona este cambio de señal óptica con la presencia de biomarcadores (por ejemplo, en el caso de CTCs
10 número de células y en el caso de los miRs concentración en la muestra) detectados.

Ejemplos no limitativos de biomarcadores que el biosensor de la invención es capaz de atrapar para posteriormente determinar su concentración (ya sea contar elementos individuales, como células, o calcular la concentración de elementos que no es posible
15 contar de forma individual), son: células y biomoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, tales como miRs, mRNAs y DNAs, entre otras).

En una realización preferente, el biosensor es capaz de detectar (atrapar y cuantificar) la presencia de al menos un biomarcador: las llamadas células tumorales circulantes
20 (CTCs) o una concentración mínima en el rango de ng/ml de otro tipo de biomarcador, como puede ser una biomolécula tipo miR, mRNAs, DNA, o proteínas.

En el contexto de esta invención, se entiende por fluido cualquiera de las sustancias de la siguiente lista no exhaustiva: sangre y orina. Ambos fluidos, sangre y orina,
25 pueden haber sufrido un pre-tratamiento o filtrado para eliminar parte de sus componentes que puedan interferir negativamente en la medida. Otros fluidos que puedan portar biomarcadores, por ejemplo de cáncer, se consideran también fluidos en el contexto de esta invención.

Se entiende por “nanoestructura” una estructura cuyas dimensiones se encuentran en
30 el rango entre 1 y 3000 nm. Con respecto a un sustrato, la nanoestructura puede estar situada sobre o integrada en el sustrato. Estas nanoestructuras pueden tener formas diversas, ya sean sobre la capa o capas de metal, tales como columnas, esferas, triángulos, o integradas en ellas, como agujero, rendija, o cualquier otra forma

tridimensional. Las nanoestructuras se disponen en el sustrato formando una matriz o array de nanoestructuras (a lo largo de este texto, se utilizan indistintamente los términos “matriz” o “array”).

- 5 En una realización preferente de esta invención, las nanoestructuras tienen forma de nanoagujeros. En otras realizaciones pueden usarse nanoestructuras diferentes de los nanoagujeros.

- La figura 1A muestra un esquema de una posible configuración del sistema de
10 detección de biomarcadores de la invención. El sistema 100 es un biosensor basado en un chip con nanoestructuras plasmónicas (preferentemente nanoagujeros distribuidos de forma periódica, pudiendo ser o no simétrica), que comprende una fuente de luz 111 estable para la iluminación del chip (biosensor) 110; un medidor o
medios de medición 112 para visualizar y analizar la señal óptica producida
15 (transmitida o reflejada) por el biosensor con información sobre la muestra y captada por una fibra; una fuente de alimentación y controlador 113 del dispositivo completo; un sistema periférico 114 que comprende una bomba fluídica para el bombeo de la muestra a través de una celda microfluídica y medios ópticos 116 para adecuar la luz proveniente de la fuente de luz 111 a la iluminación del chip 110.
- 20 El chip 110, que preferentemente es desechable y de bajo coste, está formado por un sustrato (usualmente vidrio aunque pueden usarse otros materiales transparentes a la luz incidente procedente de la fuente 111) sobre el que se han depositado una o varias capas metálicas. La capa o capas metálicas comprenden a una o más superficies que a su vez comprenden nanoestructuras dispuestas de acuerdo con un patrón
25 predeterminado. En una realización preferente, el patrón predeterminado de nanoestructuras es un patrón periódico. La dimensión de cada nanoestructura sobre la superficie metálica es menor que la longitud de onda del espectro de una fuente de luz óptica 111 que incide sobre ella (superficie metálica 122), produciendo LSPR en las nanoestructuras, tal y como esquematiza la figura 1B (la referencia 123 se refiere a la
30 luz transmitida con efecto LSPR). Cuando el patrón de nanoestructuras es periódico, el periodo (separación entre nanoestructuras) puede ser mayor o menor que la longitud de onda de la luz incidente. El dispositivo propuesto puede trabajar tanto por reflexión como por transmisión. En el primer caso se analizan las propiedades espectrales de

la luz reflejada y en el segundo, las de la transmitida. En general, se puede utilizar cualquier diseño óptico que permita llevar la luz procedente de la fuente de luz a la(s) zona(s) sensora(s) del chip. La figura 1B muestra la incidencia (flecha superior hacia el chip) y transmitancia (flecha inferior que sale del chip) de la luz sobre el chip, en este caso multiplexado. El chip 110 está biofuncionalizado con anticuerpos. Alternando diferentes áreas de nanoestructuras (arrays) sobre el metal de un mismo chip, se consigue un sistema multiplexado (representado en la figura 1B por los cuadrados en la superficie del chip). Un sistema multiplexado permite la detección de varios biomarcadores tumorales, biomoléculas y/o estructuras más complejas (como CTCs), de forma simultánea. La figura 1B esquematiza también la celda microfluídica 121. Los detalles del chip se explican más adelante, en relación con las figuras 2 a 7B.

Los medios 112 para analizar y visualizar la señal óptica pueden ser internos o externos al sistema 100. En una realización preferente, son internos. Ejemplos no limitativos de los medios 112 que pueden usarse son espectrómetros, fotoespectrómetros, arrays de fotodiodos tipo CCDs (*charge-coupled devices*), CMOS (*Complementary Metal Oxide Semiconductor*) o similares, cámaras digitales, PMTs (*Photo Multiplier Tube*, tubos fotomultiplicadores) y APDs (*Avalanche Photo Diode*, fotodiodos de avalancha). Preferentemente se usa un fotoespectrómetro 112. En una posible realización, el sistema comprende un sensor CCD, que permite obtener un espectro por cada canal (eje y). La imagen proporciona la información espectrométrica completa. Esto permite recoger la señal procedente de las distintas zonas sensoras (nanoestructuras) simultáneamente (chips multiplexados).

En general, se puede utilizar cualquier diseño óptico que permita coleccionar la luz transmitida o reflejada en la superficie del chip al sistema de análisis y visualización de la señal óptica. Un ejemplo de colector de la luz es el objetivo de microscopio junto con la fibra óptica representada en la figura 1C (138, 1310 respectivamente).

El sistema 100 comprende un sistema óptico para la emisión del haz de luz excitador y lectura de la respuesta del biosensor, representado en la figura 1A de forma general mediante los elementos 111, 112 y 116. En una posible implementación, el sistema óptico funcionando por transmisión, esquematizado en la figura 1C, está compuesto por una fuente de luz 131, un sistema óptico de focalización del haz de luz excitador

132, un diafragma de filtrado espacial del haz 133, un sistema óptico de colimación del haz 134 y un objetivo de microscopio 135 que focaliza dicho haz sobre un chip, preferentemente desechable, con una celda microfluídica (ambos esquematizados juntos y referenciados como 136). La microfluídica sirve para que la muestra fluya por encima de la(s) zona(s) sensora(s) del chip (nanoestructuras) previamente biofuncionalizadas para que ésta(s) (la(s) zona(s) sensora(s)) capturen el biomarcador específico que se quiere detectar. Este proceso es dinámico. Una vez hecho esto y limpiado adecuadamente, tiene lugar el proceso de detección propiamente dicho, que es puramente estático (los biomarcadores, por ejemplo CTCs, se han quedado anclados al chip. Por la celda microfluídica fluye la muestra a monitorizar que ha sido bombeada y llega a la celda por un tubo de entrada 137 y es drenada a través de uno de salida 139. Aunque no se representa en la figura 1C, los tubos 137 139 se comunican con el sistema periférico 114 de la figura 1A (bombeo de la muestra). La luz transmitida a través del chip es recogida por otro objetivo de microscopio 138 acoplado a un fibra óptica 1310, que, a su vez está acoplada a un espectrómetro o espectrofotómetro 112. La fuente de luz 131 puede proporcionar tanto luz no polarizada como polarizada o como parcialmente polarizada. La luz procedente de la fuente 131 emite preferentemente en la franja espectral UV y/o VIS y/o IR. En una posible realización, la fuente de luz 131 es una fuente de luz blanca de espectro conocido. Se pueden introducir filtros interferenciales para acotar el espectro de la luz excitadora o filtros polarizadores. Como un experto puede entender, no todos los elementos ópticos descritos en relación con la figura 1C son imprescindibles ni la configuración de la figura 1C es la única posible. Por ejemplo, es deseable pero no esencial que la luz llegue focalizada al chip.

El chip 110 es preferentemente desechable y de bajo coste. Al ser desechable se evita el problema de limpiarlo para volver a utilizarlo después de que haya quedado contaminado por una muestra anterior. Como técnica de fabricación se utiliza preferentemente la litografía de nanoimpresión (NIL, del inglés *Nanoimprint Lithography*). Esta técnica hace que el chip y por tanto, el dispositivo final- sean baratos tanto en términos económicos como de tiempo de fabricación. Además, debido a la configuración del dispositivo (preferentemente alineación de óptica en horizontal cuando funciona por transmisión de la luz, aunque en este caso también podría ser vertical o en forma de L mediante prismas), el cambio del chip una vez usado es muy

sencillo y el montaje final del dispositivo (integración de todos los componentes y alojamiento en la carcasa final) facilita el cambio del chip desechable, garantizando un correcto posicionamiento del chip (mejor que en otros dispositivos más complejos basados en SPR, por reflexión). Todo esto es igualmente aplicable al caso de la configuración trabajando por reflexión.

El sistema microfluídico o celda microfluídica 136 (figura 1C) permite inmovilizar sobre la superficie metálica del chip biomoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, entre otras) o células de manera automática y sin la intervención humana directa ya que dicha celda está alimentada por un sistema periférico 114 (figura 1A). La celda puede tener o no tener canales microfluídicos integrados en un sistema fluídico alimentado. Ejemplos de elementos que forman parte de este sistema periférico 114 son bombas y/o válvulas. La celda microfluídica está formada por una lámina de polímero desechable y componentes reutilizables. La celda fluídica en sí misma queda fuera del alcance de esta invención. La celda fluídica o microfluídica 121 puede observarse también en la figura 1B, en la que la celda se representa como una lámina transparente 121 encima del chip. Aunque no se representan en las figuras 1B o 1C, la celda fluídica 121 136 puede comprender un conjunto de microcanales por los que circula la muestra. Por la celda microfluídica se hace circular la muestra de fluido (por ejemplo, sangre), que ha podido ser pretratado (filtrado) o no, que contiene el biomarcador (por ejemplo, las CTCs) que interaccionará con el ligando o biomolécula con el que se ha funcionalizado el chip. La celda fluídica puede implementarse de varias formas.

Las figuras 1Dy 1E muestran un ejemplo de celda microfluídica 140 utilizada en la presente invención. Esta celda 140 se basa en un sistema de flujo de la muestra colocado sobre la superficie del chip nanoestructurado. Esta configuración de celda microfluídica es la usada, por ejemplo, en los chips de las figuras 2, 3C, 5A y 5B. Esta posible implementación de celda microfluídica no es limitativa, pudiendo usarse cualquier otra celda o dispositivo que pueda hacer llegar la muestra a las zonas sensoras del chip. La figura 1D muestra la parte exterior de la celda microfluidica 140 del ejemplo, mientras que la figura 1E muestra sus elementos interiores.

En su parte externa, la celda 140 está formada por una carcasa a su vez formada por una base 153 y una tapa 154. En este caso ambas son de acero inoxidable. La carcasa comprende también unos conectores microfluídicos 152 que conectan la celda con el sistema de bombeo mediante tubos micrométricos y unas levas 151 para el

cierre de la carcasa, asegurando la estanquidad de la celda. Estas levas permiten diferentes profundidades de microcanales y pozos de alojamiento de la muestra.

En su parte interna (figura 1E), la celda propiamente dicha 140 comprende una lámina 142 de alojamiento para el chip desechable, cuyo espesor es similar al del chip 143.

5 En este ejemplo, el chip 143 tiene unas dimensiones de 20x20mm. El chip contiene zonas sensoras (las nanoestructuras). Debido a que el chip tiene varias zonas sensoras, se trata de un sistema multiplexado. La celda 140 comprende también una lámina 144, que en el ejemplo es de polietileno, cuyo espesor se adapta a la muestra que se va a monitorizar. En esta lámina 144 se mecanizan los pozos en donde se aloja
10 la muestra 1441 y los microcanales 1442 que llevan y recogen la muestra de las zonas sensoras (pozos). Ambas láminas 142 144 forman el interior de un "sándwich" cuyos extremos son una lámina 141, que en este ejemplo es de acero inoxidable y tiene un espesor de 1mm, y una tapa 145 que hace estanco el sistema microfluídico y en este ejemplo es de pírex.

15 Alternativamente, la celda se puede basar en un sistema de flujo de la muestra que permite el paso de la misma a través de una cavidad formada por dos superficies "espejo" (metálicas) comprendidas en el chip. Esta configuración de celda microfluídica es la usada, por ejemplo, en los chips de las figuras 4A y 4B. En este caso (figuras 4A y 4B), en una implementación mínima, el flujo de muestra puede circular directamente
20 entre las dos capas delgadas de metal (413 y 414 en la figura 4A y 414 y 414' en la figura 4B). Sin embargo, si en esta configuración Fabry-Perot utiliza un chip multiplexado, es decir, con varias matrices de nanoestructuras distribuidas en el chip, entonces es necesario añadir una celda microfluídica (con sus canales) que lleve la muestra a cada zona sensora (zonas con nanoestructura). Cualquier otro tipo de
25 sistema y celda microfluídicos pueden usarse alternativamente, siempre y cuando posibiliten llevar la muestra de fluido a las zonas sensoras del chip (matriz de nanoestructuras).

La celda microfluídica confina la muestra en el entorno de las nanoestructuras (por ejemplo, nanoagujeros) realizados en metal (por ejemplo, oro). Concretamente, la
30 celda debe confinar la muestra en una distancia no superior a un determinado umbral del plano de metal. En un ejemplo de implementación de una realización preferente, en la que se diseña el chip para detectar/contar CTCs, se ha definido ese umbral en

100 μm del plano del metal, que en el ejemplo es oro.

La celda microfluídica puede proporcionar diferentes funcionalidades. Por un lado, cuando el chip no esté previamente biofuncionalizado, tiene la función de activación de la superficie y limpieza de la muestra, y por otro, optimizar la reacción de reconocimiento entre anticuerpos y biomoléculas. A través de la celda se pueden introducir los reactivos para activar la superficie, bloquear la superficie para evitar uniones no específicas, inmovilizar los anticuerpos y lavar la superficie mediante la introducción de un buffer adecuado de limpieza.

Por otro, la misma celda sirve como cámara de reacción (unión biomolécula o ligando con biomarcador), facilitando la introducción de la muestra y controlando el tiempo de reacción para favorecer la reacción de reconocimiento con los anticuerpos en un buffer adecuado de medida.

Otras tareas potenciales de la celda microfluídica son proporcionarlos biomarcadores y reactivos de activación adecuados para funcionalizar la superficie del chip, controlar el paso de la muestra a través de la cámara de reacción asegurando tiempos de paso adecuado para el reconocimiento molecular. La celda debe permitir de forma automática el paso de soluciones de lavado así como la introducción de nuevas biomoléculas (o en general, biomarcadores) con efecto amplificador o buscando una mayor especificidad.

Para que el biosensor pueda determinar la presencia o ausencia de una determinada patología, por ejemplo, metástasis, el biosensor debe detectar los niveles de uno o varios biomarcadores. Por ejemplo, si el biomarcador presente en la muestra son las CTCs, la presencia o ausencia de metástasis viene determinada o bien por el número concreto de CTCs presentes en la muestra o bien por la superación de un determinado umbral de CTCs en la muestra. En cualquiera de los casos, esto se determina correlacionando la respuesta espectral obtenida por el biosensor con una respuesta patrón previamente establecida. En otro ejemplo, si el biomarcador presente en la muestra son miRs, mRNAs, DNAs o proteínas, la presencia o ausencia de patología viene determinada por la concentración del biomarcador en la muestra y, como en el caso anterior, se toma como referencia una respuesta patrón previamente establecida. En cualquiera de los casos, es necesario que la muestra de fluido tenga un volumen mínimo (que puede depender del tipo de biomarcador que se esté buscando), es decir,

es necesario tomar una muestra representativa. En el caso, por ejemplo, de muestras procedentes de enfermos de cáncer, cuando el biomarcador que se va a detectar son las CTCs, es necesario que el volumen de fluido que forma la muestra sea de entre 5 y 10 ml, ya que con menos volumen es difícil detectar células tumorales circulantes en
5 estadios iniciales debido a su baja concentración.

Dado que el dispositivo usa como parte del chip metales nanoestructurados preferentemente con nanoagujeros, al incidir la luz sobre ellos se puede trabajar por transmisión, que es la opción preferente. Esto simplifica el montaje óptico considerablemente, ya que la iluminación y la detección están alineadas con un eje
10 común, pudiendo así realizar un montaje óptico en configuración lineal (tanto horizontal como vertical). Esto proporciona gran versatilidad al dispositivo: menor tamaño (miniaturización del dispositivo), menor dificultad de alineamiento, mayor robustez (sistema portable), etc., frente a los sensores que trabajan por reflexión empleando configuraciones tipo Krestschman o equivalente.

15 La figura 2 ilustra un esquema de una configuración básica del chip 210. El chip 210 está formado por un sustrato 211 fabricado de un material dieléctrico convencional. El sustrato 211 debe ser transparente a la luz, es decir, que no altere la luz cuando ésta lo atraviese. Preferentemente, sobre este sustrato se coloca una capa fina de un metal 212, que contribuye a la adherencia de la capa superior, que es una fina capa de otro
20 metal biocompatible 214 (usualmente pero no limitativamente, oro).

El sustrato 211 es un material dieléctrico (ya sea compuesto químico orgánico o inorgánico (por ejemplo, vidrio o polímero respectivamente) que sirva de soporte para la capa final de metal 212 y tenga un porcentaje suficiente de transparencia a la banda espectral de la fuente de luz excitadora. En general, el sustrato 211 puede ser un
25 material cuya rigidez permita depositar un metal (por ejemplo, oro) y fabricar las nanoestructuras. Ejemplos no limitativos de materiales de los que puede fabricarse el sustrato 211 son: dióxido de silicio, nitruro de silicio, vidrio, cuarzo, fluoruro de magnesio (MgF_2), fluoruro de calcio (CaF_2), seleniuro de zinc ($ZnSe$), germanio u otros.

30 Ejemplos de la capa final de metal 212 para mejorar la adhesión del metal sobre el sustrato son Titanio y Cromo.

La capa de metal que contiene las nanoestructuras 214 es biocompatible y junto con

dichas nanoestructuras da lugar a los efectos ligados a la generación de LSPR al incidir la luz sobre ella. La fabricación de las nanoestructuras se realiza mediante técnicas de nanofabricación convencionales, como pueden ser FIB (*Focus Ion Beam*), EBL (*Electron Beam Lithography*), termal NIL, UV-NIL (*Ultra Violet NIL*).

- 5 Preferentemente se utiliza la técnica *termal NIL*, que es relativamente barata, para fabricar chips desechables. La técnica de fabricación de las nanoestructuras quedan fuera del alcance de la invención.

- Preferentemente, la capa metálica sobre la que se realizan las nanoestructuras 214 es de un metal seleccionado del grupo formado por oro, rodio, paladio, plata, osmio, iridio,
10 platino, titanio, aluminio o cualquiera de sus mezclas. En una realización preferida se utiliza oro o plata y más preferentemente, oro.

La capa final de metal 212 para mejorar la adhesión tiene de espesor entre 1y 20 nm y la capa de metal nanoestructurado 213 entre 20 y 300 nm.

- Las dimensiones de las nanoestructuras pueden tener un diámetro comprendido entre
15 1 nm y 1000 nm. El periodo de las nanoestructuras, en caso de estructuras periódicas, o distancia entre los elementos, puede ser igual, mayor o menor que el doble de la dimensión mayor de las nanoestructuras. Preferentemente es igual o mayor que el doble de la dimensión mayor de las nanoestructuras. La forma de las estructuras puede ser circular, triangular, rectangular, elíptica o, de forma no limitativa, cualquier
20 tipo de estructura poligonal, incluyendo rendijas, elipsoides o formas anisotrópicas. Las dimensiones, forma y demás características de las nanoestructuras, así como el período, se optimizan y fabrican a partir de las necesidades específicas de cada aplicación, dependiendo, entre otros factores, del tipo de células tumorales que se desee contar o, en general, del tipo de biomarcador que sea objeto de detección.

- 25 El chip se limpia para eliminar compuestos orgánicos y óxidos y posteriormente se lava y se biofuncionalizan las nanoestructuras adecuadamente, para poder detectar y aumentar la especificidad de detección hacia el biomarcador de interés, en función del o los biomarcadores que se desee detectar. Es decir, para potenciar que el biomarcador o biomarcadores queden inmovilizados o anclados en la zona sensora o
30 zonas sensoras del chip, éstas se biofuncionalizan con biomoléculas (también llamadas ligandos o reactivos de activación) específicas que reconozcan el biomarcador que se pretenda detectar. Ejemplos de estas biomoléculas son

anticuerpos, proteínas o sondas de DNA (que reconocen el biomarcador en cuestión). Por ejemplo, en el caso de que el biomarcador sean CTCs, el chip se biofuncionaliza con biomoléculas (por ejemplo, anticuerpos) que reconocen las CTCs específicas del tumor (anti-EpCAM, anti-citoqueratinas, entre otros). En otro ejemplo, en el que el biomarcador son ácidos nucleicos (miRs, mRNAs o DNAs), el chip se biofuncionaliza con sondas de ADN complementarias a los ácidos nucleicos específicos del tumor bajo análisis. En el caso de proteínas, la biofuncionalización se realiza con moléculas capaces de interactuar de forma específica con ellas (anticuerpos, ligandos, otras proteínas, aptámeros).

10

Además, en una realización particular, en el caso de que no se pudiese distinguir o no hubiera sensibilidad suficiente para detectar el tipo de célula que se han adherido al sensor, se necesitaría un segundo marcador (nanopartículas biofuncionalizadas) para distinguirlas.

15 El chip se puede biofuncionalizar (esto es, activar) tanto dentro como fuera del dispositivo. Se biofuncionaliza dentro mediante la celda microfluídica. Alternativamente, se puede biofuncionalizar fuera del dispositivo y adquirir o comercializar los chips ya biofuncionalizados para la detección de una enfermedad en concreto. De esta última forma, el usuario final sólo tiene que colocar el chip ya
20 biofuncionalizado en el dispositivo y pasarle muestra.

Los chips con superficie metálica nanoestructurados se fabrican preferentemente mediante la técnica de NIL. Este es un método de alta precisión para la fabricación de micro y nanoestructuras con una gran resolución, sobre grandes áreas (cm), a un bajo coste, comparado con otras tecnologías, y con un alto rendimiento de producción
25 (trasladable a la industria). La capacidad de fabricación de nanoestructuras sobre grandes áreas permite tener una mayor zona sensible a la muestra a monitorizar, así como varias zonas sensibles (varias nanoestructuras), en un mismo chip. Esto último combinado con una celda microfluídica diseñada a medida del chip, dota al biosensor de la capacidad de multiplexado que implica que puede detectar más de un
30 biomarcador simultáneamente por chip.

La figura 3A muestra un esquema de la zona nanoestructurada de un chip de acuerdo con la invención y la figura 3B muestra una imagen SEM (del inglés *Scanning Electronic Microscopy*; Microscopía Electrónica de Barrido) de los nanoagujeros de la

figura 3A. El chip ejemplificado está formado por una capa delgada de oro con aperturas circulares de simetría cuadrada nanofabricadas en metal. El chip del ejemplo tiene una superficie de 20x20 mm y está nanoestructurado con una matriz de nanoagujeros de 150x150 μm , de periodo 350 nm y diámetro 150 nm. Estos valores
5 pueden modificarse si es necesario para optimizar el diseño del chip.

La figura 3C representa un chip 310 con capacidad de multiplexado, que comprende varias nanoestructuras 314 sobre la misma lámina metálica (en este caso, de oro) 313, unido a la celda microfluídica 336. Con este diseño de chip cada nanoestructura se puede biofuncionalizar con diferentes biomoléculas (anticuerpos, o sondas de DNA,
10 etc.) dotando al sistema de capacidad de multiplexado.

El principio de medida se basa en el cambio que sufre el espectro de reflexión/transmisión (intensidad reflejada/transmitida en función de la longitud de onda incidente) de la superficie metálica nanoestructurada con nanoagujeros, cuando cambian las propiedades ópticas del medio que está en contacto con dicha superficie.
15 Usualmente, dicho espectro de reflexión/transmisión presenta máximos o mínimos (dependiendo de la configuración) claramente definidos para ciertas longitudes de onda resonantes. La condición de resonancia para superficies metálicas con nanoagujeros distribuidos periódicamente, es bien conocida. El carácter metálico de la superficie, la consiguiente generación de ondas superficiales en las proximidades de
20 cada nanoagujero y el efecto cooperativo de todos ellos debido a su periodicidad, hace que los cambios de las propiedades ópticas del medio en contacto (usualmente el de su índice refracción, n), produzcan desplazamientos espectrales apreciables, $\Delta\lambda$, de las resonancias mencionadas más arriba y modificaciones en la intensidad de su espectro de transmisión, ΔI , de los que se puede inferir información de esos cambios.
25 Los desplazamientos espectrales (en nm) y/o modificaciones en la intensidad transmitida (en W) debidos a cambios en el índice de refracción, Δn , del medio circundante se suelen cuantificar respectivamente mediante dos parámetros de sensibilidad, $\Delta\lambda/\Delta n$ y $\Delta I/\Delta n$, medidos en nm/RIU y W/RIU respectivamente, donde RIU son las siglas en inglés de Refractive Index Units (Unidades de Índice de Refracción).
30 En el caso que nos ocupa, los cambios en el índice de refracción vienen dados por la presencia o no de biomarcadores en una disolución patrón.

En resumen, si por ejemplo se analiza la luz transmitida (intensidad máxima y posición

espectrales) a través de uno de los chips 210 310 funcionalizado por el que pasa una muestra problema (usualmente sangre) a través de una celda microfluídica 336, se puede obtener una correlación entre la modificación de los parámetros espectrales mencionados de la luz transmitida (respecto de los de la incidente) y las modificaciones de las constantes ópticas de la muestra problema (su índice de refracción) por la potencial presencia de biomarcadores (por ejemplo, CTCs). Esto hace que el sistema actúe como un biosensor altamente sensible y específico. Es decir, el sistema es capaz de detectar la concentración o niveles de biomarcador o biomarcadores presentes en una muestra por ejemplo procedente de un paciente enfermo de cáncer. En el caso específico de que el biomarcador sean CTCs, el sistema es capaz de detectar e identificar el número de CTCs o la cantidad mínima de CTCs que se consideren de interés (umbral tipo pasa / no pasa) presentes en la muestra (fluido). En otros casos, como por ejemplo si el biomarcador es miRs, el sistema es capaz de detectar la concentración de miRs. Es decir, el sistema compara la respuesta espectral del sistema con una muestra problema (células o biomoléculas a detectar en un buffer líquido) sobre el chip con nanoestructuras y biofuncionalizado y expuesto a una radiación óptica, con una referencia (sólo buffer líquido) sobre el chip en las mismas condiciones ópticas (patrón determinado previamente).

La respuesta espectral de referencia se obtiene experimentalmente para cada caso con una muestra del buffer líquido que contiene las células o las biomoléculas a detectar y constituye la calibración del sistema sin muestra o patrón de referencia. Este patrón de referencia es específico para cada biomarcador. Para los biomarcadores para los que puede cuantificarse el número exacto de elementos, como es el caso, por ejemplo, de las CTCs, el patrón de referencia puede incluso referirse a la respuesta espectral de estos elementos individuales (desde 0 hasta un número razonable de unidades a partir del cual se puede afirmar con certeza que existe una patología -por ejemplo, metástasis-). Alternativamente, el patrón de referencia puede usarse como sistema binario, de forma que se considera que repuestas espectrales que queden por encima de un cierto umbral corresponden a la presencia de patología, mientras que repuestas espectrales que queden por debajo de ese umbral se considera que corresponden a ausencia de patología. Para otros biomarcadores para los que no es viable cuantificarse el número exacto de elementos, sino su concentración, como es, por ejemplo, el caso de miRs, el patrón de referencia es de

este último tipo, de forma que una determinada respuesta espectral se asocia a que la concentración o niveles de ese biomarcador ha superado o no un umbral asociado a la presencia de patología. En suma, para saber la concentración de un biomarcador, por ejemplo miRs, la única manera es calibrando el sistema con muestras con concentraciones conocidas. Se preparan buffers, que son los mismos que los buffers de medida, con ciertas concentraciones de estos biomarcadores, se obtiene la señal en el dispositivo y con eso se hace una curva de calibración, que sirve de base para interpretar la señal que se obtiene cuando se pasa la muestra problema.

En el proceso de detección, existe un conjunto de aspectos que es necesario considerar, ya que pueden hacer que el dispositivo proporcione una respuesta con poca precisión o incluso errónea (falsos positivos). Estos aspectos pueden resumirse en los siguientes, aunque puede haber otros: presencia de ruido en la señal detectada, las resonancias que aparecen en los espectros son habitualmente anchas (máximos poco definidos) y los desplazamientos de los máximos debido a la presencia de un nuevo medio son pequeños debido a que los cambios de índice de refracción son pequeños. Estos inconvenientes, junto con la necesidad de alta precisión en la medida, hacen que sea necesario encontrar algún elemento/dispositivo/aditamento de mejora que proporcione una medida más precisa y fiable. La presente invención proporciona una solución basada en buscar alguna modificación que haga posible el estrechamiento de los picos resonantes. De esta forma los máximos del espectro estarán mejor definidos y los desplazamientos de los mismos, frente al cambio de sustancias de diferente índice, podrán ser medidos con mayor precisión. Los inventores han propuesto un diseño del chip en el que está presente un resonador óptico, cavidad resonante o cavidad Fabry-Perot (en ocasiones a lo largo de este texto, referido de forma abreviada como F-P).

Una cavidad resonante está constituida por una lámina plano-paralela con sus dos superficies espejadas (dos espejos) (habitualmente el espejado se realiza depositando materiales metálicos), o dos espejos paralelos altamente reflectantes en el caso de que el medio entre ellos sea aire. Su funcionamiento está basado en el fenómeno interferencial producido por la superposición de las ondas múltiplemente reflejadas entre los espejos al ser iluminado por una de sus caras. Habitualmente se trabaja con la intensidad transmitida por el interferómetro aunque es perfectamente factible trabajar

con la reflejada. Como veremos, una u otra tienen ventajas que se verán en lo sucesivo. Cuando se ilumina la cavidad resonante con un haz policromático, aquellas longitudes de onda que satisfacen la condición de máximo de interferencia, salen a través de la otra cara con una distribución espectral que obedece a la función de Airy.

- 5 Esta función presenta un valor máximo de la intensidad y tiene una cierta anchura que depende del ángulo de incidencia sobre la cara de entrada, del factor de reflexión del espejado de sus caras, del índice de refracción del medio que está colocado entre las mismas y del espaciado entre ellas. Fijado el ángulo de incidencia (normal a la cara de entrada en las configuraciones propuestas), un factor de reflexión mayor, un mayor
- 10 índice de refracción o una mayor distancia entre caras, hacen que la función se estreche y por lo tanto la posición de su máximo se pueda determinar con mayor precisión.

- Teniendo en cuenta las potencialidades que ofrece una configuración de una cavidad resonante, la solución propuesta es utilizar este tipo de geometrías (es decir, una
- 15 cavidad resonante) para salvar los inconvenientes mencionados con anterioridad, referidos a la detección en el microchip descrito. Para poner de manifiesto conjuntamente las potencialidades de la transmisión extraordinaria y las proporcionadas por una cavidad resonante en una realización preferente, una de las
- 20 caras ha sido sustituida por una superficie metálica nanoestructurada con nanoagujeros. Para conseguir la mayor eficiencia (mayor sensibilidad), la cavidad resonante debe diseñarse de tal forma que la longitud de onda de una de sus resonancias coincida con la de una de las resonancias plasmónicas de la superficie metálica con nanoagujeros. Logrando esta sintonía, se consigue aunar los efectos
- 25 cavitarios (estrechamiento de la resonancia) con los de transmisión extraordinaria.

- Las figuras 4A, 4B, 5A y 5B muestran varias posibles configuraciones del chip con una cavidad resonante. Estas implementaciones mejoran la sensibilidad del sistema al unirse el efecto del LSPR al efecto resonador de la cavidad resonante. Cada implementación está diseñada para un sistema de flujo de muestra diferente. Así, la
- 30 implementación de las figuras 4A y 4B está pensada para que el paso de la muestra (fluido que supuestamente porta biomarcadores) sea a través de la cavidad resonante (el flujo circula entre los espejos). La implementación de las figuras 5A, 5B y 5C está pensada para un sistema de flujo de la muestra colocado sobre la superficie del chip

nanoestructurado mediante una celda microfluídica (flujo exterior a la cavidad resonante). Como se ha explicado anteriormente, en la implementación de las figuras 4A y 4B, la celda microfluídica no es imprescindible salvo que el sistema sea multiplexado, en cuyo caso es necesaria (la celda) para llevar la muestra a cada zona sensora. Si, por el contrario, sólo hay una matriz de nanoestructuras, no es estrictamente necesaria la presencia de una celda microfluídica. No obstante, en este último caso se utiliza preferentemente una celda microfluídica para garantizar que toda la muestra pase por la matriz sensora y nada se escape.

La descripción y ejemplos no limitativos de materiales, características geométricas, procesos de fabricación y demás propiedades del sustrato, capa de metal para mejorar adhesión, capa de metal biocompatible y estructuras nanométricas, biofuncionalización, etc. indicados en relación con el chip de la figura 2, aplican a los chips de las figuras 4A, 4B, 5A, 5B y 5C.

Los distintos elementos (fuente de luz, medios ópticos de acondicionamiento, medios de detección y análisis, etc.) descritos en relación con las figuras 1A-1C pueden emplearse también en el biosensor que incluye el chip descrito en las figuras 4A, 4B, 5A, 5B y 5C.

Como en las implementaciones descritas anteriormente, el chip 410 de las realizaciones de las figuras 4A, 4B, 5A, 5B y 5C está biofuncionalizado (por ejemplo, con anticuerpos, con sondas de ADN o con cualquier otro tipo de biofuncionalización, en función del biomarcador que se pretenda detectar). Alternando diferentes áreas de nanoestructuras (arrays) sobre el metal de un mismo chip, se consigue un sistema multiplexado, que permite la detección de varios biomarcadores tumorales, biomoléculas y/o estructuras más complejas (como CTCs, miRs, mRNAs, DNAs, proteínas u otras), de forma simultánea. A modo de ejemplo, cada zona sensora (nanoestructurada) del chip puede biofuncionalizarse con anticuerpos que reconocen las CTCs específicas del tumor (anti-EpCAM, anti-citoqueratinas, u otros) y/o con sondas de ADN complementarias a los miRs específicos del tumor bajo análisis.

Como en la figura 2, el chip 410 de la figura 4A comprende un sustrato 411 y una capa de metal nanoestructurado 414 (preferentemente con nanoagujeros), similares a los descritos en la figura 2. Preferentemente comprende también una capa de metal para mejorar la adhesión 412. Para formar la cavidad resonante el chip 410 comprende

- también, conjuntamente con las nanoestructuras plasmónicas 414 (que hace la función de uno de los espejos), y a una distancia determinada, una capa fina de metal 413 que hace la función del otro espejo, sobre un sustrato 411'. Su adhesión, al igual que en el caso del chip 210, ha sido preferentemente mejorada mediante una capa fina de metal 412'. La cavidad resonante queda formada por las dos láminas delgadas metálicas 414 413, una de ellas nanoestructurada (la 414). En la figura 4B se muestra una variante de la configuración anterior, donde se sustituye el espejo plano (sin nanoestructuras) 413 por otra superficie metálica nanoestructurada 414' (preferentemente con nanoagujeros). La configuración de la figura 4A es equivalente a esta última, dado que la imagen de la superficie nanoestructurada superior proporcionada por la lámina metálica plana, hace las veces de una segunda superficie metálica nanoestructurada. La ventaja de la configuración descrita en la figura 4B es que se pueden diseñar independientemente ambas superficies nanoestructuradas (tamaño de los nanoagujeros y periodo de la red). Sin embargo, presenta el inconveniente de que su alineamiento es más crítico. En la figura 4B, la cavidad resonante queda formada por las dos láminas delgadas metálicas nanoestructuradas 414 414'. Tanto la implementación de la figura 4A como la de la figura 4B pueden considerarse diseños del chip "ad hoc", para que el flujo de la muestra a monitorizar pase a través de la cavidad resonante.
- Las figuras 5A, 5B y 5C muestran otras realizaciones del chip, que suponen alternativas al chip 410 de las figuras 4A y 4B. En este caso la estructura del chip es compacta. Esto hace que la fabricación sea más sencilla, se evita un posicionamiento mecánico de alta precisión, pero a su vez el fluido no pasa por la zona de cavidad resonante y por lo tanto se pierde, al contrario de lo que ocurre con las configuraciones de las figuras 4A y 4B, algo de sensibilidad espectral a los cambios de índice de refracción de la muestra que ocurren en la cavidad resonante. En la figura 5A, el chip 510 está formado por un sustrato 511 sobre el que preferentemente se deposita una capa fina de metal 512 para facilitar la adhesión, sobre el que se deposita a su vez una capa fina de metal a modo de espejo 513. Sobre este metal 513 se deposita un sustrato 518 de un material dieléctrico transparente a la luz (es decir, que no altere la luz cuando ésta lo atraviese) de espesor adecuado que hace de soporte para la deposición de una capa de metal nanoestructurado (preferentemente con nanoagujeros) 514. Preferentemente, se mejora la adhesión de la capa 514 mediante

una capa fina 512' de un metal específico. El sustrato 518 no tiene por qué ser del mismo material que el sustrato 211 411 511 sobre el que se deposita la capa metálica. Ejemplos no limitativos de materiales dieléctricos de los que puede fabricarse el sustrato (polímero) 518 son: óxido de silicio, nitruro de silicio u otros.

- 5 Al igual que en las implementaciones de las figuras 4A y 4B, una variación del chip de la figura 5A es la sustitución de la capa fina de metal 513 que actúa de espejo de la cavidad resonante, por otra capa fina de metal nanoestructurado 514', como se representa en la figura 5B.
- 10 La figura 5C muestra otra realización alternativa, en la que el chip 510 está formado por un sustrato 518 sobre el que preferentemente se deposita, en una de sus superficies, una capa fina de metal 512 para facilitar la adhesión, sobre la que se deposita a su vez una capa fina de metal a modo de espejo 513. Sobre la otra superficie del sustrato 518 se deposita una capa de metal nanoestructurado
- 15 (preferentemente con nanoagujeros) 514. Preferentemente, se mejora la adhesión de la capa 514 mediante una capa fina 512' de un metal específico. Como puede observarse, se trata de una simplificación de la implementación de la figura 5A.

- En las figuras 5A, 5B y 5C el flujo de la muestra circula sobre la lámina de metal
- 20 estructurada 514 exterior de la cavidad resonante. En las figuras 5A y 5C, la cavidad resonante está formada por las dos láminas delgadas metálicas 513 514, una de ellas nanoestructurada (la 514). En la figura 5B, la cavidad resonante está formada por dos láminas delgadas metálicas nanoestructuradas 514' 514.

- 25 Las figuras 6A y 6B muestran cómo el fluido fluye a través de la cavidad resonante creada de acuerdo con las figuras 4A y 4B respectivamente. Se incluye el sistema microfluídico que comprende al menos un canal de entrada 612 y otro de salida 613 del flujo de la muestra 611. En este caso, o bien la propia estructura del chip actúa como celda micrófluidica (flujo a través de la cavidad), o bien se añade una celda
- 30 específica que mejore el monitorizado. Esta opción es especialmente recomendable cuando se trata de un sistema multiplexado.

Del mismo modo, las figuras 7A, 7B y 7C muestran el esquema completo de las

configuraciones de las figuras 5A, 5B y 5C, respectivamente. Se incluye el sistema microfluídico que comprende un canal de entrada 712 y otro de salida 713 del flujo de la muestra 711. En este caso, el fluido fluye mediante una celda microfluídica sobre la superficie del chip nanoestructurado.

5

Las configuraciones tipo F-P de las figuras 4A, 4B, 5A, 5B y 5C permiten obtener un alto factor de calidad, Q , definido como el cociente entre la frecuencia central de una resonancia espectral y su anchura a la media altura, $Q=\omega/\Delta\omega$. Un alto valor de Q para una resonancia significa una mayor definición espectral o mayor monocromaticidad.

10 En nuestro caso, se trata de producir un estrechamiento de las resonancias plasmónicas por acoplamiento con la cavidad resonante.

Si se comparan las implementaciones de las figuras 4A, 4B frente a las de las figuras 5A, 5B y 5C, se concluye que las implementaciones de las figuras 4A, 4B son más
15 sensibles (aprovechan mejor el efecto de la cavidad resonante, ya que la muestra está en contacto con el efecto LSPR y con la cavidad resonante). Además, dado que el flujo pasa por la cavidad resonante, se puede ahorrar la fabricación de la celda microfluídica, como se ha explicado anteriormente. Sin embargo, la fabricación de las implementaciones de las figuras 4A, 4B es más complicada, ya que la separación
20 entre los dos módulos del chip, -el espacio que queda haciendo de cavidad resonante- se hace de forma mecánica, lo cual requiere una alta precisión para asegurar la distancia requerida y se dé la resonancia adecuada. A su vez, las implementaciones de las figuras 5A, 5B y 5C implican una fabricación más sencilla, ya que la cavidad resonante se hace mediante el depósito de una capa de espesor controlado. Sin
25 embargo, estas implementaciones son menos sensibles porque la muestra está en contacto con el efecto LSPR pero no con la resonancia de la cavidad resonante.

Los plasmones de superficie localizados (LSPR) producidos en la capa metálica (más concretamente, en las nanoestructuras metálicas) como consecuencia de la luz que
30 incide sobre el chip están preferiblemente en la franja espectral UV y/o VIS y/o IR. Más preferentemente, están en el rango espectral de 0,6 a 0,8 μ m.

Para el caso preferente de que se desee detectar al menos células tumorales

circulantes (CTCs), éstas se hallan en número muy reducido en la sangre, con una alta presencia de células sanas, y por lo tanto su detección es complicada en fluidos como sangre u orina. Para identificarlas es necesaria la utilización de anticuerpos que reconozcan específicamente las células del tumor, evitando así falsos positivos.

- 5 Ejemplos no limitativos de anticuerpos que pueden utilizarse para aumentar la especificidad son anticuerpos específicos de EpCAM y citoqueratinas específicas de tumor. La inflamación que acompaña al desarrollo del cáncer está mediada principalmente por las citoqueratinas producidas por las células tumorales. Por ejemplo, en relación con algunas enfermedades relacionadas con la presente
- 10 invención, el cáncer colorrectal se caracteriza por un patrón específico de citoqueratinas, con niveles elevados de CK-6, -8 y -20; mientras que el marcador de cáncer de mama más utilizado es CK-19 (tal y como describe Barak et al, 2004). A su vez, la molécula de adhesión celular epitelial EpCAM es una glicoproteína de membrana que se expresa en las células normales epiteliales y que se encuentra
- 15 sobre-expresada en la mayoría de los carcinomas. Por esta razón, puede utilizarse para aumentar la especificidad por las CTCs adheridas a la lámina metálica.

- En el caso de los miRs, es muy importante primero determinar los miRs cuya sobre-expresión indiquen la presencia de un tipo de tumor concreto. Por ejemplo, en relación
- 20 con algunas enfermedades relacionadas con la presente invención, se han descrito varios miRs asociados a cáncer colorrectal, encontrándose miR-92 y -221 elevados en este tipo de cáncer. Los miRs implicados en el cáncer de mama son miR-148b, -376c, -409-3p y -801.

- 25 En el caso de que el biomarcador sea un ácido nucleico (miRs, mRNAs o DNAs) el chip se activa y se biofuncionaliza con sondas de ADN complementarias a los ácidos nucleicos específicos del tumor bajo análisis. En el caso de que el biomarcador sea una proteína, la biofuncionalización se realiza con moléculas capaces de interaccionar de forma específica con ellas (por ejemplo, anticuerpos, ligandos, otras proteínas,
- 30 aptámeros).

A continuación se describen en detalle diversas simulaciones que se han llevado a cabo del biosensor de la invención, partiendo de chips optimizados, de forma que su

geometría es la mejor para que consiga una mayor sensibilidad de detección.

El chip se ha optimizado mediante métodos numéricos que permiten realizar el estudio de la distribución del campo electromagnético generado tanto en las proximidades del dispositivo como lejos de él en comparación con la longitud de onda de la radiación
5 incidente, del orden de los 600nm. Este último caso es el convencional, ya que normalmente el objetivo de microscopio de la detección 138 (figura 1C) está colocado a una distancia del dispositivo mucho mayor que 600nm. El estudio de la distribución de campo electromagnético en las proximidades del dispositivo permite hacer análisis acerca de su sensibilidad. Para todo el estudio numérico, se han usado técnicas para
10 la resolución exacta de problemas electromagnéticos, como FDTD (del inglés *Finite Difference Time Domain*) y paquetes de software comerciales, como COMSOL®. Ambos métodos están basados en algoritmos de resolución de ecuaciones diferenciales por elementos finitos. Para el caso de estudio de la distribución de campo electromagnético en las proximidades del dispositivo, se ha analizado la generación de
15 “hot-spots” (localización espacial de altos valores del campo electromagnético local) y su distribución espacial. Esto resulta de especial importancia dado el bajo número de células tumorales que se prevé estén presentes sobre la superficie sensible (casos reales). Para la situación convencional, se determinó la sección eficaz espectral (dependiente de la longitud de onda de la radiación incidente) de extinción (el
20 dispositivo funciona por transmisión, es decir, se detecta la intensidad de luz transmitida a través del dispositivo y la sección eficaz espectral de extinción es el parámetro que determina esto), se han estudiado las resonancias plasmónicas y su eficiencia a través de su factor de calidad definido por $Q = \omega/\Delta\omega$, donde $\Delta\omega$ es la anchura espectral de la resonancia a frecuencia ω . Para todo el cálculo numérico
25 anterior, se ha tenido en cuenta la configuración del montaje óptico descrito en la figura 1C y que se ha detallado previamente. En este montaje, tanto la iluminación como la colección de la luz transmitida se realizan, respectivamente mediante dos objetivos de microscopio 135 y 138 de aperturas adecuadas. Esto supone que la iluminación del dispositivo se lleva a cabo con un haz de extensión espacial limitada
30 mediante un objetivo de microscopio 135. En las simulaciones numéricas también se ha tenido en cuenta esto mediante el uso de iluminación con haz gaussiano (distribución espacial de campo eléctrico que de forma matemática se puede describir con una función gaussiana) y se ha recolectado la energía electromagnética de la luz

transmitida dentro del ángulo de apertura del objetivo del microscopio colector 138.

El biomarcador elegido para la simulación ha sido CTCs. Las CTCs y el fluido “buffer” que las porta han sido simulados como sigue:

El principio de funcionamiento del biosensor es la modificación de su respuesta
5 espectral cuando el índice de refracción del medio que toca la zona sensora del dispositivo cambia (modificación de una resonancia plasmónica en cuanto a su intensidad, posición y anchura espectrales). Esto ocurre por la presencia de cualquier sustancia biológica inmersa en un buffer de referencia que altera el índice de refracción de este último (CTCs en las pruebas, aunque ocurre igualmente para
10 cualquier material biológico inmerso en un buffer). La modelización del cambio de índice de refracción se ha realizado usando modelos bien conocidos de medios efectivos, basados en teorías consolidadas como la de Maxwell-Garnet. Se ha trabajado con un volumen patrón de buffer ($50000 \mu\text{m}^3$) y células de volumen medio de $1400 \mu\text{m}^3$ (el radio medio de una célula CTC está entre unas 5 y 10 micras y
15 representa en torno al 3% del volumen total analizado) con índices de refracción de 1,33 y 1,4 respectivamente. Los datos ópticos han sido obtenidos de la literatura y son conocidos para un experto en la materia. Así se puede demostrar que la presencia de una de estas células en ese volumen implica una variación de índice del buffer en su tercera cifra decimal. En concreto, se ha estimado que el índice del buffer de
20 referencia de 1,33 pasa a tener un valor efectivo de 1,332. Una célula en el buffer cambia el índice “efectivo” de éste menos que si hay dos células, dos células lo cambian menos que si hay tres células, etc., por lo que a partir de una curva de calibración del dispositivo, se puede estimar el número de CTCs presentes en la muestra. Lo mismo ocurre con los miRs. Si la concentración de estos aumenta (o de
25 un biomarcador en general), mayor variación de índice.

Se ha partido de una configuración base como la mostrada en la figura 2, formada por una lámina de Au de 60 nm de espesor, depositada sobre un sustrato de vidrio 211. En la lámina de Au se crea una estructura periódica de nanoagujeros circulares de 180nm de diámetro y con un período isótropo de 500nm. En estas condiciones, la
30 muestra a analizar (en estado líquido) se pone en contacto con la capa de nanoagujeros 213 de la nanoestructura mediante un sistema microfluídico (como el sistema microfluídico 137 de la figura 1C) y se ilumina mediante un sistema óptico

131-135. El fluido y las CTCs se han modelado de acuerdo al modelo de medio efectivo indicado en el párrafo anterior. La luz transmitida se recoge con otro sistema óptico 136-1310, como se indica en la figura 1C y se analiza su espectro, en concreto uno de los picos de transmisión en torno a 760nm. Estos picos de transmisión, longitud
5 de onda de resonancia, son espectralmente sensibles a las propiedades ópticas de la muestra en contacto con la nanoestructura, en particular, a su índice de refracción. Variaciones de éste producen modificaciones en la estructura espectral del mencionado pico (altura, anchura y posición espectrales). En particular, se define un
10 parámetro de sensibilidad S como el cociente entre la modificación de la posición espectral del pico en nm, $\Delta\lambda$, con respecto a la variación del índice de refracción, Δn , de tal forma que $S = \Delta\lambda / \Delta n$. El comportamiento electromagnético de la configuración base se ha simulado numéricamente mediante software comercial denominado COMSOL® que es capaz de resolver problemas electromagnéticos de este tipo mediante elementos finitos (REF). Con la configuración básica mencionada antes, se
15 consiguen sensibilidades del orden 400nm/RIU. Esto significa que una variación de una unidad en el índice de refracción de la muestra a analizar, produce una variación en la posición del pico de transmisión de 400nm hacia longitudes de onda más largas.

A continuación se analiza una configuración como la mostrada en la figura 5A (figura 7A) (configuración de cavidad resonante F-P), trabajando en reflexión, para una
20 nanoestructura con las características de la configuración base, se obtiene una sensibilidad del orden de 200nm/RIU. Esta disminución no implica que la configuración sea menos sensible, porque se puede aumentar modificando adecuadamente el período y/o el diámetro de los nanoagujeros. Por ejemplo, modificando el periodo a 600nm, la sensibilidad crece a 700nm/RIU). Con esta configuración se obtienen dos
25 ventajas importantes. La primera es que se analizan mínimos de reflexión casi nulos, en vez de máximos de transmisión como en la configuración base. Es bien conocido en Óptica que, en una distribución espacial de energía conseguida mediante un dispositivo interferencial, el factor de visibilidad aumenta a medida que el valor de los mínimos interferenciales tienda a cero. La segunda ventaja es que la anchura
30 espectral de los mínimos de reflexión en la configuración de espejo es sensiblemente más pequeña que la de los máximos de transmisión en la configuración base, esto es, aumenta el factor de calidad Q .

Por tanto, las configuraciones tipo cavidad resonante de las figuras 4A y 5A permiten

obtener un mayor, Q . Un alto valor de Q para resonancia significa una mayor definición espectral o mayor monocromaticidad. Esto es consecuencia del estrechamiento de las frecuencias de resonancia de los plasmones en su acoplamiento con la cavidad. En concreto, para los datos de la nanoestructura base, la anchura se reduce a la mitad, duplicando el factor de calidad Q .

- Seguidamente se ha mantenido la configuración de cavidad resonante F-P pero se ha hecho que la muestra pase por dentro de la cavidad, como en la figura 4A (figura 6A). En este caso, la sensibilidad aumenta considerablemente, dado que a la sensibilidad de la nanoestructura a cambios del índice de refracción de la muestra se añade la de las resonancias de la cavidad que también se ven afectadas por esos cambios. Esto es debido a que ahora la muestra forma parte del medio intracavitario. Esto no ocurría en la configuración analizada anteriormente (figura 5A). Sin embargo, además de las ventajas ya reseñadas anteriormente, presenta las de su facilidad de fabricación y montaje estable en un dispositivo de uso por parte de personal no especializado.
- Conclusiones similares a las descritas con anterioridad pueden obtenerse con variantes de las configuraciones previas como las mostradas en las figuras 4B y 5B (figuras 6B y 7Bb). Éstas representan una configuración equivalente de una superficie nanoestructurada enfrentada a un espejo (objeto y su imagen a través del espejo plano 413 o 513). Las configuraciones de las figuras 4B y 5B presentan la ventaja de poder cambiar los parámetros de las dos nanoestructuras independientemente, con la consiguiente ventaja de optimización del dispositivo en cuanto a la sensibilidad que presenta.

- Aunque hemos procedido a utilizar la teoría de medio efectivo (ya que esa teoría es de aplicación más general para cualquier tipo de medio biológico a analizar) con el fin de valorar la sensibilidad del dispositivo en nanómetros/RIU, para el caso de CTCs, se ha procedido a realizar una serie de cálculos donde específicamente se ha simulado la presencia física de una o más CTCs. Cada una de éstas se ha modelado como un paralelepípedo de dimensiones adecuadas para representar una CTC deformada y pegada a la superficie nanoestructurada y con un volumen equivalente al 3% del volumen del buffer líquido. Un esquema de la situación experimental analizada se muestra en la Fig. 18 (configuración básica), donde se aprecia el sustrato 1811, la capa metálica nanoestructurada 1814 (con aire 1816 entre las nanoestructuras) y sobre ella una CTC (paralelepípedo) 1817 de índice de refracción 1,4, inmersa en el

líquido buffer 1819 de índice 1,33. La simulación muestra que la presencia de la célula en el buffer produce un desplazamiento del pico de transmisión equivalente a una modificación del índice de refracción de 1,33 a 1,332, como se ha estimado previamente. Esta configuración nos ha permitido también analizar el efecto de la proximidad de la célula a la superficie nanoestructurada, mostrando la mayor sensibilidad cuando la célula está completamente pegada y disminuyendo a medida que se separa de aquélla. Finalmente, se ha comprobado que la presencia de dos o más células produce desplazamientos que siguen un comportamiento lineal con el número de células (Fig. 19) y que se puede calibrar en nm/RIU con las simulaciones que se muestran más abajo.

Basándonos en la teoría de medio efectivo, a continuación se describen en detalle algunas de las simulaciones realizadas, así como sus resultados.

EJEMPLO 1: Configuración básica

En primer lugar se ha simulado una configuración mínima formada por periodos (chip básico para la simulación) de la geometría inicialmente estudiada correspondiente a una estructura de nanoagujeros distribuidos periódicamente de forma bidimensional con periodos iguales en las dos direcciones. Se han perforado nanoagujeros de radio 90 nm en una lámina delgada de oro de espesor 60 nm. Dicha capa metálica está depositada sobre un sustrato dieléctrico de vidrio de índice de refracción 1,50. Por encima de la lámina de nanoagujeros se encuentra depositado el líquido problema correspondiente a la muestra a analizar cuyo índice de refracción puede variar desde 1,33 (buffer sin material biológico) hasta 1,34 (buffer con material biológico en distintas cantidades) con pasos de 0,002.

Como se muestra en la figura 8, la estructura se ha iluminado con una onda plana polarizada a lo largo del eje X, la cual se propaga en la dirección -Z. Esto significa que la luz lo primero que se encuentra es la zona de la muestra a su paso por el dispositivo simulado.

Haciendo uso del software comercial COMSOL se ha estudiado el espectro de transmisión para longitudes de onda comprendidas entre 400-800 nm (figura 9). Fundamentalmente, nos fijamos en la parte del espectro cuyas longitudes de onda son mayores que el periodo de la red. En este caso, 500 nm. Así mismo se ha estudiado el

campo cercano para las longitudes de onda en las que aparecen las resonancias. Un ejemplo se muestra en la figura 10 para la resonancia de 760 nm mostrada en la figura 9.

5 Como se ha comentado antes y siguiendo con los modelos de medios efectivos, se ha ido modificando el índice de refracción del medio a monitorizar encima de la lámina metálica. Esto simula la presencia de CTCs o la concentración de otros elementos biológicos, como los miRs. Determinando la posición espectral de la resonancia de 760 nm (ver figura 9) en función del índice de refracción del medio a monitorizar, se ha conseguido la sensibilidad del dispositivo descrito (figura 11): 390,71 nm/R.I.U.

10 EJEMPLO 2: Configuración cavidad resonante F-P, espectro de reflexión

A continuación se ha estudiado y simulado una nueva geometría en la que se incorpora una gruesa capa de oro debajo del sustrato de vidrio con el fin de obtener resonancias tipo F-P entre la capa nanoestructurada y la superficie de la capa de oro, que son las que forman la cavidad resonante. Se fijó el espesor del vidrio en 380 nm
15 para conseguir una resonancia de la cavidad. Con esta configuración, el dispositivo funciona por reflexión. La muestra se sitúa exteriormente a la cavidad resonante en contacto con la matriz de nanoagujeros. De esta forma podemos comprobar cómo cambia el espectro y como consecuencia, la sensibilidad con respecto a la configuración anterior al introducir el efecto de cavidad resonante.

20 En la figura 12 se muestra un ejemplo del espectro de reflexión de la configuración simulada. Es de destacar que al trabajar por reflexión las resonancias se muestran en forma de mínimos en lugar de máximos. Nos centraremos en la resonancia que se encuentra a la longitud de onda próxima a los 760 nm, como se puede observar en la figura 13, que muestra la variación del espectro de reflexión con el cambio en el índice
25 de refracción de la muestra.

A través de la posición espectral de los mínimos para diferentes índices de refracción de la muestra, se ha estudiado la sensibilidad para la configuración con cavidad resonante, como se puede ver en la representación de la figura 14 (198,57 nm/R.I.U.).

EJEMPLO 3: Configuración cavidad resonante F-P espectro de transmisión

- Siguiendo la línea de investigación anterior, obtener resonancias cavitarias, se decidió estudiar y simular una nueva configuración. En ella, se ha reducido el espesor de la capa gruesa de oro (mayor de 100 nm, ópticamente opaca a la luz, por lo que casi la totalidad de la luz se refleja) descrita en la configuración con cavidad resonante
- 5 anterior a 20 nm con el fin de que sea ópticamente delgada y la luz, en el rango de frecuencias en el que estamos trabajando, sea capaz de atravesarla. De esta manera es posible obtener resultados a partir del espectro de transmisión. A diferencia de los casos anteriores, la muestra no se encuentra situada sobre la matriz de nanoagujeros sino en la cavidad creada por ambos “espejos”, constituidos por la lámina
- 10 nanoestructurada y la no nanoestructurada. De esta forma las resonancias cavitarias que se produzcan serán sensibles a la variación en el índice de refracción de la muestra bajo estudio. Encima de la matriz de nanoagujeros se pone un material dieléctrico, vidrio, para conseguir que no haya pérdidas óhmicas y no se produzca absorción.
- 15 En la figura 15 se ha representado el espectro de transmisión para la estructura simulada y para un índice de refracción del líquido correspondiente a 1,33. En concreto, como se puede ver en la figura 16, el estudio se ha centrado en analizar la resonancia situada a aproximadamente 600 nm, ya que es la que proporciona valores más altos en transmisión.
- 20 Mediante el estudio de la variación del máximo espectral de la resonancia en 600 nm con el índice de refracción de la muestra, se ha llevado a cabo una representación gráfica, ilustrada en la figura 17, pues a través de su pendiente se obtiene la sensibilidad del dispositivo descrito y simulado. De esta manera, se ha obtenido una sensibilidad de 489,72 nm/R.I.U.
- 25 En este texto, la palabra “comprende” y sus variantes (como “comprendiendo”, etc.) no deben interpretarse de forma excluyente, es decir, no excluyen la posibilidad de que lo descrito incluya otros elementos, pasos, etc.
- Por otra parte, la invención no está limitada a las realizaciones concretas que se han descrito sino abarca también, por ejemplo, las variantes que pueden ser realizadas por
- 30 el experto medio en la materia (por ejemplo, en cuanto a la elección de materiales, dimensiones, componentes, configuración, etc.), dentro de lo que se desprende de las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un biosensor para detectar la concentración o cantidad de al menos un biomarcador presente en una muestra de un fluido, caracterizado por que comprende:
- 5 un chip (410, 510) que comprende: un sustrato (411, 518) sobre el que se ha depositado una capa de metal sobre la que se implementado al menos una nanoestructura (414, 514), donde dicha al menos una nanoestructura (414, 514) está diseñada para producir resonancia de plasmones de superficie localizados (LSPR) cuando es sometida a una radiación óptica de un determinado rango espectral; y una
- 10 cavidad resonante delimitada por dos superficies que actúan como espejo en dicho determinado rango espectral, donde una de las dos superficies que delimitan la cavidad resonante es dicha capa de metal con al menos una nanoestructura (414, 514), donde dicha capa de metal con al menos una nanoestructura (414, 514) está biofuncionalizada con al menos una biomolécula que reconoce dicho al menos un
- 15 biomarcador,
- estando el biosensor configurado para, al exponer dicho chip (410, 510) a radiación óptica en dicho rango espectral cuando dicha muestra está en contacto con el chip, medir la concentración o cantidad de dicho al menos un biomarcador presente en la muestra, mediante la comparación de la respuesta espectral de la luz a la salida del
- 20 chip (410, 510) con un patrón espectral previamente determinado, donde dicha respuesta espectral responde al efecto combinado de la resonancia de plasmones de superficie localizados(LSPR) en dicha al menos una nanoestructura plasmónica (414, 514) y de la resonancia de la cavidad resonante.
- 25 2. El biosensor de la reivindicación 1, donde dicho chip (410) comprende un segundo sustrato (411') sobre el que se ha depositado una capa de metal (413, 414') que consituye la segunda superficie que delimita dicha cavidad resonante, estando el biosensor configurado para que, en uso, el flujo de la muestra pase a través de la cavidad resonante (611).
- 30 3. El biosensor de la reivindicación 2, donde sobre dicha capa de metal depositada sobre el segundo sustrato (411') se ha implementado al menos una nanoestructura (414'), donde dicha nanoestructura (414') está diseñada para producir resonancia de

plasmones de superficie localizados (LSPR) cuando es sometida a una radiación óptica de un determinado rango espectral.

4. El biosensor de la reivindicación 1, donde dicho chip (510) comprende, sobre la otra
5 superficie de dicho sustrato (518), una segunda capa de metal (513) que constituye la segunda superficie que delimita dicha cavidad resonante, estando el biosensor configurado para que, en uso, el flujo de la muestra pasa sobre la capa de metal sobre la que se ha implementado al menos una nanoestructura (514) y que actúa como primera superficie que delimita la cavidad resonante.
- 10 5. El biosensor de la reivindicación 1, donde dicho chip (510) comprende un segundo sustrato (511) sobre el que se ha depositado una capa de metal (513, 514') que constituye la segunda superficie que delimita dicha cavidad resonante, estando el biosensor configurado para que, en uso, el flujo de la muestra pasa sobre la capa de
15 metal sobre la que se ha implementado al menos una nanoestructura (514) y que actúa como primera superficie que delimita la cavidad resonante.
6. El biosensor de la reivindicación 5, donde sobre dicha capa de metal depositada sobre el segundo sustrato (511) se ha implementado al menos una nanoestructura
20 (514'), donde dicha nanoestructura (514') está diseñada para producir resonancia de plasmones de superficie localizados (LSPR) cuando es sometida a una radiación óptica de un determinado rango espectral.
7. El biosensor de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende, sobre
25 dicho sustrato (411, 411', 518, 511), una capa de metal (412, 412', 512, 512') para facilitar la adhesión de la capa de metal (414, 414', 413, 512', 512) que delimita la cavidad resonante.
8. El biosensor de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha al menos
30 una nanoestructura es un nanoagujero.
9. El biosensor de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho chip (410, 510) comprende una pluralidad de arrays de nanoestructuras diferentes, quedando el

biosensor configurado para medir la concentración o cantidad de diferentes biomarcadores simultáneamente.

10. El biosensor de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde una dimensión
5 de dicha al menos una nanoestructura es menor que la longitud de onda de la luz a la que se expone el chip (410, 510).

11. El biosensor de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende
10 además una celda microfluídica para inmovilizar los biomarcadores sobre la superficie del chip.

12. El biosensor de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho al menos un biomarcador son células tumorales circulantes (CTCs).

13. Un kit de diagnóstico para analizar una muestra de un fluido para determinar la
15 concentración y/o cantidad de al menos un biomarcador de una enfermedad, caracterizado por que comprende un biosensor de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

14. Uso del biosensor de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para diagnosticar la
20 presencia y/o evolución de metástasis.

15. Un método para detectar la cantidad y/o concentración de al menos un biomarcador presente en una muestra de un fluido, donde dicha cantidad y/o
25 concentración de al menos un biomarcador es indicativa de la presencia o ausencia de una enfermedad o de la evolución de una enfermedad, caracterizado por las etapas de:

hacer fluir (612, 712) una muestra de un fluido por un chip (410, 510) que comprende al menos un sustrato (411, 518) sobre el que se ha depositado una capa de metal sobre la que se ha implementado al menos una nanoestructura (414, 514), y una
30 cavidad resonante delimitada por dos superficies que actúan como espejo en un determinado rango espectral, donde una de las dos superficies que delimitan la cavidad resonante es dicha capa de metal con al menos una nanoestructura (414,

514);

someter dicho chip (410, 510) a una radiación óptica en dicho determinado rango espectral, donde dicha radiación óptica produce resonancia de plasmones de superficie localizados (LSPR) en dicha al menos una nanoestructura (414, 514) y

5 resonancia en dicha cavidad resonante;

determinar la concentración de dicho al menos un biomarcador presente en la muestra, mediante la comparación de la respuesta espectral de la luz a la salida del chip (410, 510) con un patrón espectral previamente determinado, donde dicha respuesta espectral responde al efecto combinado de la resonancia de plasmones de

10 superficie localizados en dicha al menos una nanoestructura plasmónica (414, 514) y de la resonancia de la cavidad resonante.

16. El método de la reivindicación 15, donde dicha etapa de hacer fluir (612) una muestra de un fluido por un chip (414) comprende hacer pasar el flujo de dicha

15 muestra a través de la cavidad resonante (611).

17. El método de la reivindicación 15, donde dicha etapa de hacer fluir (712) una muestra de un fluido por un chip (514) comprende hacer pasar el flujo de dicha muestra sobre la capa de metal sobre la que se ha implementado al menos una

20 nanoestructura (514) y que actúa como primera superficie que delimita la cavidad resonante.

18. Un método para diagnosticar la presencia y/o evolución de metástasis que comprende aplicar el método para detectar la cantidad y/o concentración de al menos un biomarcador presente en una muestra de un fluido de acuerdo con cualquiera de

25 las reivindicaciones 15 a 17.

1/16

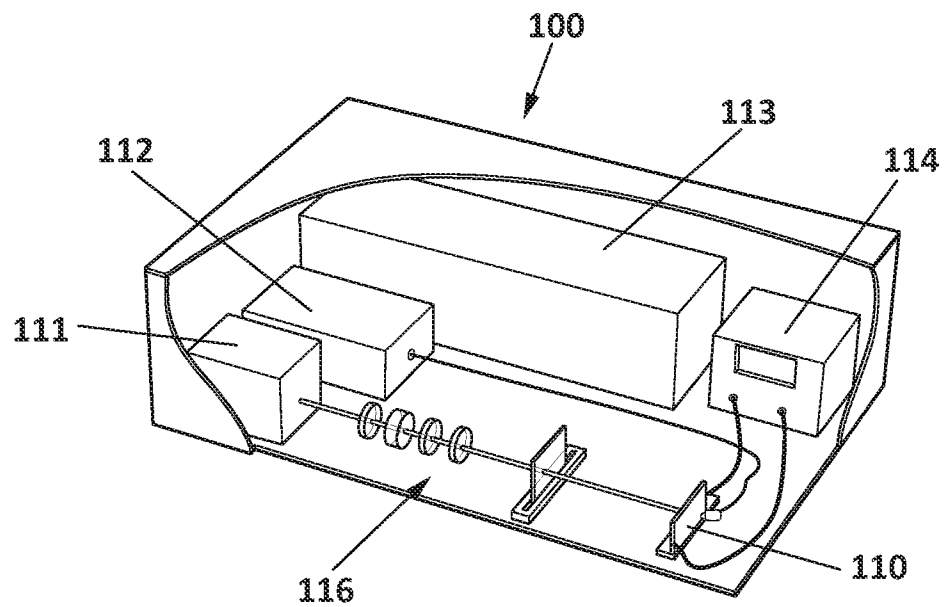


FIG. 1A

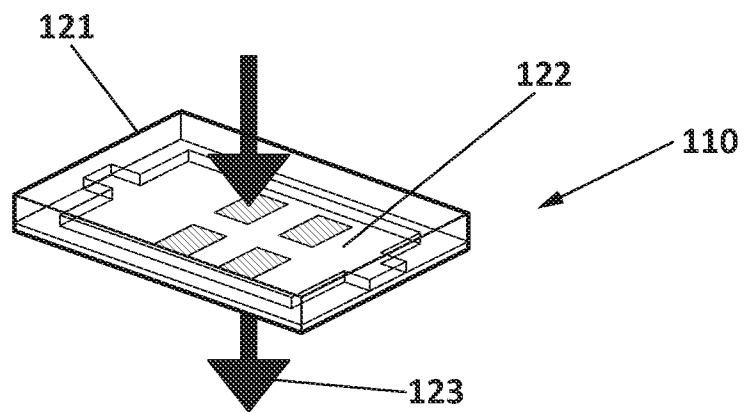


FIG. 1B

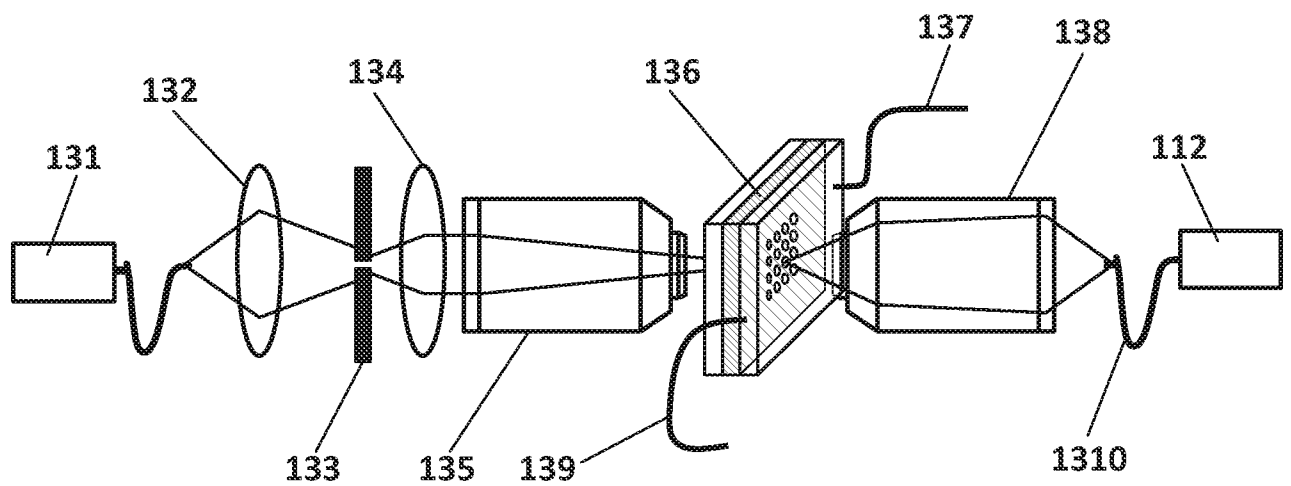


FIG. 1C

2/16

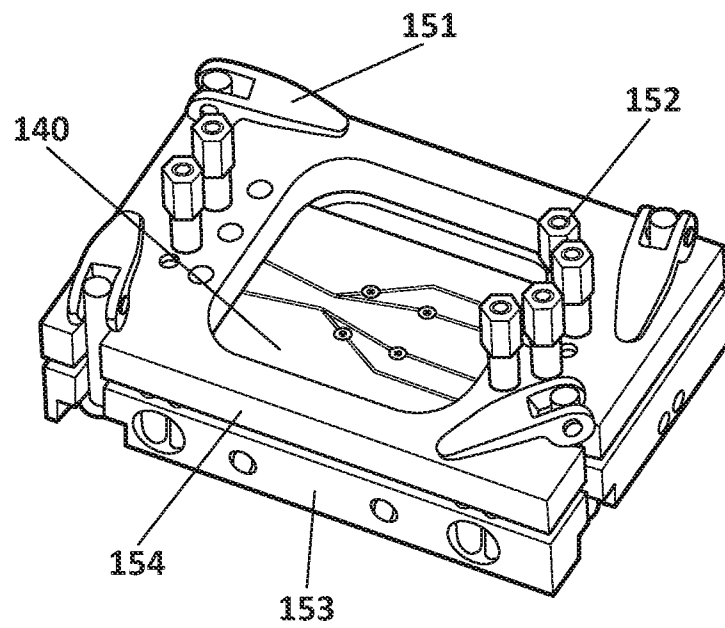


FIG. 1D

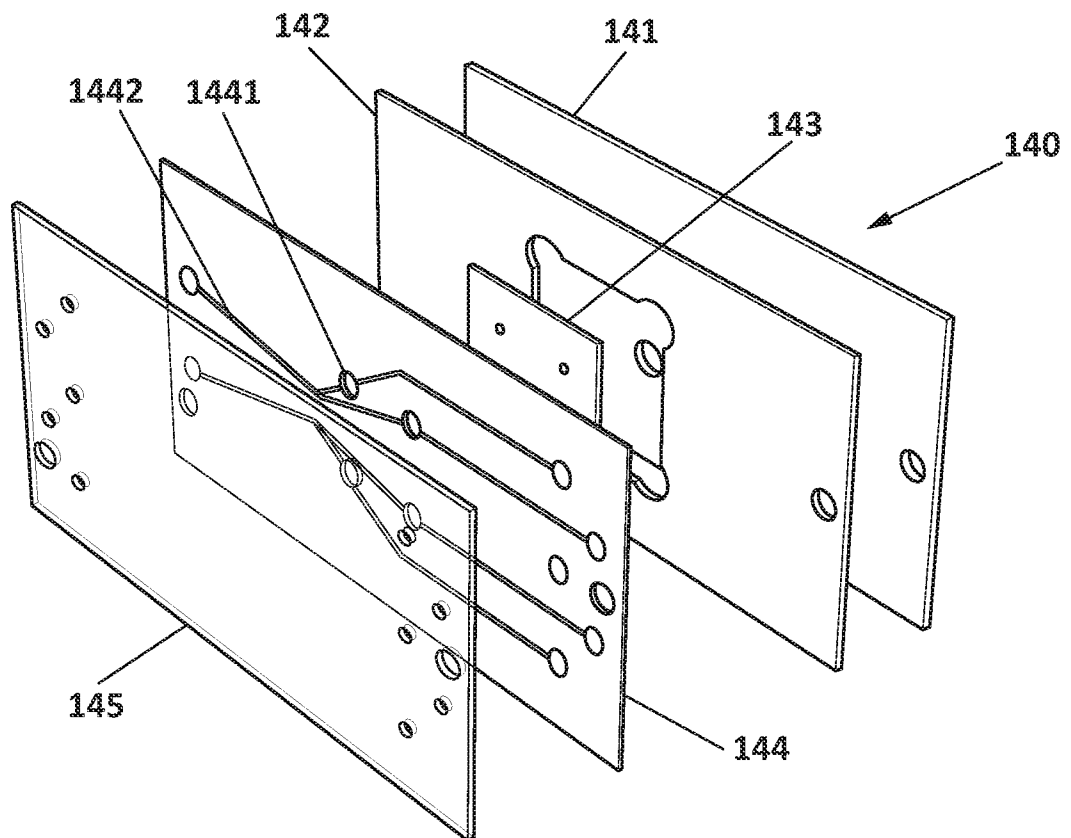


FIG. 1E

3/16

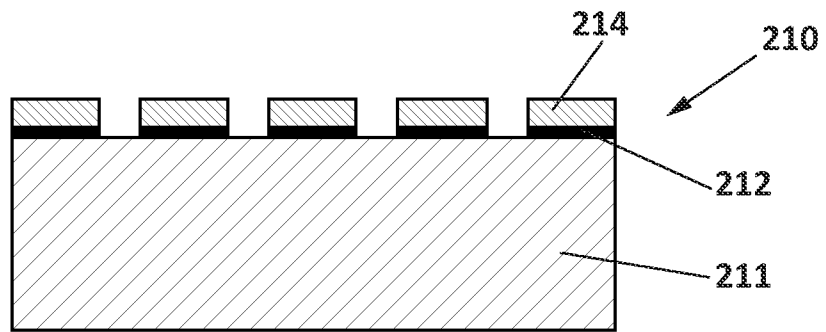


FIG. 2

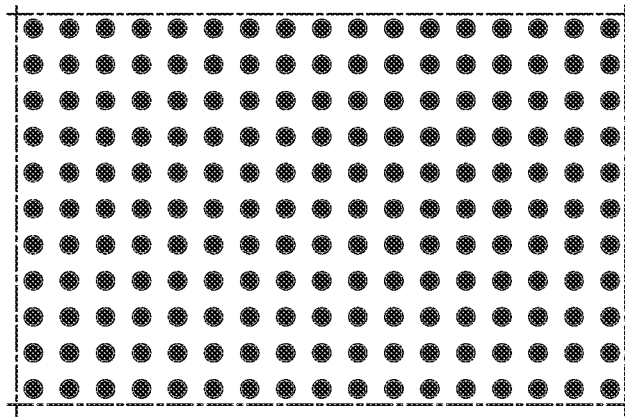


FIG. 3A

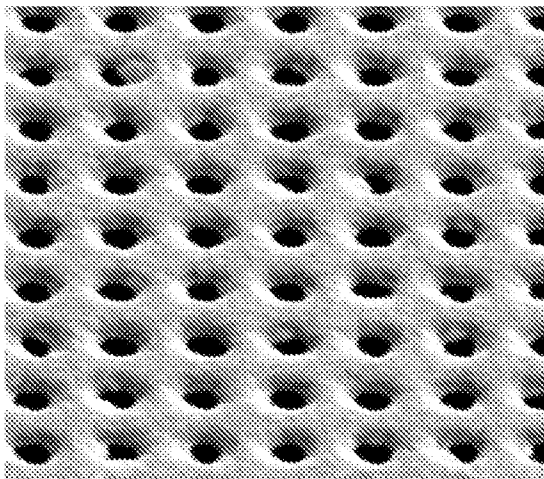


FIG. 3B

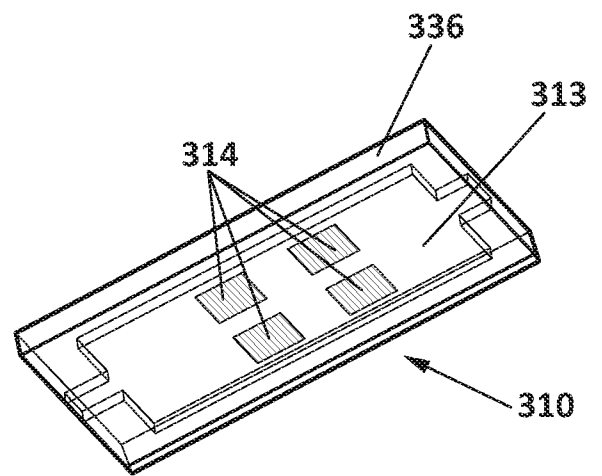


FIG. 3C

4/16

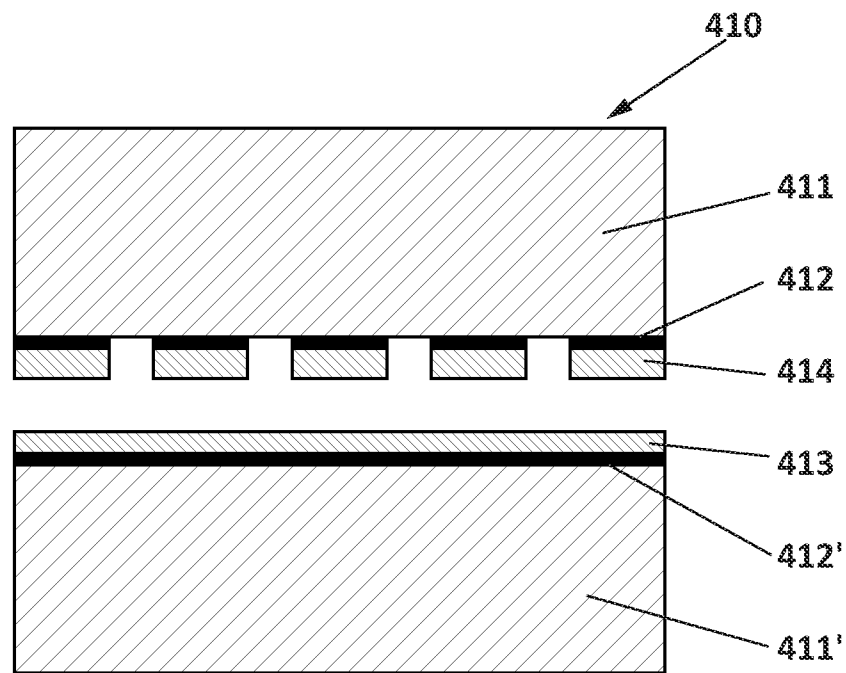


FIG. 4A

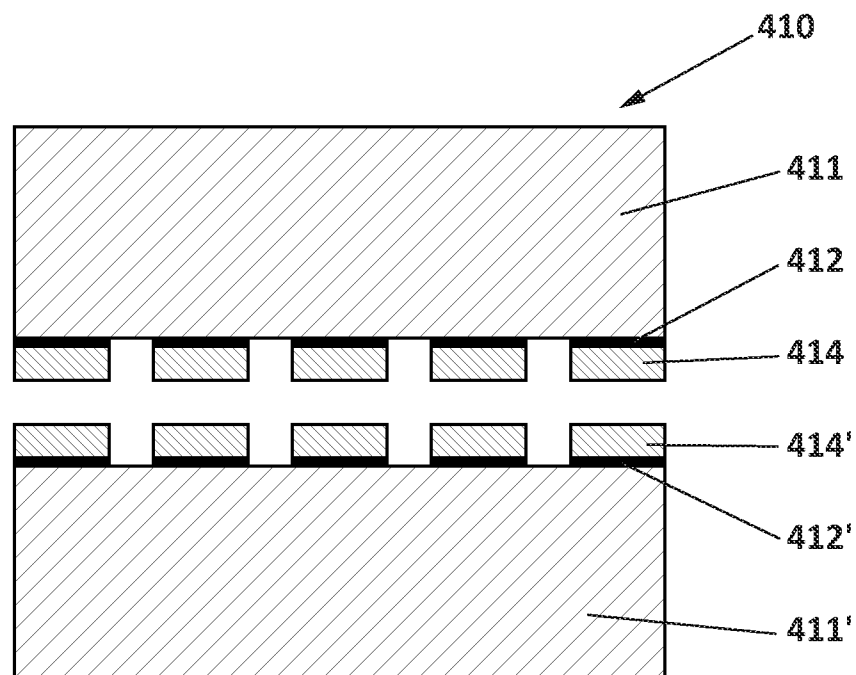


FIG. 4B

5/16

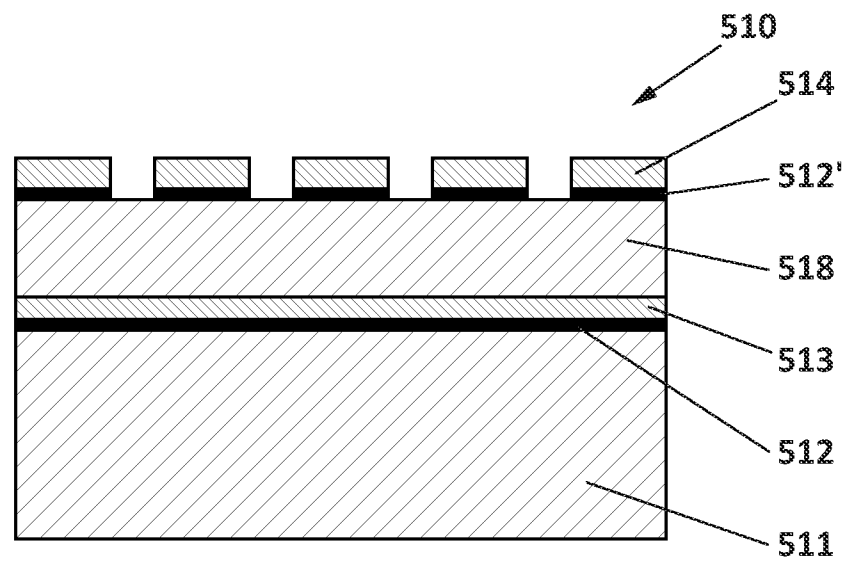


FIG. 5A

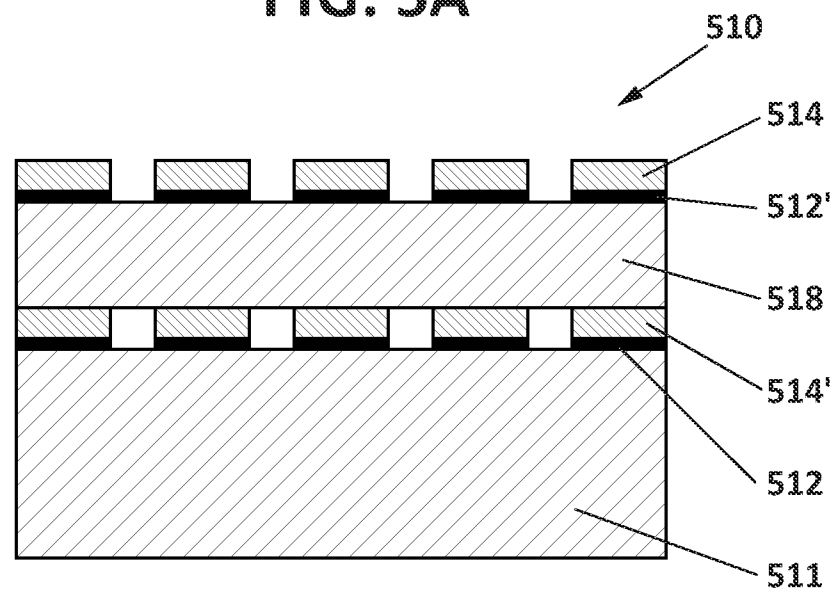


FIG. 5B

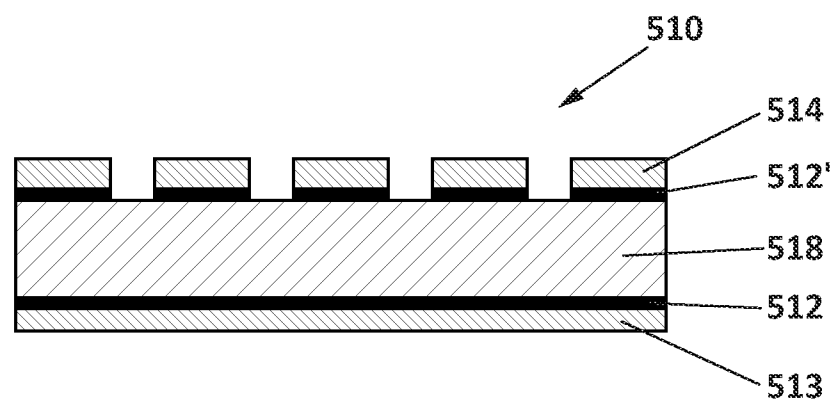


FIG. 5C

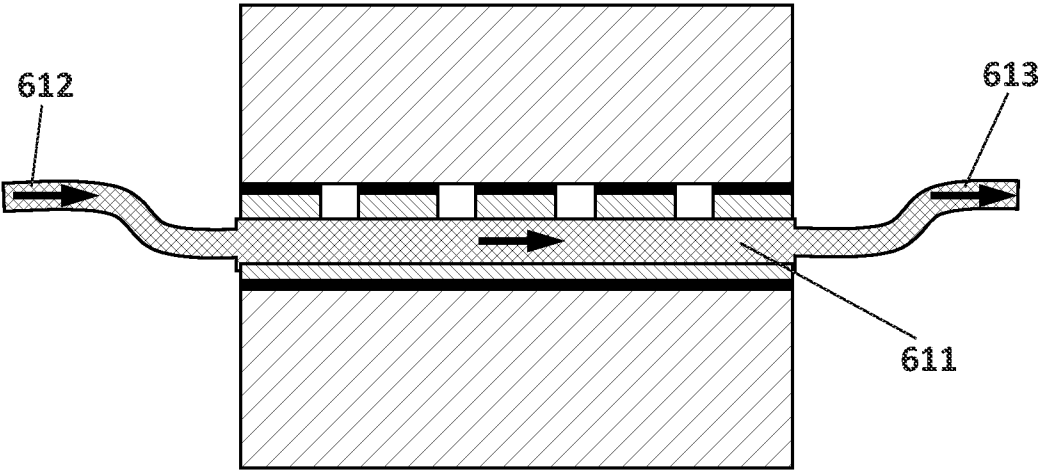


FIG. 6A

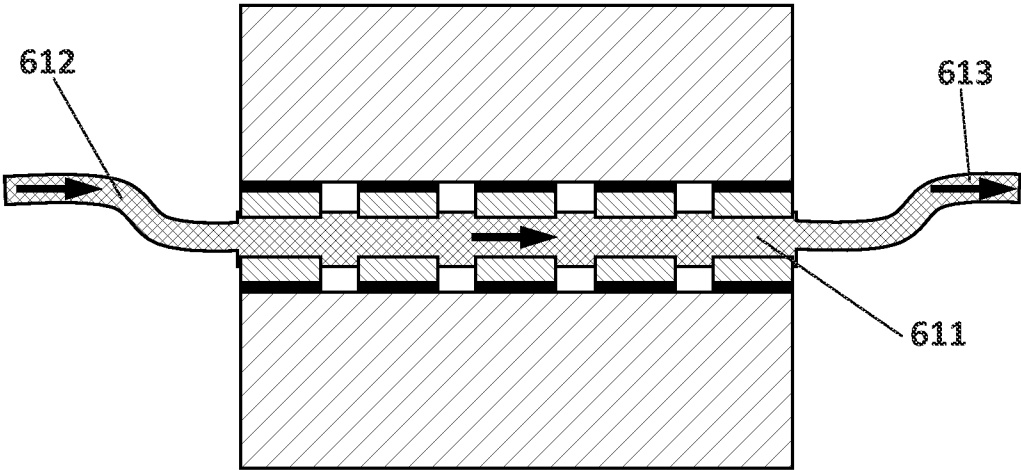


FIG. 6B

7/16

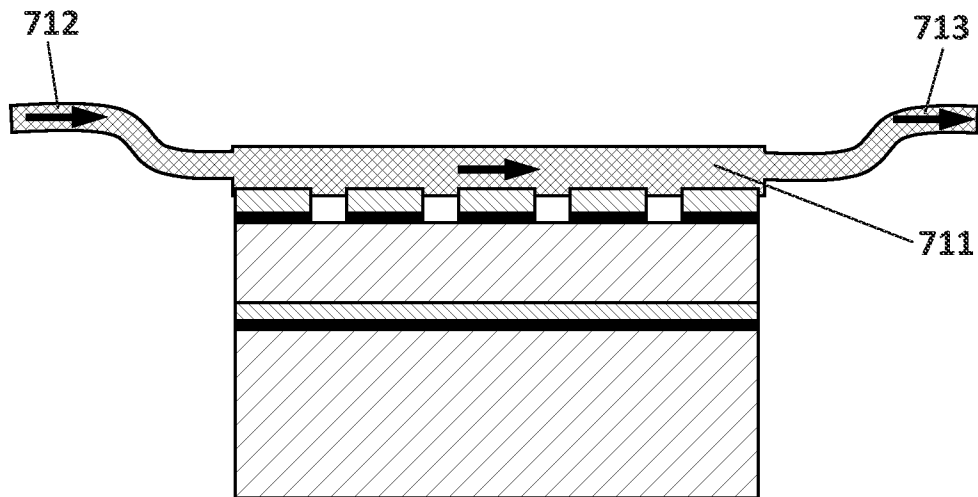


FIG. 7A

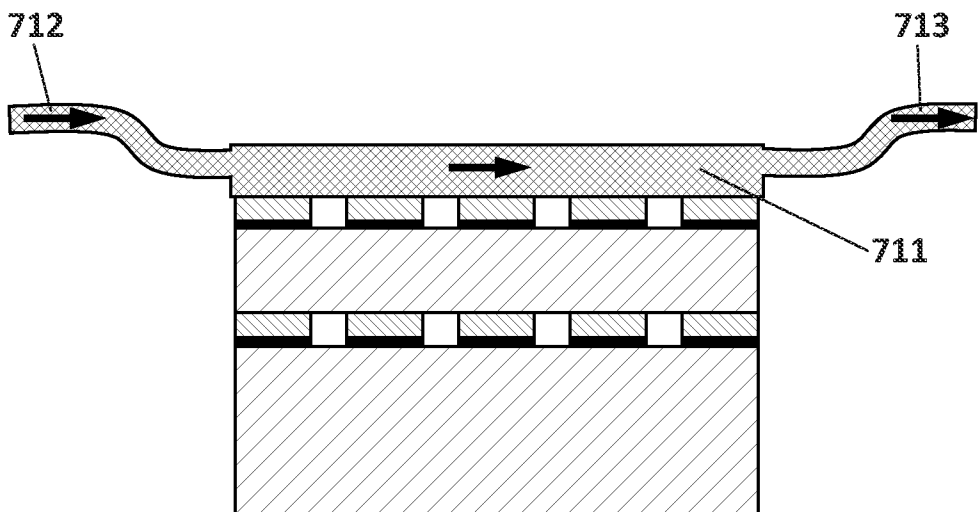


FIG. 7B

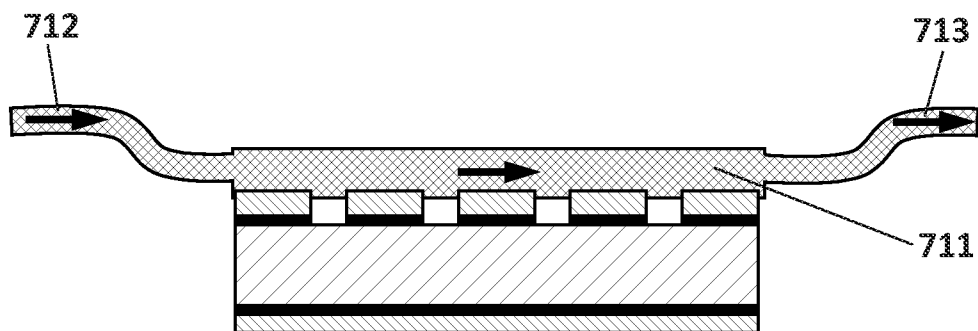
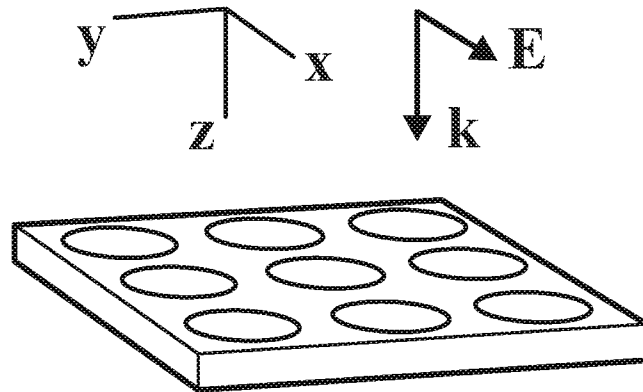
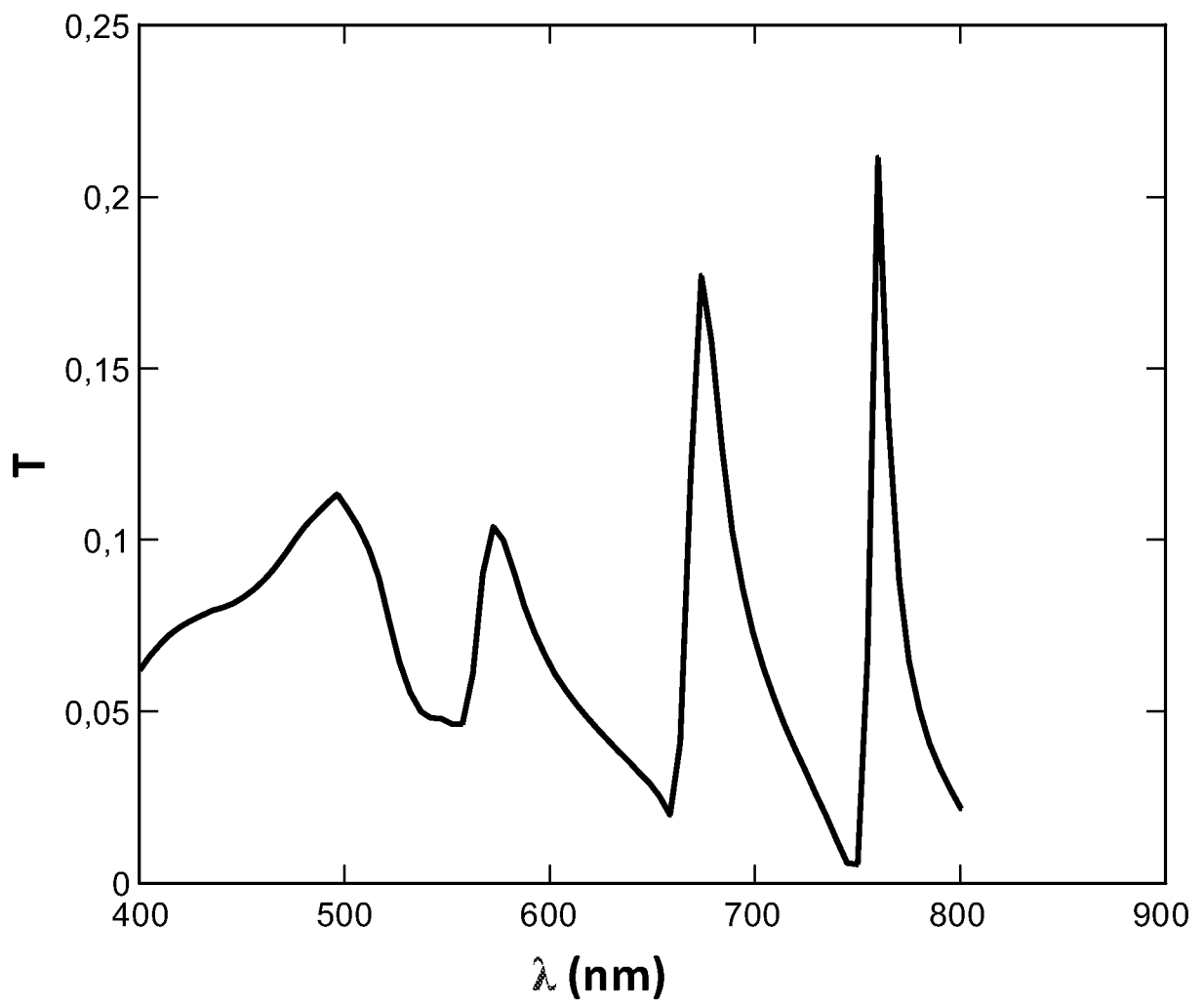
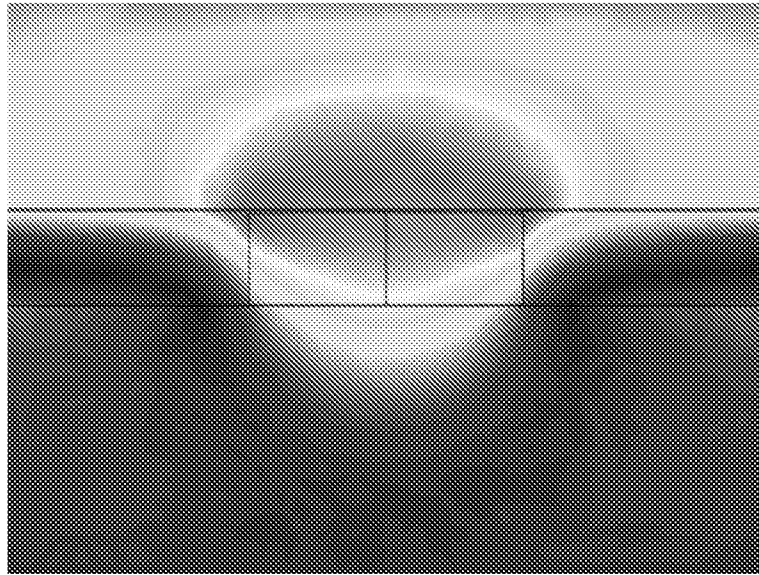
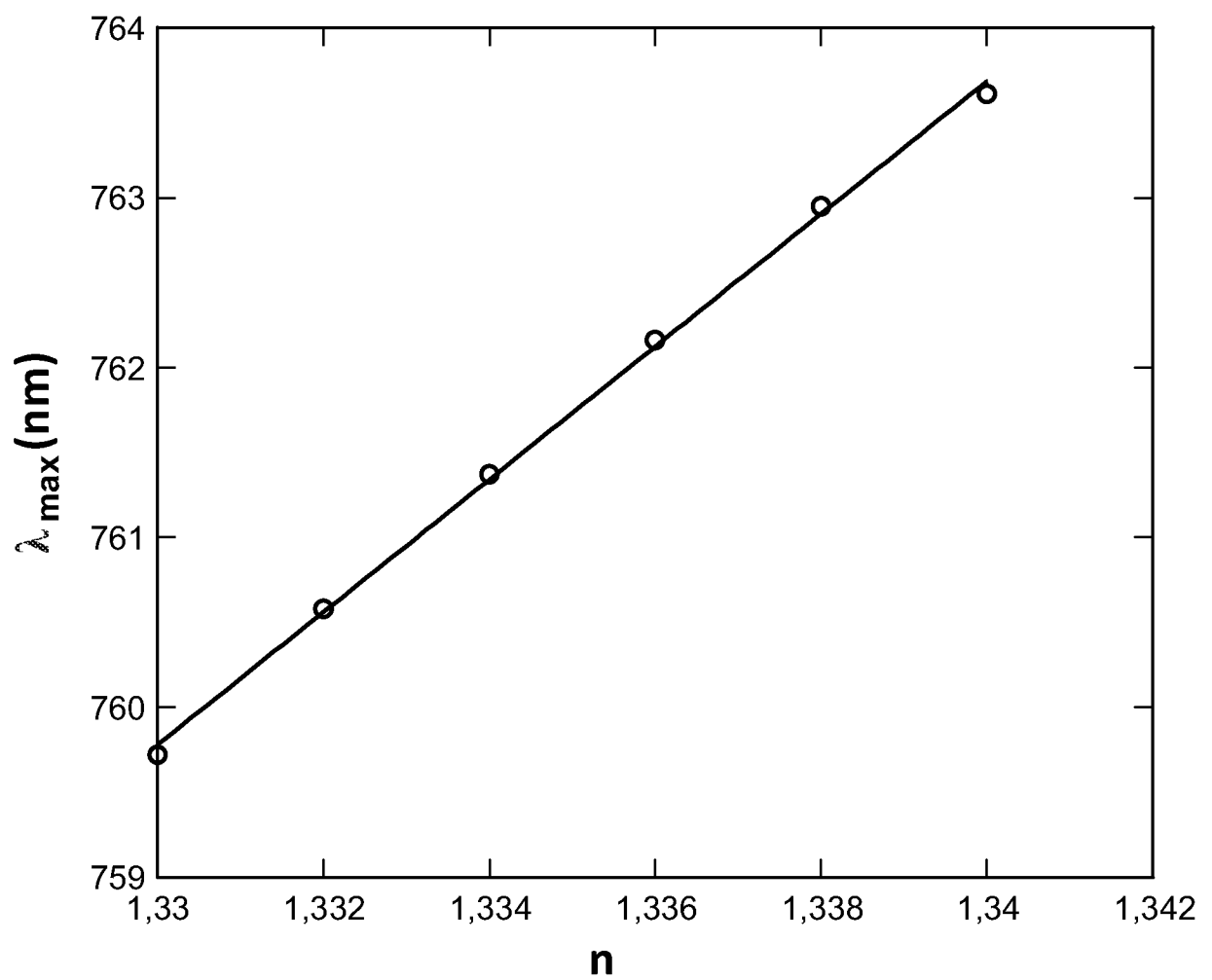


FIG. 7C

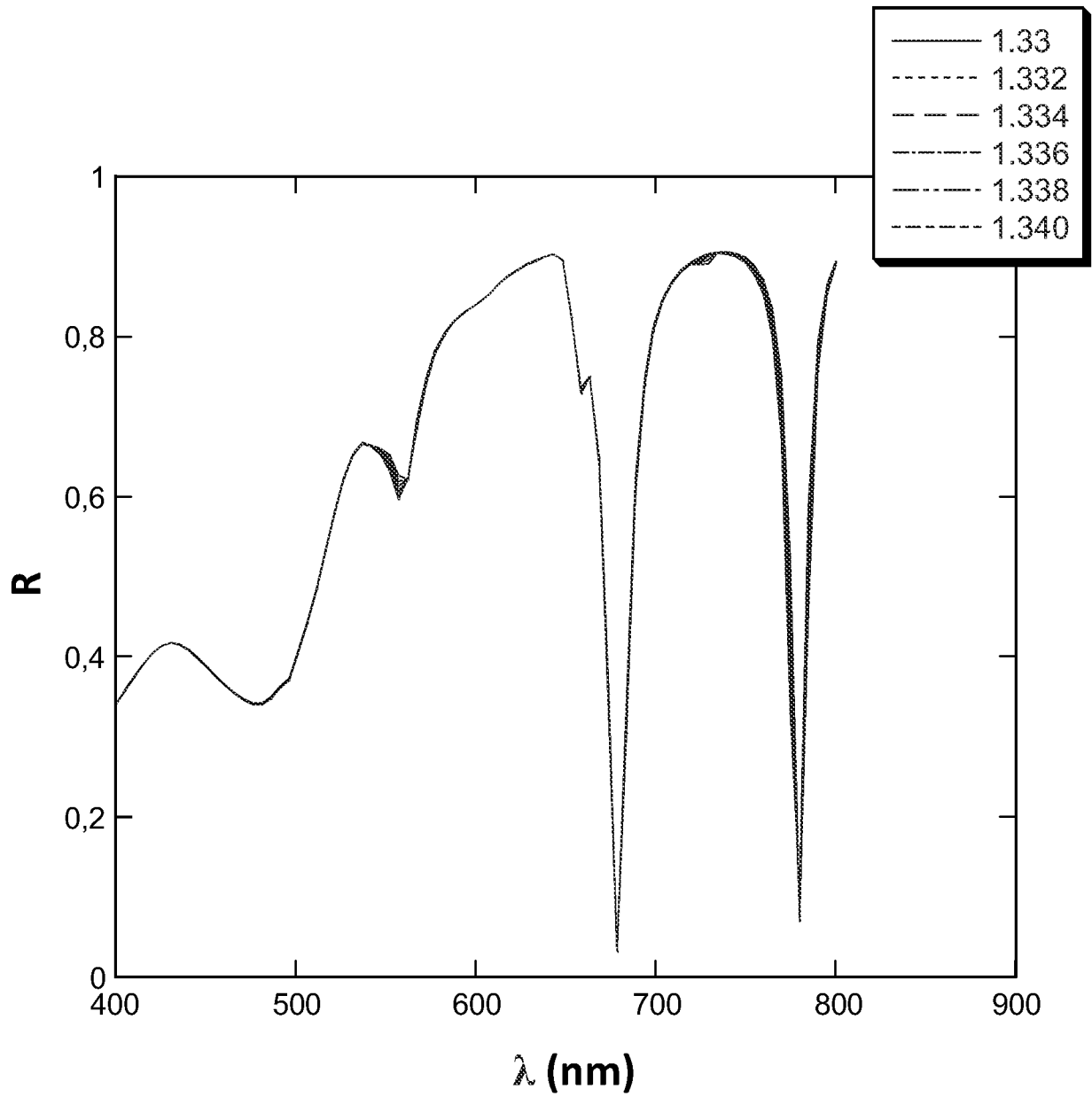
8/16

**FIG. 8****FIG. 9**

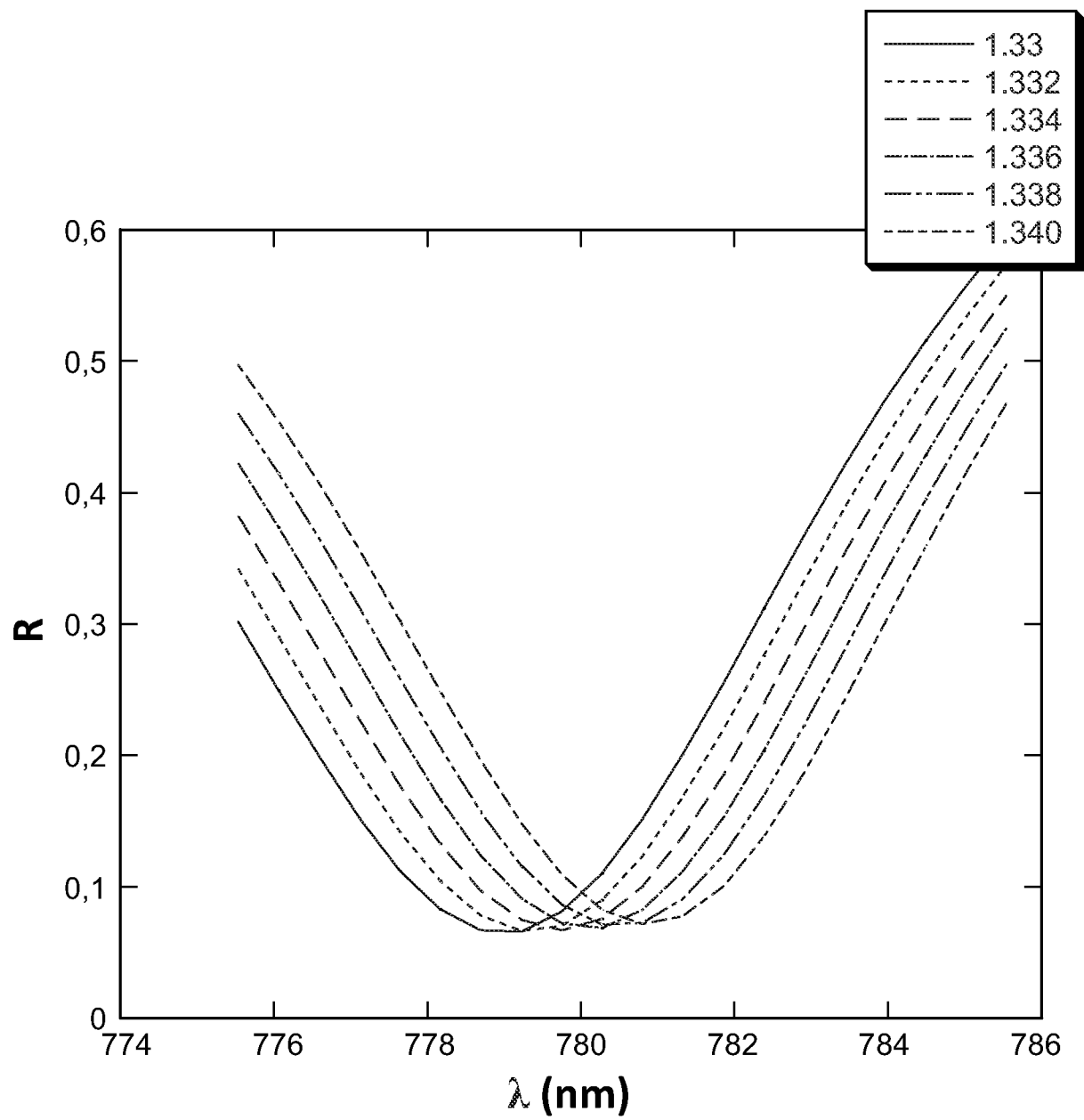
9/16

**FIG. 10****FIG. 11**

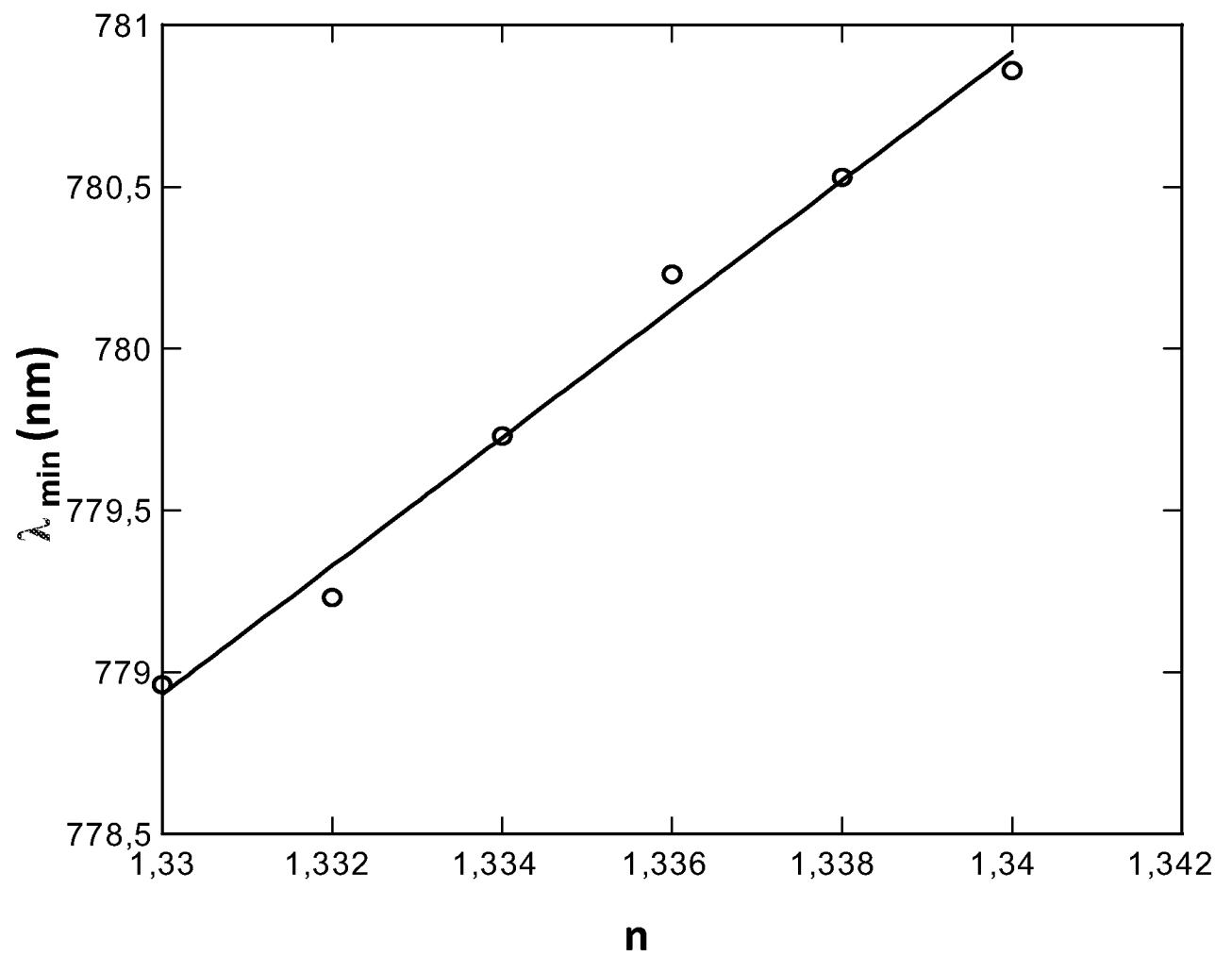
10/16

**FIG. 12**

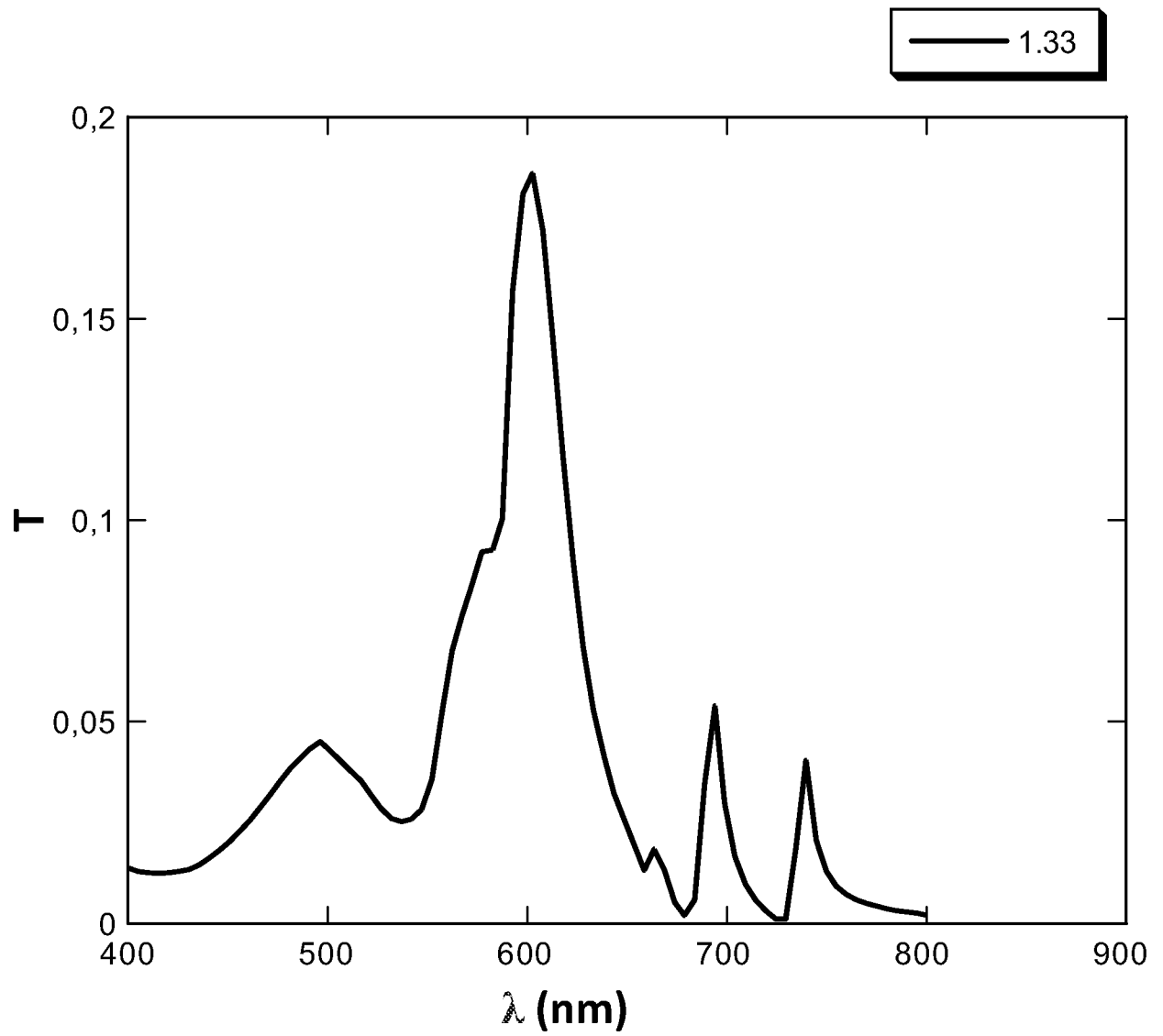
11/16

**FIG. 13**

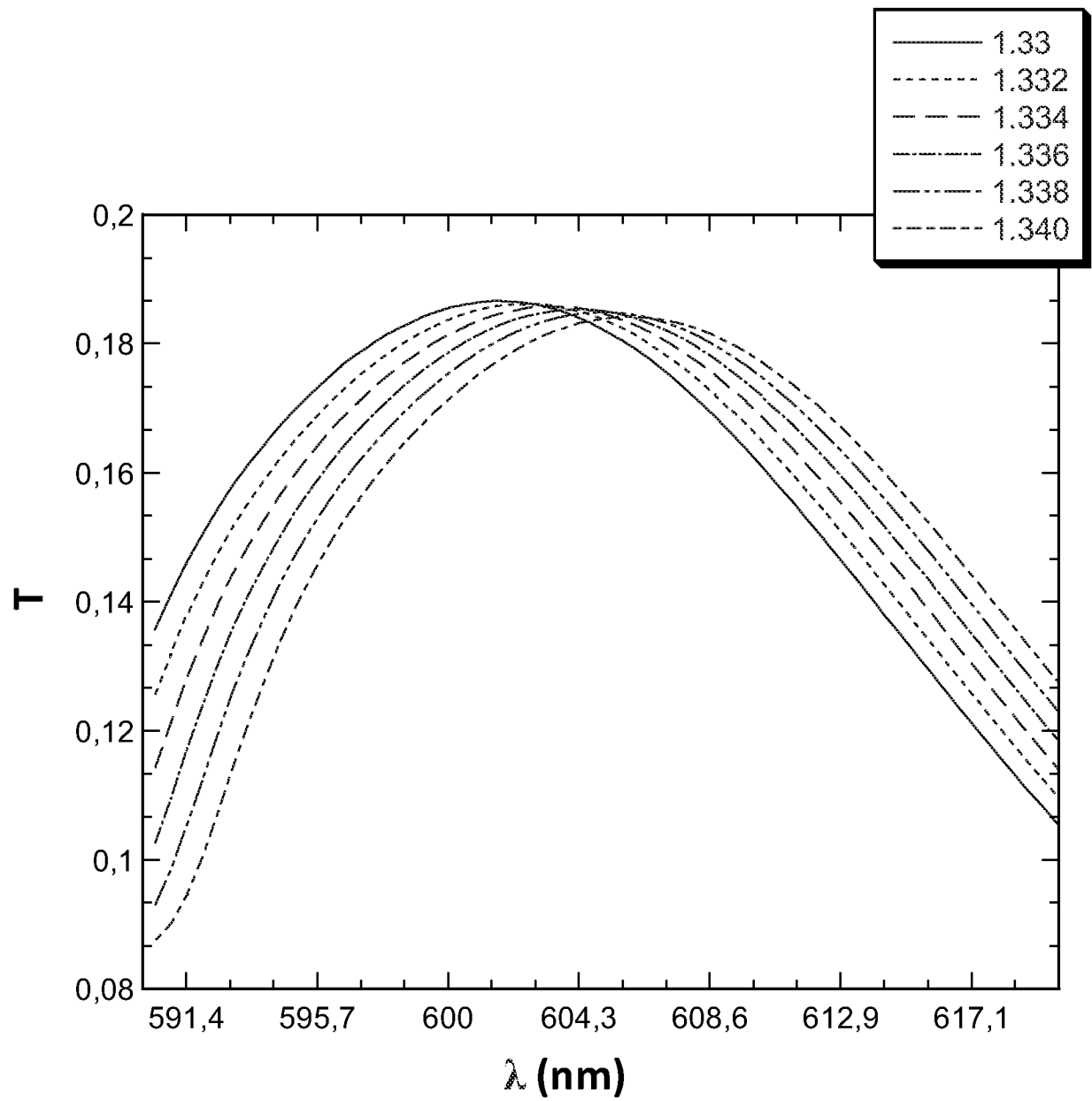
12/16

**FIG. 14**

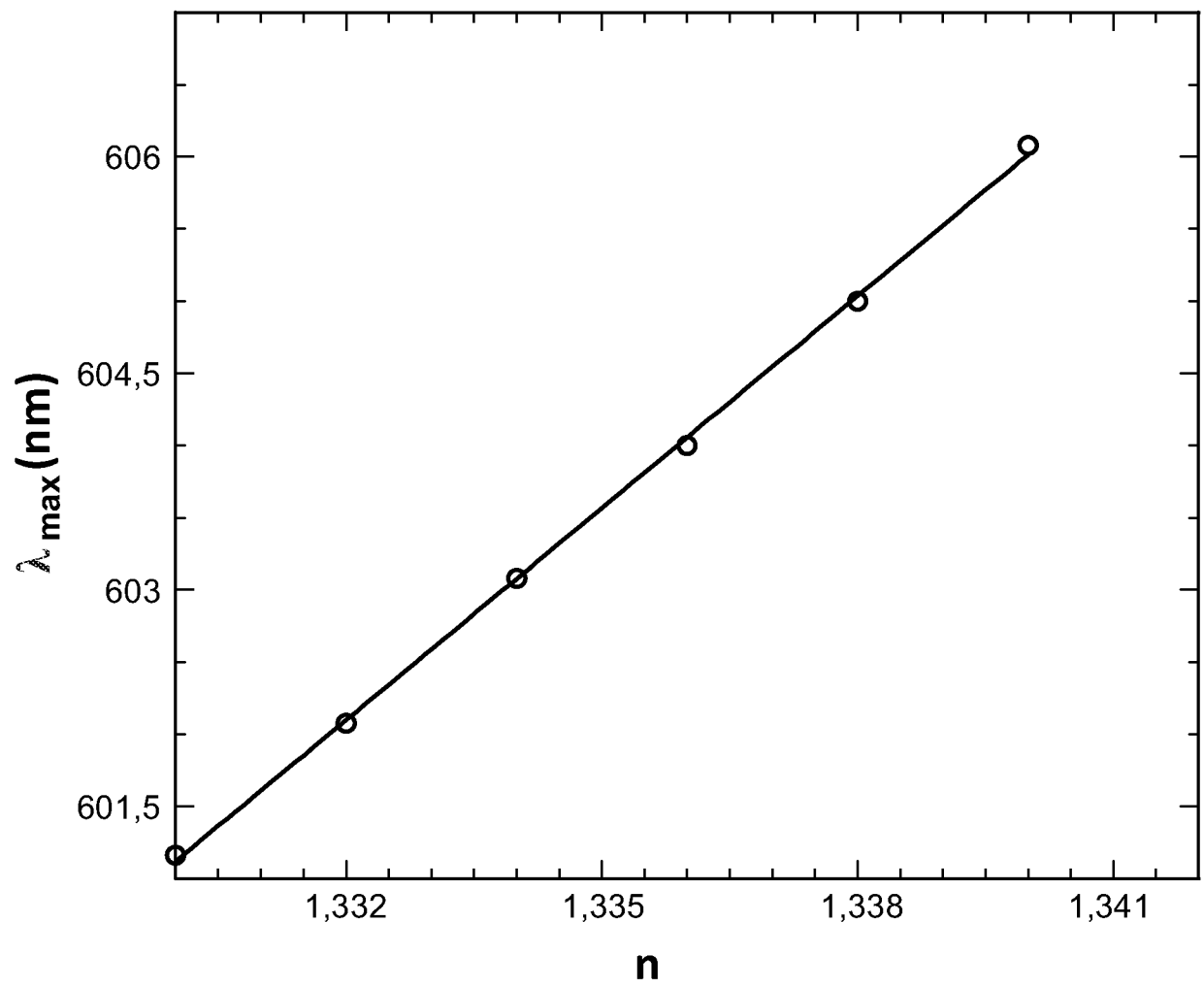
13/16

**FIG. 15**

14/16

**FIG. 16**

15/16

**FIG. 17**

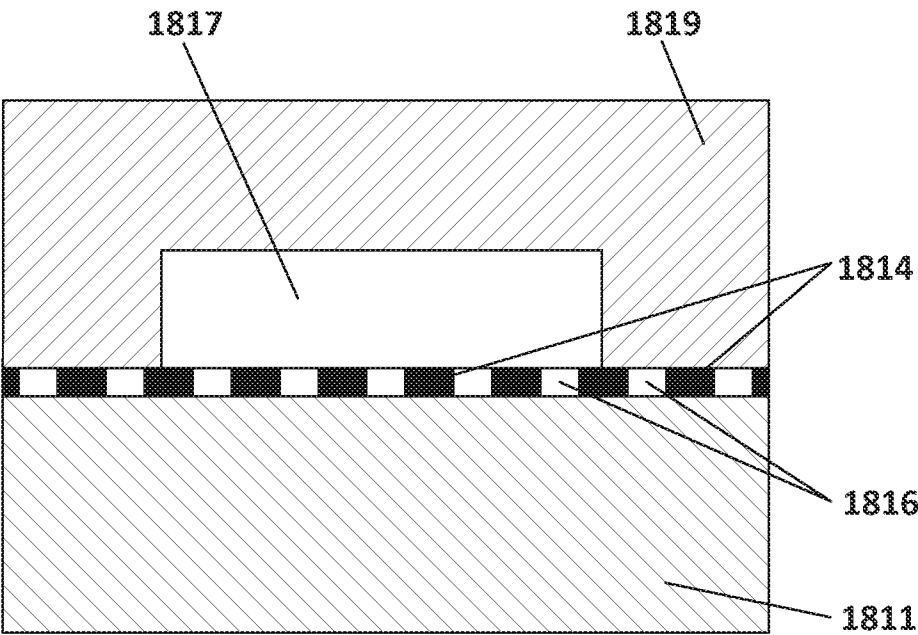


FIG. 18

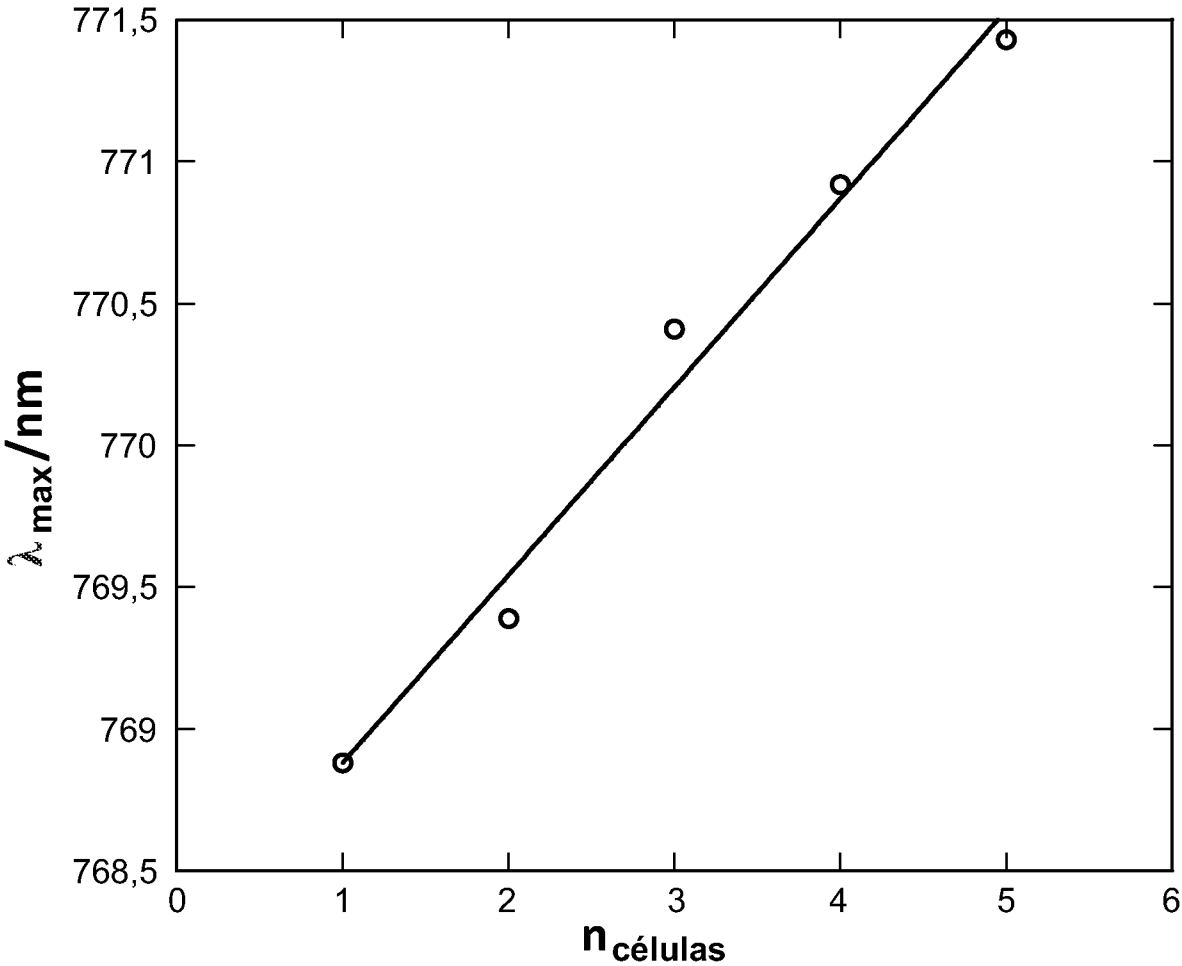


FIG. 19

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2014/070215

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

INV. G01N21/55 B01L3/00

ADD.

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 B01L

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)

EPO-Internal

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	WO 2009/057804 A1 (CANON KK [JP]; YAMADA TOMOHIRO [JP]; HANDA YOICHIRO [JP]) 7 de mayo de 2009 (2009-05-07)	1,4,5,7, 9-11, 13-15, 17,18
Y	página 9, línea 25 - página 11, línea 27 7 página 19, línea 19 - página 20, línea 22 22 página 22, línea 24 - página 27 página 24, línea 26 - página 27, línea 3 figuras 1A, 5A, 10	12
X	US 2010/097610 A1 (YAMADA TOMOHIRO [JP] ET AL) 22 de abril de 2010 (2010-04-22)	1-9,11, 13-18
Y	párrafos [0014], [0019], [0057], [0085], [0092], [0095], [0106], [0160], [0195], [0196] figuras 1,5A,5B,10,14	12
	----- -/-	

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

* Categorías especiales de documentos citados:	"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.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"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.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional 5 de noviembre de 2014 Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 12/11/2014

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 Funcionario autorizado D'Alessandro, Davide N° de fax N° de teléfono

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2014/070215

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	AMELING RALF ET AL: "Cavity-enhanced localized plasmon resonance sensing", APPLIED PHYSICS LETTERS, AMERICAN INSTITUTE OF PHYSICS, US, vol. 97, no. 25, 23 de diciembre de 2010 (2010-12-23), páginas 253116-253116, XP012138252, ISSN: 0003-6951, DOI: 10.1063/1.3530795	1-7, 9-11,13, 15-17
Y	résumen página 1, columna de izquierda - párrafo 1 página 2, columna de derecha - página 3, columna de izquierda	12
X	ARTAR ALP ET AL: "Fabry- Pérot nanocavities in multilayered plasmonic crystals for enhanced biosensing", APPLIED PHYSICS LETTERS, AMERICAN INSTITUTE OF PHYSICS, US, vol. 95, no. 5, 6 de agosto de 2009 (2009-08-06), página 51105-51105, XP012122519, ISSN: 0003-6951, DOI: 10.1063/1.3202391 résumen página 1, columna de izquierda - párrafo 2 - página 2, columna de derecha - página 1 página 3, columna de izquierda último párrafo columna de derecha	1,8-10, 15
X	EP 2 477 027 A1 (FUJIFILM CORP [JP]) 18 de julio 2012 (2012-07-18) figuras 1A, 1B columna 2, línea 27 - línea 52 columna 5, línea 51 - columna 6, línea 29 columna 8, línea 8 - línea 30 columna 20, línea 40 - línea 47	1,4,5,7, 8,10,13, 15,17
A	WO 2005/085806 A1 (CANON KK [JP]; YAMAMICHI JUNTA [JP]; OGAWA MIKI [JP]; HANDA YOICHIRO [JP]) 15 de septiembre de 2005 (2005-09-15) página 27, línea 2 - línea 8 figuras 1A	1-18
A	EP 0 965 835 A2 (HITACHI LTD [JP]) 22 de diciembre de 1999 (1999-12-22) figura 9 párrafo [0022] - párrafo [0024]	2,3,16
Y	WO 2014/008363 A1 (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL [US]; DEMIRCI UTKAN [US]; INCI FATIH [US]) 9 de enero de 2014 (2014-01-09) párrafos [0018], [0044], [0057]	12

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES2014/070215

WO 2009057804	A1	07-05-2009	JP	5288772	B2	11-09-2013
			JP	2009115492	A	28-05-2009
			US	2010233825	A1	16-09-2010
			WO	2009057804	A1	07-05-2009

US 2010097610	A1	22-04-2010	JP	4974870	B2	11-07-2012
			JP	2008180702	A	07-08-2008
			US	2010097610	A1	22-04-2010

EP 2477027	A1	18-07-2012	CN	101467028	A	24-06-2009
			EP	2030003	A1	04-03-2009
			EP	2477027	A1	18-07-2012
			JP	2008014933	A	24-01-2008
			KR	20090028549	A	18-03-2009
			US	2010165334	A1	01-07-2010
			WO	2007142360	A1	13-12-2007

WO 2005085806	A1	15-09-2005	CN	1926424	A	07-03-2007
			EP	1725855	A1	29-11-2006
			JP	4579593	B2	10-11-2010
			JP	2005283556	A	13-10-2005
			US	2009009756	A1	08-01-2009
			US	2011019195	A1	27-01-2011
			WO	2005085806	A1	15-09-2005

EP 0965835	A2	22-12-1999	DE	69932289	T2	15-02-2007
			EP	0965835	A2	22-12-1999
			JP	3380744	B2	24-02-2003
			JP	H11326193	A	26-11-1999
			US	6331276	B1	18-12-2001

WO 2014008363	A1	09-01-2014	NINGUNA			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/ES2014/070215

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N21/55 B01L3/00
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N B01L

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

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

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/057804 A1 (CANON KK [JP]; YAMADA TOMOHIRO [JP]; HANDA YOICHIRO [JP]) 7 May 2009 (2009-05-07)	1,4,5,7, 9-11, 13-15, 17,18
Y	page 9, line 25 - page 11, line 27 page 19, line 19 - page 20, line 22 page 22, line 24 - line 27 page 24, line 26 - page 27, line 3 figures 1A,5A, 10	12
X	US 2010/097610 A1 (YAMADA TOMOHIRO [JP] ET AL) 22 April 2010 (2010-04-22)	1-9,11, 13-18
Y	paragraphs [0014], [0019], [0057], [0085], [0092], [0095], [0106], [0160], [0195], [0196] figures 1,5A,5B,10,14	12
	----- -/-	



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent 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)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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

"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

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 November 2014

Date of mailing of the international search report

12/11/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

D'Alessandro, Davide

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/ES2014/070215

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AMELING RALF ET AL: "Cavity-enhanced localized plasmon resonance sensing", APPLIED PHYSICS LETTERS, AMERICAN INSTITUTE OF PHYSICS, US, vol. 97, no. 25, 23 December 2010 (2010-12-23), pages 253116-253116, XP012138252, ISSN: 0003-6951, DOI: 10.1063/1.3530795	1-7, 9-11,13, 15-17
Y	abstract page 1, left-hand column, paragraph 1 page 2, right-hand column - page 3, left-hand column	12
X	ARTAR ALP ET AL: "Fabry- Pérot nanocavities in multilayered plasmonic crystals for enhanced biosensing", APPLIED PHYSICS LETTERS, AMERICAN INSTITUTE OF PHYSICS, US, vol. 95, no. 5, 6 August 2009 (2009-08-06), pages 51105-51105, XP012122519, ISSN: 0003-6951, DOI: 10.1063/1.3202391 abstract page 1, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1 page 3, left-hand column, last paragraph - right-hand column	1,8-10, 15
X	EP 2 477 027 A1 (FUJIFILM CORP [JP]) 18 July 2012 (2012-07-18) figures 1A,1B column 2, line 27 - line 52 column 5, line 51 - column 6, line 29 column 8, line 8 - line 30 column 20, line 40 - line 47	1,4,5,7, 8,10,13, 15,17
A	WO 2005/085806 A1 (CANON KK [JP]; YAMAMICHI JUNTA [JP]; OGAWA MIKI [JP]; HANDA YOICHIRO [JP]) 15 September 2005 (2005-09-15) page 27, line 2 - line 8 figure 1A	1-18
A	EP 0 965 835 A2 (HITACHI LTD [JP]) 22 December 1999 (1999-12-22) figure 9 paragraph [0022] - paragraph [0024]	2,3,16
Y	WO 2014/008363 A1 (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL [US]; DEMIRCI UTKAN [US]; INCI FATIH [US]) 9 January 2014 (2014-01-09) paragraphs [0018], [0044], [0057]	12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/ES2014/070215

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009057804 A1	07-05-2009	JP 5288772 B2 JP 2009115492 A US 2010233825 A1 WO 2009057804 A1	11-09-2013 28-05-2009 16-09-2010 07-05-2009
US 2010097610 A1	22-04-2010	JP 4974870 B2 JP 2008180702 A US 2010097610 A1	11-07-2012 07-08-2008 22-04-2010
EP 2477027 A1	18-07-2012	CN 101467028 A EP 2030003 A1 EP 2477027 A1 JP 2008014933 A KR 20090028549 A US 2010165334 A1 WO 2007142360 A1	24-06-2009 04-03-2009 18-07-2012 24-01-2008 18-03-2009 01-07-2010 13-12-2007
WO 2005085806 A1	15-09-2005	CN 1926424 A EP 1725855 A1 JP 4579593 B2 JP 2005283556 A US 2009009756 A1 US 2011019195 A1 WO 2005085806 A1	07-03-2007 29-11-2006 10-11-2010 13-10-2005 08-01-2009 27-01-2011 15-09-2005
EP 0965835 A2	22-12-1999	DE 69932289 T2 EP 0965835 A2 JP 3380744 B2 JP H11326193 A US 6331276 B1	15-02-2007 22-12-1999 24-02-2003 26-11-1999 18-12-2001
WO 2014008363 A1	09-01-2014	NONE	