



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	102008901621291
Data Deposito	23/04/2008
Data Pubblicazione	23/10/2009

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
G	01	N		

Titolo

BIOSENSORI SPINTRONICI CON AREA ATTIVA LOCALIZZATA SU UNA PARETE DI DOMINIO MAGNETICO.

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale dal titolo:
"Biosensori spintronici con area attiva localizzata
su una parete di dominio magnetico"

Di: Politecnico di Milano, nazionalità italiana,
piazza Leonardo da Vinci 32, 20133 Milano (Italia)

Inventori designati: Riccardo BERTACCO, Paolo
VAVASSORI

Depositata il: 23 APR 2008

DESCRIZIONE

La presente invenzione si riferisce in generale a rivelatori di nanoparticelle magnetiche ed a procedimenti di riconoscimento molecolare, adatti per applicazioni in molti campi differenti.

Per definizione il riconoscimento biomolecolare è l'interazione fra biomolecole che hanno affinità reciproca oppure presentano una qualche sorta di complementarità. Esempi di tali interazioni sono l'ibridazione DNA-DNA, il riconoscimento anticorpo-antigene ed il legame ligando-recettore [H.A. Ferreira et al., IEEE Transactions on Magnetics 41, 4140 (2005)].

Il riconoscimento biomolecolare è di fatto onnipresente nella vita poiché costituisce il modo in cui funzionano i meccanismi cellulari. Esempi evi-

denti sono la replicazione del codice genetico, la generazione di enzimi, la fabbricazione e modificazione di proteine, glicidi ed acidi nucleici, il trasporto intracellulare ed extracellulare, il metabolismo cellulare, per citare alcuni dei più comuni processi biologici. D'altro canto, usi più familiari del riconoscimento biomolecolare comprendono i test di gravidanza, la verifica del gruppo sanguigno, lo screening genetico ed i trattamenti del cancro *site-directed* attualmente in sviluppo. È chiaro che il rilevamento del riconoscimento biomolecolare è sempre più importante in aree quali l'*healthcare*, l'industria farmaceutica, l'analisi ambientale, ed in generale in applicazioni biotecnologiche.

In generale, il rilevamento comporta l'uso di una biomolecola nota che sonda un campione di prova cercando uno specifico analita bersaglio. Un approccio comune per rilevare molecole biologiche è quello di attaccare alla molecola bersaglio un marcatore che produce un segnale esternamente osservabile. Tradizionalmente, ciò viene effettuato utilizzando il riconoscimento molecolare fra la molecola bersaglio ed uno specifico recettore (ad esempio un anticorpo) contrassegnato con il marcatore.

Il marcatore può essere un radioisotopo, un enzima od una molecola fluorescente, come nel caso delle tecniche LIF (*Light Induced Fluorescence*). Recentemente come marcatori per la biorivelazione sono anche state usate microparticelle e nanoparticelle magnetiche, grazie ai loro vantaggi rispetto agli altri marcatori. Le proprietà magnetiche delle nanoparticelle sono stabili nel tempo, dato che il magnetismo non è influenzato dalla chimica dei reagenti né soggetto a fotodecadimento (un problema che riguarda l'uso di marcatori fluorescenti). Inoltre, nei campioni biologici in generale non vi è segnale di fondo magnetico significativo, ed i campi magnetici non vengono schermati da reagenti o biomateriali acquosi. Inoltre, il magnetismo può essere utilizzato per manipolare a distanza le particelle magnetiche. È importante sottolineare che le dimensioni delle particelle magnetiche marcatrici devono essere il più possibile ridotte per introdurre la minor perturbazione possibile nella relazione di affinità fra le molecole sonda e le molecole bersaglio. In ogni caso occorre trovare un compromesso fra quest'ultimo aspetto e la necessità di un momento magnetico dimensionato in modo tale da poter essere rilevato da uno specifico sensore

con un ragionevole rapporto segnale-rumore. Finora diversi gruppi di ricerca hanno utilizzato particelle con diametri da pochi micron a 16 nm.

Negli ultimi anni sono stati sviluppati molti dispositivi di rilevamento di campi magnetici molto sensibili, quali sensori magnetici a magnetoresistenza gigante (GMR) [M.N. Baibich et al., Phys. Rev. Lett. 61 (21), 2472-2475 (1998)] ed a valvola di spin [B. Dieny et al., J. Appl. Phys. 69(8), 4774 (1991); P.P. Freitas et al., Sens Actuat A Phys, 81 (1-3), 2 (2000)] che permettono la misurazione di campi magnetici estremamente deboli, quali quelli generati da una singola microparticella magnetica. Oltre ai sensori GMR, sono state documentate misure di singole particelle magnetiche che usano sensori di Hall in silicio miniaturizzati [P.A. Besse et al., Appl. Phys. Lett. 80 (22), 4199 (2002)] e sensori ad effetto Hall planari basati su film sottili di Permalloy (lega FeNi) [L. Ejsing et al., Appl. Phys. Lett. 84 (23), 4729 (2004)]. Più recentemente al riconoscimento biomolecolare sono stati applicati sensori a magnetoresistenza tunnel (TMR) basati su giunzioni ad effetto tunnel magnetico (MTJ) [W. Shen et al., Appl. Phys. Lett. 2008, 103, 07A306], grazie alla loro superiore sensibili-

tà e stabilità con la temperatura. L'uso della magnetoresistenza anisotropa in sensori ad anello in qualità di rivelatori di particelle sensibili è stato suggerito da Miller et al. [M.M. Miller et al., Appl. Phys. Lett. **81**, 2211 (2002)] e, più recentemente, tale approccio è stato esteso da J. Llandro et al. [J. Llandro et al., Appl. Phys. Lett. **91**, 203904 (2007)] a sensori ad anello multistrato (pseudo valvola di spin) basati sull'effetto magnetoresistivo gigante (GMR). Nel primo caso, il sensore ad anello è stato fabbricato in NiFe ed è stato progettato per rilevare la componente radiale del campo creato da una singola microsfera (diametro $4,3$ micron) magnetizzata da un campo magnetico alternato fuori piano. Nel secondo caso, è stato documentato il rilevamento di una microsfera superparamagnetica del diametro di 4 micron utilizzando un sensore a pseudo valvola di spin ad anello. In assenza della particella la magnetizzazione dello strato libero del sensore è modificata da un campo magnetico esterno periodico, cosicché si genera un picco di GMR ogni qual volta si instaura una configurazione di allineamento antiparallelo degli strati magnetici. Una volta posta sul sensore, la particella fa da schermo per quest'ultimo, impedendo

la modifica della magnetizzazione dello strato libero.

Per confrontare differenti sensori per il riconoscimento biomolecolare devono essere presi in considerazione i seguenti parametri:

1) Sensibilità biologica - corrisponde alla capacità di rilevare basse concentrazioni dell'analita bersaglio in campioni biologici, ed è normalmente data in termini di limite di rilevamento (LOD); un basso LOD corrisponde ad una sensibilità biologica elevata;

2) Intervallo dinamico - tale parametro indica l'intervallo di concentrazione dell'analita che può essere rilevato dal sensore che lavora in regime lineare in un dato saggio biologico.

In alcuni casi la sensibilità biologica non costituisce un problema poiché possono essere applicati processi di amplificazione che consentono un aumento della concentrazione dell'analita, quali la Reazione a Catena della Polimerase (PCR) per il DNA in genomica. In altre applicazioni (ad esempio la proteomica) non vi sono però metodi adatti per l'amplificazione, per cui è necessaria un'elevata sensibilità biologica.

L'intervallo dinamico è una caratteristica che

è sovente in competizione con la sensibilità biologica. Sensori progettati per la rivelazione di singole particelle non sono in grado di contare grandi numeri di molecole, cosicché la loro applicazione in misurazioni di concentrazione di analiti diventa problematica.

Alla luce dei problemi sopra esposti, forma oggetto dell'invenzione un sensore per rilevare la presenza di una nanoparticella magnetica, detto sensore essendo disposto su un supporto, sul quale è inoltre disposta una pluralità di contatti non magnetici collegati in modo elettricamente conduttivo con il sensore, detti contatti essendo atti ad essere collegati a mezzi misuratori per misurazioni di magnetoresistenza sul sensore, caratterizzato dal fatto di includere una nanostruttura planare ferromagnetica, comprendente un'area di rivelazione conformata a striscia piegata ad angolo, detta area di rivelazione essendo atta ad assumere selettivamente, in risposta ad un campo magnetico applicato, una prima configurazione magnetica comprendente una struttura di spin a parete di dominio "testa a testa" trasversale, ed una seconda configurazione di spin in cui detta struttura di spin è assente, in cui la transizione dalla prima configurazione alla

seconda configurazione è prevista per un campo magnetico applicato avente una componente parallela ad uno dei lati dell'angolo dell'area di rivelazione con intensità superiore ad una soglia di transizione, detta soglia di transizione essendo influenzata in modo magnetoresistivamente rilevabile dalla prossimità di una nanoparticella magnetica all'area di rivelazione.

Forma inoltre oggetto dell'invenzione un array di sensori per la rivelazione di molecole bersaglio alle quali sono legate nanoparticelle magnetiche in qualità di marcatori, detto array di sensori comprendendo un supporto sul quale è disposta

una pluralità di siti di rivelazione ai quali sono fissate rispettive molecole leganti atte a legarsi selettivamente con dette molecole bersaglio, e rispettivi sensori, ciascuno dei quali essendo atto a rilevare la presenza di una nanoparticella magnetica nel rispettivo sito di rivelazione,

caratterizzato dal fatto che detti sensori sono costituiti da sensori secondo l'invenzione.

Forma altresì oggetto dell'invenzione un procedimento per la rivelazione di molecole bersaglio alle quali sono legate nanoparticelle magnetiche in qualità di marcatori, detto procedimento facendo

uso di un array di sensori secondo l'invenzione, e comprendendo le fasi seguenti:

applicare un primo campo magnetico in modo tale da ottenere detta prima configurazione di spin in ciascuna nanostruttura, e successivamente rimuovere detto primo campo magnetico;

distribuire un campione biologico contenente dette molecole bersaglio sopra ai siti di rivelazione;

applicare un secondo campo magnetico in modo tale da commutare detta prima configurazione di spin in detta seconda configurazione di spin in ciascuna nanostruttura, e successivamente rimuovere detto secondo campo magnetico;

rimuovere dalle aree di rivelazione le molecole bersaglio non legate chimicamente con le molecole leganti;

applicare un terzo campo magnetico in modo tale da ottenere nuovamente detta prima configurazione di spin in ciascuna nanostruttura, e successivamente rimuovere detto terzo campo magnetico; ed

effettuare misurazioni del campo critico di transizione da detta prima configurazione di spin in detta seconda configurazione di spin mediante misure di magnetoresistenza sui sensori attraverso

detta pluralità di contatti.

Il sensore, l'array di sensori ed il procedimento di rivelazione secondo l'invenzione si basano sulle variazioni della resistenza elettrica dovute alle variazioni di configurazione di magnetizzazione in una nanostruttura (effetto di magnetoresistenza anisotropa, AMR), in particolare in un'area ad angolo di tale nanostruttura (area di rivelazione). La configurazione di magnetizzazione può essere manipolata in modo controllato dall'applicazione di un campo esterno e sondata in modo non ambiguo mediante misurazioni magnetoresistive. L'elevata prevedibilità della commutazione di magnetizzazione e la nettezza della transizione fra differenti configurazioni di magnetizzazione permettono di usare la nanostruttura per la rivelazione di nanoparticelle. La prossimità di una nanoparticella magnetica influenza i valori del campo esterno necessario per modificare la configurazione di magnetizzazione, fornendo così un modo pratico per rilevarne la presenza.

Da una parte, si può ottenere la rivelazione di singole molecole poiché l'effetto di una singola nanoparticella magnetica sulla configurazione micromagnetica della nanostruttura è molto forte. Ciò

è dovuto al fatto che la parete di dominio e le particelle magnetiche hanno dimensioni comparabili.

Inoltre, più sensori possono essere organizzati in un array secondo configurazioni di nanostrutture che permettono un'efficace rivelazione e conteggio di più nanoparticelle magnetiche, consentendo una determinazione quantitativa della concentrazione molecolare in campioni biologici, con limiti di rilevamento ottenibili molto bassi.

Ulteriori caratteristiche e vantaggi risulteranno dalla descrizione che segue, con particolare riferimento ai disegni annessi, dati a puro titolo di esempio non limitativo, in cui:

la figura 1 è una vista in pianta semplificata che illustra un singolo sensore secondo l'invenzione;

la figura 2a illustra il sensore di figura 1 con una configurazione di spin a parete di dominio testa a testa trasversale su un angolo del sensore e configurazioni a vortice su dischi terminali;

la figura 2b illustra il sensore di figura 1 in cui la configurazione di spin a parete di dominio di figura 2a è annullata applicando un campo magnetico parallelo ad uno dei lati dell'angolo con un'intensità superiore ad una determinata soglia, e

successivamente rimuovendo tale campo;

la figura 3 illustra un'operazione di inizializzazione del dispositivo di figura 1;

la figura 4 illustra la commutazione del dispositivo di figura 1 fra le configurazioni di spin delle figure 2a e 2b;

la figura 5 illustra il principio di funzionamento del dispositivo di figura 1, per la rivelazione di una nanoparticella magnetica;

la figura 6 è un grafico che mostra il campo magnetico necessario per l'annullamento della configurazione di spin di figura 2a, in assenza di nanoparticelle magnetiche (linea continua), e con una nanosfera superparamagnetica (particella magnetica che acquista un momento magnetico solo in presenza di un campo esterno) disposta sopra alla parete di dominio ad una distanza verticale di 60 nm dalla superficie della nanostruttura, avente un diametro rispettivamente di 50 nm (linea a tratti) e 100 nm (linea a tratto e punto);

la figura 7a illustra grafici che rappresentano il momento magnetico di particelle sferiche superparamagnetiche aventi diametro rispettivamente di 50 nm e 100 nm (e magnetizzazione di saturazione pari a $3 \cdot 10^5$ A/m), in funzione del campo applicato;

la figura 7b mostra un diagramma vettoriale della forza agente su una nanosfera superparamagnetica con diametro di 50 nm su un piano a 200 nm dalla superficie superiore del dispositivo initializzato come in figura 2a;

la figura 8 è un insieme di diagrammi a curve di livello del modulo della forza attrattiva agente su una nanosfera superparamagnetica (il cui momento magnetico in funzione del campo è rappresentato in figura 7a) con diametro rispettivamente di 50 nm e 100 nm su piani a 200, 100 e 60 nm dalla superficie della nanostruttura, con la configurazione di spin della figura 2a (colonna centrale e destra), e dopo l'annullamento di tale configurazione (colonna di sinistra);

la figura 9 rappresenta simulazioni micromagnetiche di due nanostrutture secondo la figura 1 fra loro concatenate; e

le figure 10a e 10b illustrano schematicamente una porzione di un array di sensori della figura 1, rispettivamente secondo una configurazione in parallelo e secondo una configurazione in serie.

I dispositivi ed i procedimenti descritti nell'ambito della presente invenzione riguardano nanostrutture. Tipicamente, le nanostrutture sono

strutture aventi almeno due dimensioni inferiori ad 1 μm (ad esempio dimensioni nanometriche). Benché i confini esatti della classe delle nanostrutture non siano in realtà definibili con un particolare valore numerico di dimensione, tale classe è comunque chiaramente riconoscibile da parte del tecnico del ramo.

La presente invenzione riguarda un sensore per la rivelazione di singole nanoparticelle magnetiche ed un array di sensori per la rivelazione di una pluralità di nanoparticelle magnetiche. Un tale array è impiegato per la rivelazione di molecole bersaglio alle quali sono legate nanoparticelle magnetiche in qualità di marcatori.

L'array di biosensori comprende convenzionalmente un supporto 1 sul quale è disposta una pluralità di siti di rivelazione (indicati con DS nelle figure 10a e 10b) ai quali sono associate rispettive molecole leganti atte a legarsi selettivamente con le molecole bersaglio.

Ai fini della presente invenzione, il termine "molecola legante" si riferisce ad esempio ad anticorpi, filamenti di acidi polinucleici (DNA od RNA) o recettori molecolari in grado di legarsi selettivamente a, ovvero di "riconoscere", potenziali mo-

lecole bersaglio quali ad esempio acidi polinucleici, enzimi, proteine, peptidi, anticorpi, lipidi, polimeri, ioni metallici, ecc., delle quali si desidera determinare la presenza, assenza o la concentrazione in un saggio.

In figura 1 è rappresentata un singolo sensore disposto su un supporto 1, il quale include una nanostruttura planare ferromagnetica 3.

Tale nanostruttura 3 è tipicamente coperta da una pluralità di strati (non illustrati) previsti per un biosensore, comprendente uno strato protettivo isolante, uno strato polimerico per il fissaggio delle molecole leganti sopra menzionate, e lo strato delle molecole leganti.

La nanostruttura 3 comprende un'area di rivelazione 31 conformata a striscia piegata ad angolo.

Preliminarmente, si osserva che il concetto di nanostruttura della presente invenzione si basa su un precedente lavoro sperimentale di uno degli inventori, riguardante anelli quadri di Permalloy applicati nell'immagazzinamento magnetico di informazione [P. Vavassori et al., Appl. Phys. Lett. **91**, 093114 (2007)]. Secondo tale concetto, una parete di dominio magnetico trasversale può essere posizionata in un angolo qualunque della nanostruttura,

e la sua posizione può essere letta elettricamente per effetto della magnetoresistenza anisotropa. La posizione della parete di dominio rappresenta l'informazione immagazzinata (0 od 1 per due angoli adiacenti), mentre il suo spostamento tramite un campo magnetico esterno (od una corrente iniettata) è utilizzato per scrivere l'informazione.

In sostanza, gli inventori hanno adattato tale concetto alla rivelazione di nanoparticelle magnetiche, sfruttando il fatto che il campo magnetico necessario per spostare la parete di dominio dipende fortemente dalla presenza di una nanoparticella vicino alla parete di dominio. L'anello quadro è stato poi sostituito da un singolo angolo dell'anello essenzialmente per ottenere una maggior densità di sensori sul supporto.

Nella descrizione che segue si farà quindi riferimento ad una nanostruttura formata da un singolo angolo. L'invenzione non è tuttavia a questa limitata, e comprende qualsiasi nanostruttura che comprenda almeno un'area di rivelazione conformata a striscia piegata ad angolo.

La nanostruttura 3 comprende inoltre una coppia di dischi terminali 32 ricavati alle opposte estremità dell'area di rivelazione 31. La nano-

struttura 3 è ad esempio di Permalloy. Negli esempi numerici che verranno fatti nel seguito si farà riferimento ad una nanostruttura fatta di tale materiale, avente uno spessore di 40 nm ed una larghezza della striscia dell'area di rivelazione pari a 50 nm, e dimensioni esterne complessive pari a $0,3 \mu\text{m} \times 0,3 \mu\text{m}$. Tali dimensioni possono comunque essere ulteriormente ridotte senza detrimento per la funzionalità del dispositivo.

Sugli opposti capi dell'area di rivelazione 31 è inoltre distribuita una pluralità di contatti non magnetici Iin, GND, V1 e V2, i quali possono essere ricavati ad esempio mediante litografia da fascio elettronico sulla superficie della nanostruttura 3. I contatti Iin, GND, V1 e V2 sono atti ad essere collegati a mezzi misuratori (non illustrati) per misurare la risposta magnetoresistiva della nanostruttura 3 ai capi dell'area di rivelazione 31. In particolare, nell'esempio specifico illustrato sono presenti due contatti di alimentazione Iin e GND atti ad essere collegati ad un circuito di alimentazione di corrente per iniettare una corrente elettrica attraverso l'area di rivelazione 31, e due contatti di lettura V1 e V2 atti ad essere collegati ad un circuito misuratore per misurare la diffe-

renza di potenziale fra i capi dell'area di rivelazione 31. I contatti suddetti sono ad esempio di Au, e negli esempi numerici che verranno fatti nel seguito si farà riferimento a contatti fatti di tale materiale.

Con riferimento alle figure 2a e 2b, si descrivono ora le configurazioni di spin che è possibile creare nella nanostruttura 3 applicando un campo magnetico lungo la bisettrice dell'angolo formato dai due lati della struttura ad angolo (fig. 2a) o parallelamente ad uno dei lati (fig. 2b). Nel seguito, si farà per semplicità riferimento ad un sistema di assi cartesiani x , y rispettivamente paralleli ai lati di tale angolo.

Una prima configurazione è illustrata in figura 2a, e comprende una struttura di spin a parete di dominio testa a testa trasversale TW posizionata sull'angolo dell'area di rivelazione 31 e strutture a vortice VS posizionate sui dischi terminali 32. L'applicazione di un secondo campo magnetico lungo la direzione x od y sposta la struttura di spin TW verso uno dei dischi terminali 32, dove si annulla nella struttura di spin a vortice VS, producendo la seconda configurazione illustrata in figura 2b.

La figura 3 mostra un esempio di procedura di

inizializzazione del dispositivo, secondo il quale la struttura di spin a parete di dominio "testa a testa" trasversale TW viene posizionata nell'angolo dell'area di rivelazione 31 applicando un campo magnetico H_0 (con intensità ad esempio pari a 1000 Oe) lungo la bisettrice dell'angolo e successivamente rimuovendo tale campo. Contemporaneamente si instaurano sui dischi terminali 32 le due strutture di spin VS a vortice. Una volta creata, la struttura di spin a parete TW è stabile, e può essere spostata fino al suo annullamento in una delle strutture di spin a vortice VS applicando un campo magnetico lungo la direzione x o y.

La figura 4 mostra la rimozione di una struttura di spin a parete TW dall'angolo applicando un campo magnetico orizzontale (direzione x) H . La struttura di spin a parete TW può essere riposizionata sull'angolo applicando un campo magnetico orizzontale nella direzione opposta, oppure applicando nuovamente un campo H_0 lungo la bisettrice dell'angolo come illustrato in figura 4.

Per rilevare la presenza di una struttura di spin a parete TW nell'angolo della nanostruttura si impiegano misurazioni magnetoresistive, cioè la misurazione delle differenze di potenziale V_A e V_B fra

i contatti di lettura V2 e V1 rispettivamente nelle due configurazioni di spin illustrate in figura 4 (rispettivamente corrispondenti a quelle delle figure 2a e 2b). La magnetoresistenza nelle nanostrutture secondo l'invenzione è dominata dal cosiddetto effetto di magnetoresistenza anisotropa (AMR), e si osserva un massimo di resistenza (e quindi un massimo di differenza di potenziale fra i contatti di lettura) quando la magnetizzazione è parallela od antiparallela al flusso di corrente iniettato. Ciò corrisponde ad una condizione in cui non vi è struttura di spin a parete TW presente fra i due contatti di lettura V2 e V1, e la magnetizzazione segue la direzione di estensione dell'area di rivelazione 31, producendo la differenza di potenziale V_B di figura 4.

Se fra i contatti di lettura V2 e V1 è presente una struttura di spin a parete TW, la magnetizzazione è in parte diretta perpendicolarmente al flusso di corrente e quindi la resistenza risulta diminuita, producendo la differenza di potenziale $V_A < V_B$ come illustrato in figura 4.

L'alta prevedibilità della commutazione fra le configurazioni di spin e la nettezza della transizione fra tali configurazioni permettono di usare

la nanostruttura per la rivelazione di nanoparticelle magnetiche, nel modo seguente.

Il campo richiesto per spostare la struttura di spin a parete TW dall'angolo provocando il suo annullamento in una delle due strutture di spin a vortice VS ha un valore di soglia ben definito, ad esempio H_{1x} in figura 5 per un campo H applicato orizzontalmente. Se una nanosfera magnetizzata N è disposta in prossimità dell'angolo in cui è localizzata la struttura di spin a parete TW, l'interazione dipolare fra il campo generato dalla struttura di spin a parete TW ed il momento magnetico della particella N impedisce lo spostamento della struttura di spin TW ad H_{1x} , cosicché per commutare la magnetizzazione nel segmento orizzontale della nanostruttura 3 è necessaria un'intensità di campo maggiore H_{2x} , come illustrato in figura 5. L'intensità di campo magnetico necessaria per lo spostamento e l'annullamento della struttura di spin TW, osservato misurando la differenza di potenziale fra i due contatti di lettura V2 e V1, può essere così utilizzata per rivelare la prossimità di una nanoparticella magnetica N.

In figura 6 è presentato il risultato di una simulazione dell'effetto di una nanosfera magnetica

commerciale MACS™ NPs (diametro 50 nm, magnetizzazione di saturazione $M_s = 300 \text{ emu/cm}^3$), disposta in sopra alla struttura di spin a parete TW, con il proprio fondo ad una distanza verticale di 60 nm dalla superficie della nanostruttura di Permalloy. Tale distanza corrisponde ad uno spessore prevedibile per un biosensore, tenendo conto degli strati che rivestono la nanostruttura 30, cioè lo strato protettivo isolante, lo strato polimerico intermedio e lo strato delle molecole leganti (ad esempio, nel caso di molecole sonda formate da filamenti di DNA si tiene conto della lunghezza di tali filamenti). A causa della prossimità della nanoparticella N, lo spostamento della struttura di spin a parete TW da parte di un campo applicato orizzontalmente è ritardato di 10 Oe (linea a tratti in figura 6) rispetto al caso dell'angolo privo di nanoparticelle (linea continua in figura 6). La figura 6 mostra inoltre l'effetto del diametro della particella sul campo che provoca lo spostamento della struttura TW: utilizzando una nanosfera con un diametro di 100 nm posizionata ad una distanza verticale di 60 nm dalla superficie della nanostruttura tale campo aumenta di 35 Oe (linea a tratto e punto in figura 6).

Una stima per il rapporto segnale-rumore al quale è possibile rilevare lo spostamento della struttura di spin a parete TW dall'angolo può essere ottenuta da test effettuati nel caso di una struttura di spin a parete TW spostata fra due angoli adiacenti di una nanostruttura ad anello quadrato di Permalloy [P. Vavassori et al., Appl. Phys. Lett. **91**, 093114 (2007)]. Le misurazioni sono state effettuate iniettando una corrente alternata di 15 μA (frequenza di 473 Hz) nella struttura anulare e misurando la differenza di potenziale fra due contatti di Au ai capi di un angolo con un amplificatore lock-in (costante di tempo di 10 ms). Una struttura di spin a parete TW è stata posizionata nell'angolo selezionato con un campo magnetico esterno applicato lungo uno dei lati dell'anello, seguendo cioè la stessa procedura descritta per la nanostruttura 3 a forma di angolo qui descritta. Gli inventori hanno rilevato una variazione (aumento) della differenza di potenziale di 1,45 μV a seguito della rimozione della struttura di spin a parete TW dall'angolo con un rumore (con e senza la struttura di spin a parete TW) di 60 nV, corrispondente ad un rapporto segnale-rumore di 24 (che aumenta a circa 60 aumentando la costante di tempo dell'amplificatore lock-

in, cioè l'intervallo di integrazione, fino a 100 ms). Questo valore può essere usato come una buona stima del rapporto segnale-rumore tipico che caratterizza il processo di rivelazione delle nanoparticelle da parte del dispositivo qui descritto.

Per applicazioni pratiche il dispositivo può essere fatto funzionare nel modo seguente: esso viene dapprima inizializzato posizionando una struttura di spin a parete TW nell'angolo come mostrato in figura 3 (l'eventuale presenza della nanoparticella non influenza tale fase); si applica quindi un campo orizzontale H_x tale che $H_{1x} < H_x < H_{2x}$; se la differenza di potenziale fra i due contatti di lettura V2 e V1 non cambia una nanoparticella magnetizzata N è in prossimità dell'angolo; in caso contrario, se la differenza di potenziale varia (cioè aumenta) nessuna nanoparticella è in prossimità dell'angolo.

È importante notare che l'area attiva del dispositivo è unicamente la porzione dell'angolo occupata dalla struttura di spin a parete TW, che è dell'ordine della larghezza della striscia dell'area di rivelazione 31, cioè 50 nm x 50 nm nell'esempio in considerazione, e coincide con la porzione della nanostruttura 3 compresa fra i con-

tatti di lettura V2 e V1. Pertanto, per la rivelazione della singola nanoparticella, l'area di rivelazione 31 può essere adattata alle dimensioni della nanoparticella da rilevare progettando di conseguenza la larghezza della struttura ad angolo senza dover ridurre l'intera nanostruttura 3.

Un'altra condizione da rispettare per il corretto funzionamento del dispositivo prevede che la nanoparticella sia disposta in prossimità dell'angolo. Il concetto effettivo del dispositivo con i due dischi terminali 32 prevede che, quando il sensore viene inizializzato allo stato magnetico rappresentato in figura 2a, vi sia un campo magnetico originato dalla nanostruttura 3 unicamente in corrispondenza della struttura di spin a parete TW, mentre altrove il campo è trascurabile (la struttura di spin a vortice VS non produce un campo apprezzabile). L'elevato gradiente di campo che caratterizza tale campo di dispersione garantisce che una particella smagnetizzata vagante in prossimità della struttura possa essere intrappolata e trascinata verso l'area di rivelazione 31 ad angolo (autofocalizzazione). La figura 7b mostra il diagramma vettoriale della forza agente su un piano a distanza di 200 nm dalla superficie del sensore su una

nanosfera superparamagnetica di diametro pari a 50 nm, caratterizzata da un momento magnetico in funzione del campo esterno, $m(H)$, come mostrato nel grafico superiore di figura 7a, che è il valore stimato per la nanoparticella commerciale MACS™ qui considerata. Il grafico inferiore di figura 7a mostra anche $m(H)$ per una nanoparticella MACS™ con un diametro di 100 nm. La forza è stata calcolata calcolando il campo magnetico creato nello spazio circostante dalla nanostruttura nella configurazione magnetica di figura 2a ed applicando la seguente espressione vettoriale:

$$\mathbf{F} = -\mu_0 (\mathbf{m} \cdot \nabla) \mathbf{H},$$

il momento magnetico della nanoparticella avendo la forma $\mathbf{m} = L(H, T, V, M_s) V M_s \mathbf{h}$, in cui V ed M_s sono rispettivamente il volume e la magnetizzazione di saturazione della nanoparticella, \mathbf{h} è un versore parallelo al campo applicato \mathbf{H} , ed $L(H, T, V, M_s)$ è la funzione di Langevin che descrive il comportamento superparamagnetico della nanosfera. Il diagramma vettoriale di figura 7b mostra chiaramente che la nanoparticella verrebbe trascinata verso l'angolo della nanostruttura in cui è posizionata la struttura di spin a parete TW.

La figura 8 mostra i diagrammi a curve di li-

vello del modulo della forza agente su una nanosfera superparamagnetica avente un diametro di 50 nm o di 100 nm su piani a 200, 100 e 60 nm dalla superficie della nanostruttura 3, con la struttura di spin a parete TW nell'angolo (colonne centrale e destra in figura 8) e dopo l'annullamento della struttura TW (colonna sinistra in figura 8). I diagrammi a curve di livello nella colonna centrale di figura 8 mostrano che il modulo della forza agente sulla nanosfera di diametro 50 nm ad una distanza di 200 nm dalla nanostruttura 3 è nell'intervallo 0,5-1 pN su un'area di circa 300 nm di diametro, garantendo un'efficace azione di intrappolamento e focalizzazione su una nanoparticella (si veda la spiegazione più avanti). Il modulo della forza aumenta di circa un fattore 10 se la distanza fra la nanoparticella e la superficie della nanostruttura viene ridotta a 60 nm. I diagrammi a curve di livello nella colonna di sinistra della figura 8 mostrano che quando la struttura di spin a parete TW viene rimossa dall'angolo ed annullata in una delle strutture di spin a vortice VS la forza agente sulla nanoparticella in corrispondenza dell'angolo risulta sostanzialmente azzerata.

Pertanto, diversamente dagli altri dispositivi

che sfruttano la magnetoresistenza anisotropa, non è necessaria alcuna azione esterna (quale il posizionamento della nanoparticella nella posizione corretta utilizzando un campo esterno per indurre un momento nella nanoparticella) per posizionare e magnetizzare la particella per un rilevamento ottimale. La forza agente su una nanoparticella può essere aumentata o diminuita rispettivamente aumentando o diminuendo lo spessore della nanostruttura. Tale aspetto è cruciale nella taratura della focalizzazione magnetica e per evitare il raggruppamento di particelle che si potrebbe produrre del caso di campi con gradiente troppo elevato.

Un problema di questo tipo di focalizzazione magnetica rispetto alla focalizzazione magnetica convenzionale ottenuta con linee di corrente consiste nel fatto che è permanente e che la forza magnetica potrebbe ostacolare il legame chimico fra le molecole leganti e le molecole bersaglio, con conseguente compromissione della specificità del saggio biologico. Una stima approssimativa dell'energia di legame magnetico di una nanoparticella posizionata sopra la struttura di spin a parete TW dà 10^{-18} J, da confrontare con il valore comparabile dell'energia di legame fra le due porzioni

di elica per una tipica reazione di ibridazione DNA-DNA considerando un oligo con 23 basi, ovvero $8 \cdot 10^{-19}$ J. Questi valori indicano chiaramente che una focalizzazione permanente non sarebbe accettabile. Tuttavia, nel concetto secondo l'invenzione è possibile annullare la struttura di spin a parete TW nei dischi terminali semplicemente applicando un campo esterno, ottenendo così una situazione in cui le forze magnetiche sono trascurabili, come sopra discusso con riferimento ai diagrammi della colonna sinistra di figura 8. In altre parole il concetto secondo l'invenzione permette di attivare e disattivare la focalizzazione magnetica tramite campi magnetici esterni, senza linee di corrente addizionali che aumenterebbero la complessità del dispositivo.

L'array di biosensori potrebbe quindi funzionare nel modo seguente:

(i) si posiziona una struttura di spin a parete TW sull'area di rivelazione 31 ad angolo di ciascuna nanostruttura 3, e si distribuisce il campione biologico sull'area occupata dai sensori in modo da consentire l'autofocalizzazione delle nanoparticelle magnetiche sull'area di rivelazione 31 di ciascuna nanostruttura 3;

(ii) si annullano le strutture di spin a parete TW nei rispettivi dischi terminali 32, eliminando così le forze magnetiche;

(iii) si rimuovono dai siti di rivelazione DS le molecole bersaglio e le nanoparticelle non selettivamente legate chimicamente, mediante un convenzionale processo di lavaggio;

(iv) si posizionano nuovamente le strutture di spin a parete TW nelle aree di rivelazione 31 ad angolo tramite un campo magnetico esterno, e la presenza di una molecola bersaglio specificamente legata viene rilevata grazie alla misura del campo critico di transizione, da detta prima configurazione di spin a parete TW in detta seconda configurazione di spin in cui la parete TW è annichilita in una delle strutture a vortice VS, mediante la misura del campo critico di transizione, a sua volta determinato in base a misure della differenza di potenziale ai capi dei contatti V1 e V2.

La figura 9 mostra simulazioni micromagnetiche che illustrano come la struttura ad angolo di base possa essere ripetuta in catene senza alterare il funzionamento di ciascuna unità. In pratica, una catena 300 è realizzata facendo in modo che ciascuna singola nanostruttura 3 unitaria condivida un

proprio disco terminale 32 con un'altra nanostruttura 3 ad essa adiacente. Tale configurazione è particolarmente adatta per realizzare un array, disponendo una pluralità di catene 300 di nanostrutture affiancate. Grazie all'eccellente rapporto segnale-rumore che caratterizza il processo di rivelazione delle nanoparticelle (pari o superiore a 24, come sopra descritto), e per ridurre il numero di contatti richiesti per il conteggio di una pluralità di nanoparticelle, si può leggere la differenza di potenziale in una pluralità di aree di rivelazione ad angolo 31 collegate da contatti di lettura in modo da formare un insieme di resistenze in parallelo (figura 10a) od in serie (figura 10b). In particolare, in figura 10a, è illustrata una parte di un array in cui fra le catene affiancate 300 si estendono coppie di strisce di contatto di lettura 310, 320 (corrispondenti ai contatti di lettura V1 e V2 descritti in precedenza), in cui ciascuna area di rivelazione 31 di ogni catena di nanostrutture 300 è collegata in parallelo con un'area di rivelazione 31 delle altre catene di nanostrutture 300 ad essa corrispondente per posizione, tramite una rispettiva coppia di strisce di contatto di lettura 310, 320. Le catene 300 sono

alimentate in parallelo tramite i contatti di alimentazione I_{in} e GND. Invece, in figura 10b, è illustrata una parte di un array in cui una coppia di strisce di contatto di lettura 410, 420 (corrispondenti ai contatti di lettura V1 e V2 descritti in precedenza), è collegata a capi opposti di ciascuna catena 300 su tutte le catene 300. Le catene 300 sono alimentate indipendentemente da rispettivi contatti di iniezione $I_{i,in}$ (con l'indice $i=1, 2, 3, 4...$), con un contatto GND di uscita della corrente in comune. In ogni caso, per la lettura su più aree di rivelazione 31 ciascuna coppia di strisce di contatto di lettura 310, 320 (nella configurazione di figura 10a) o ciascun contatto di iniezione di corrente $I_{i,in}$ deve essere sequenzialmente abilitato da un multiplexer. Per assicurare una lettura indipendente delle singole catene, l'impedenza delle strisce di lettura 410 e 420 dovrà essere significativamente maggiore di quella delle catene. Il rapporto segnale-rumore sopra calcolato è tale che si può prevedere di avere fino a 5 aree di rivelazione ad angolo 31 collegate in parallelo od in serie fra due contatti di lettura.

Per ottenere un'elevata sensibilità biologica l'area attiva del sensore (coincidente con l'area

di rivelazione 31) e l'area funzionalizzata (cioè l'area occupata dalle molecole leganti disposte al disopra dei sensori) dovrebbero coincidere. La funzionalizzazione selettiva della singola area di rivelazione 31 è però estremamente difficoltosa e non adatta per la produzione in larga scala dei dispositivi; è invece più ragionevole ipotizzare un'area funzionalizzata dell'ordine di $200 \mu\text{m}^2$, nella quale possono essere raggruppate diverse unità di array quale quelle rappresentate nelle figg. 10a e 10b. Ciò tuttavia non comporta una significativa perdita di sensibilità biologica poiché l'autofocalizzazione tende a concentrare le nanoparticelle magnetiche sulle aree di rivelazione 31. Le forze tipiche ottenute con le linee di corrente utilizzate per la focalizzazione magnetica delle nanoparticelle sull'area attiva dei dispositivi sono dell'ordine di frazioni di pN, come riportato nell'articolo di Ferreira et al. [H.A. Ferreira et al., Appl. Phys. Lett. 87, 013901 (2005)]. Su questa base si può ipotizzare che l'area di cattura per il caso di nanoparticelle del diametro di 50 nm è un cerchio in cui la forza sulla nanoparticella è maggiore di 0,5 pN ad un'altezza di 200 nm (la distanza massima considerata nelle simulazioni di fi-

gura 8). Le aree di cattura così calcolate sono riportate come aree circolari grigie nelle figure 10a e 10b. Si osserva quindi che più del 75% dell'area funzionalizzata corrisponde alla vera area attiva dei sensori. Per nanoparticelle più grandi (ad esempio con un diametro di 100 nm) o per nanoparticelle con un valore maggiore di magnetizzazione di saturazione la situazione potrebbe essere ancora più favorevole e l'area di cattura potrebbe coprire interamente l'area funzionalizzata. Con ogni probabilità, ma questo risultato deve essere confermato sperimentalmente, la forza agente sulla nanoparticella è sufficientemente elevata da garantire che quest'ultima verrebbe attratta verso un'area di rivelazione 31, dove la sua presenza può essere rilevata, per qualunque posizione iniziale sull'area funzionalizzata. Inoltre, se necessario, l'intensità della forza magnetica e l'estensione dell'area di cattura possono essere regolate in molti modi differenti: (i) variando lo spessore e/o la larghezza della striscia della nanostruttura 3, oppure (ii) modificando l'angolo fra i due segmenti che definiscono l'angolo. La riduzione dello spessore comporta ad esempio un aumento della variazione del campo di transizione indotto dalla prossimi-

tà della nanoparticella magnetica (segnale magnetico), anche se tale vantaggio è accompagnato da una diminuzione delle forze magnetiche di focalizzazione.

L'intervallo dinamico degli array che impiegano le unità delle figure 10a e 10b può essere facilmente stimato. La concentrazione massima di nanoparticelle rilevabile è dell'ordine di $5 \cdot 10^8$ nanoparticelle/cm², corrispondente ad una nanoparticella in ciascuna area di rivelazione 31. Invece, se si usano 70 unità di array disposte in un'area di circa 200 µm² funzionalizzata con la stessa molecola legante, si ottiene un array in grado di rilevare solo una molecola su di esso, cioè una concentrazione dell'ordine di $5 \cdot 10^5$ nanoparticelle/cm². In termini di concentrazione di analiti questo corrisponde ad un LOD teorico dell'ordine di 0,01 pM, che è due ordini di grandezza più basso del LOD minimo ottenuto con le tecniche standard basate sulla fluorescenza.

Naturalmente, fermo restando il principio del trovato, i particolari di costruzione e le forme di attuazione potranno ampiamente variare rispetto a quanto descritto ed illustrato a puro titolo di esempio, senza uscire dall'ambito dell'invenzione.

RIVENDICAZIONI

1. Sensore per rilevare la presenza di una nanoparticella magnetica (N), detto sensore essendo disposto su un supporto (1), sul quale è inoltre disposta una pluralità di contatti non magnetici (Iin, GND, V1, V2) collegati in modo elettricamente conduttivo con il sensore, detti contatti essendo atti ad essere collegati a mezzi misuratori per misurazioni di magnetoresistenza sul sensore, caratterizzato dal fatto di includere una nanostruttura planare ferromagnetica (3), comprendente un'area di rivelazione (31) conformata a striscia piegata ad angolo, detta area di rivelazione essendo atta ad assumere selettivamente, in risposta ad un campo magnetico applicato, una prima configurazione di spin comprendente una struttura di spin a parete di dominio "testa a testa" trasversale (TW), ed una seconda configurazione di spin in cui detta struttura di spin (TW) è assente, in cui la transizione dalla prima configurazione alla seconda configurazione è prevista per un campo magnetico applicato avente una componente parallela ad uno dei lati dell'angolo dell'area di rivelazione con intensità superiore ad una soglia di transizione (H_{1x}), detta soglia di transizione essendo influenzata in modo

magneto-resistivamente rilevabile dalla prossimità di una nanoparticella magnetica (N) all'area di rivelazione.

2. Sensore secondo la rivendicazione 1, in cui la nanostruttura (3) è costituita dall'area di rivelazione (31) conformata a striscia piegata ad angolo, alle cui opposte estremità sono ricavati rispettivi dischi terminali (32).

3. Sensore secondo la rivendicazione 2, in cui detti contatti comprendono una coppia di contatti di iniezione (I_{in} , GND) disposti da capi opposti dell'area di rivelazione (31), i quali sono atti a consentire l'iniezione di una corrente elettrica attraverso l'area di rivelazione (31), ed una coppia di contatti di lettura (V_1 , V_2) disposti da capi opposti dell'area di rivelazione (31), i quali sono atti a consentire una misurazione della differenza di potenziale (V_A , V_B) fra i capi dell'area di rivelazione (31).

4. Array di sensori per la rivelazione di molecole bersaglio alle quali sono legate nanoparticelle magnetiche (N) in qualità di marcatori, detto array di sensori comprendendo un supporto (1) sul quale è disposta

una pluralità di siti di rivelazione (DS) ai

quali sono associate rispettive molecole leganti atte a legarsi selettivamente con dette molecole bersaglio, e rispettivi sensori, ciascuno dei quali essendo atto a rilevare la presenza di una nanoparticella magnetica (N) nel rispettivo sito di rivelazione (DS),

caratterizzato dal fatto che detti sensori sono costituiti da sensori secondo la rivendicazione 1.

5. Array secondo la rivendicazione 4, in cui detti sensori sono disposti in modo da formare una pluralità di catene di sensori (300) affiancate, in cui ciascuna catena di sensori è costituita da una pluralità di nanostrutture unitarie (3), ciascuna nanostruttura unitaria essendo costituita dall'area di rivelazione (31) conformata a striscia piegata ad angolo, alle cui opposte estremità sono ricavati rispettivi dischi terminali (32), dette nanostrutture unitarie essendo concatenate in modo tale che ciascuna nanostruttura unitaria condivide un disco terminale (32) con quella successiva.

6. Array secondo la rivendicazione 5, in cui detti contatti comprendono una pluralità di contatti di iniezione (I_{in} , GND; I_{1in} , GND), atti a consentire l'iniezione di una corrente elettrica attraverso

l'area di rivelazione (31) di ciascuna nanostruttura unitaria, ed una pluralità di contatti di lettura (310, 320; 410, 420), atti a consentire una misurazione della differenza di potenziale fra i capi dell'area di rivelazione (31) di ciascuna nanostruttura unitaria.

7. Array secondo la rivendicazione 6, in cui detti contatti di lettura (310, 320) sono disposti in modo tale che le aree di rivelazione (31) di nanostrutture unitarie (3) corrispondenti per posizione sulle diverse catene di sensori (300) siano collegate in parallelo, dette catene di sensori essendo collegate in parallelo ad una coppia di detti contatti di iniezione (I_{in} , GND) per permettere l'iniezione contemporanea di rispettive correnti elettriche attraverso le catene di sensori (300).

8. Array secondo la rivendicazione 6, in cui detti contatti di lettura (410, 420) sono due e sono contemporaneamente collegati con le diverse catene di sensori (300), e sono disposti in modo tale che le aree di rivelazione (31) di ciascuna catena di sensori siano collegate in serie, ciascuna catena di sensori essendo collegata ad un rispettivo contatto ($I_{i,in}$) di detti contatti di iniezione per permettere l'iniezione indipendente di una rispettiva

corrente elettrica attraverso ciascuna catena di sensori.

9. Procedimento per la rilevazione di molecole bersaglio alle quali sono legate nanoparticelle magnetiche (N) in qualità di marcatori, detto procedimento facendo uso di un array di sensori secondo una delle rivendicazioni 4 ad 8, e comprendendo le fasi seguenti:

applicare un primo campo magnetico in modo tale da ottenere detta prima configurazione di spin in ciascuna nanostruttura (3), e successivamente rimuovere detto primo campo magnetico;

distribuire un campione biologico contenente dette molecole bersaglio sopra ai siti di rivelazione (DS);

applicare un secondo campo magnetico in modo tale da commutare detta prima configurazione di spin in detta seconda configurazione di spin in ciascuna nanostruttura (3), e successivamente rimuovere detto secondo campo magnetico;

rimuovere dai siti di rivelazione (DS) le molecole bersaglio non legate chimicamente con le molecole leganti;

applicare un terzo campo magnetico in modo tale da ottenere nuovamente detta prima configurazio-

ne di spin in ciascuna nanostruttura (3), e successivamente rimuovere detto terzo campo magnetico; ed effettuare misurazioni del campo critico di transizione da detta prima configurazione di spin in detta seconda configurazione di spin mediante misure di magnetoresistenza sui sensori attraverso detta pluralità di contatti.

Fig. 1

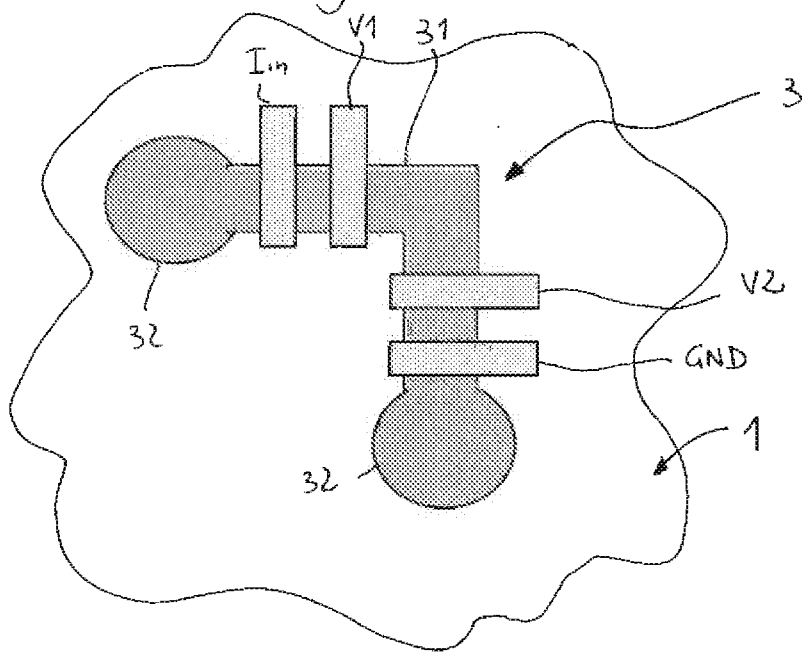


Fig. 2a

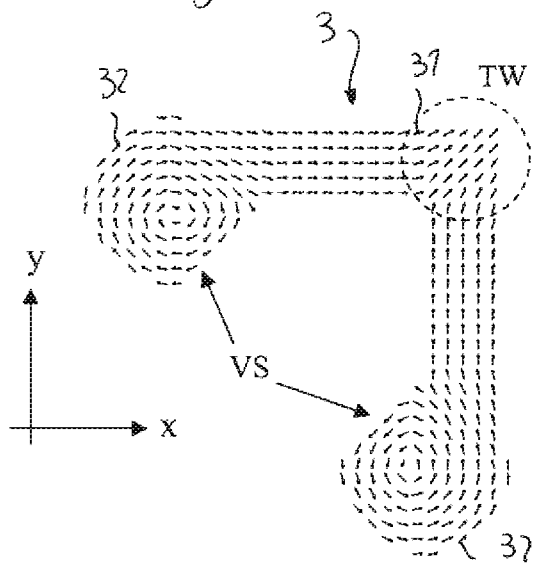


Fig. 2b

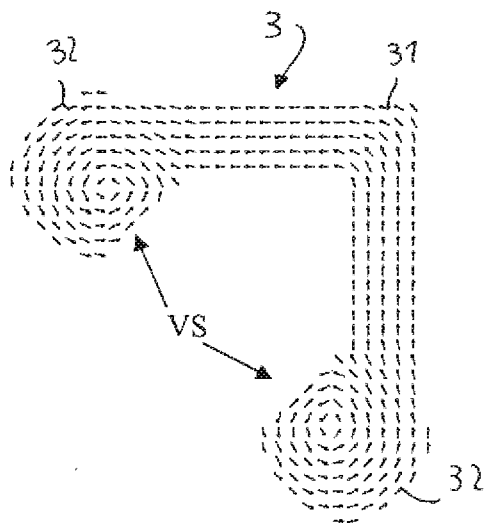


Fig. 3

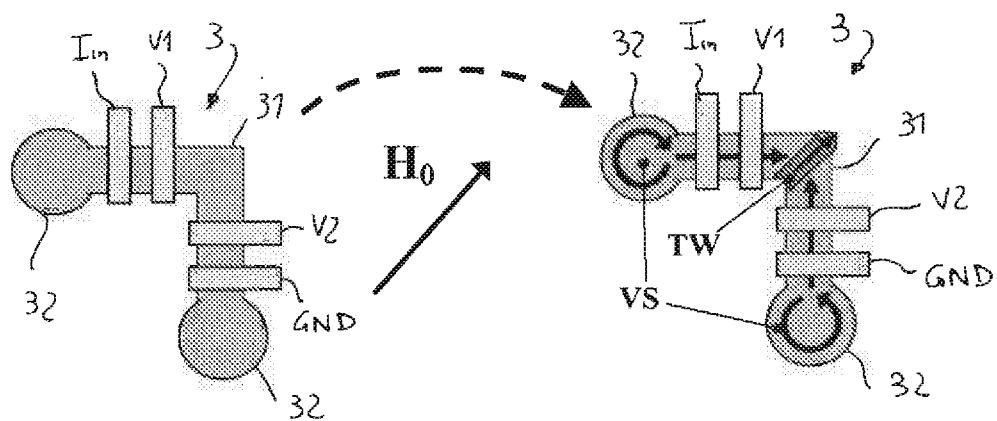


Fig. 4

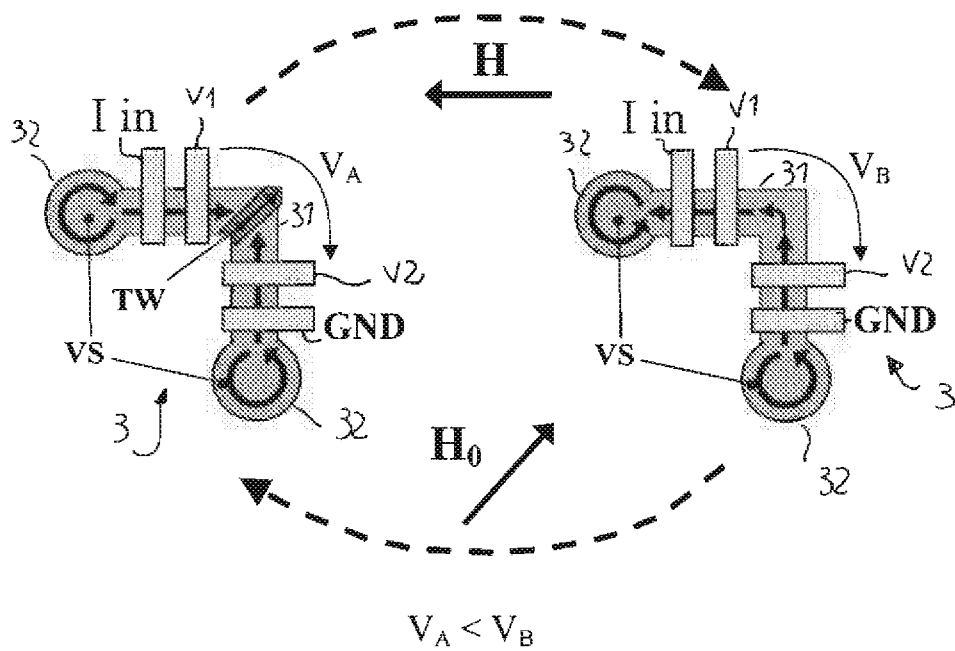


Fig. 5

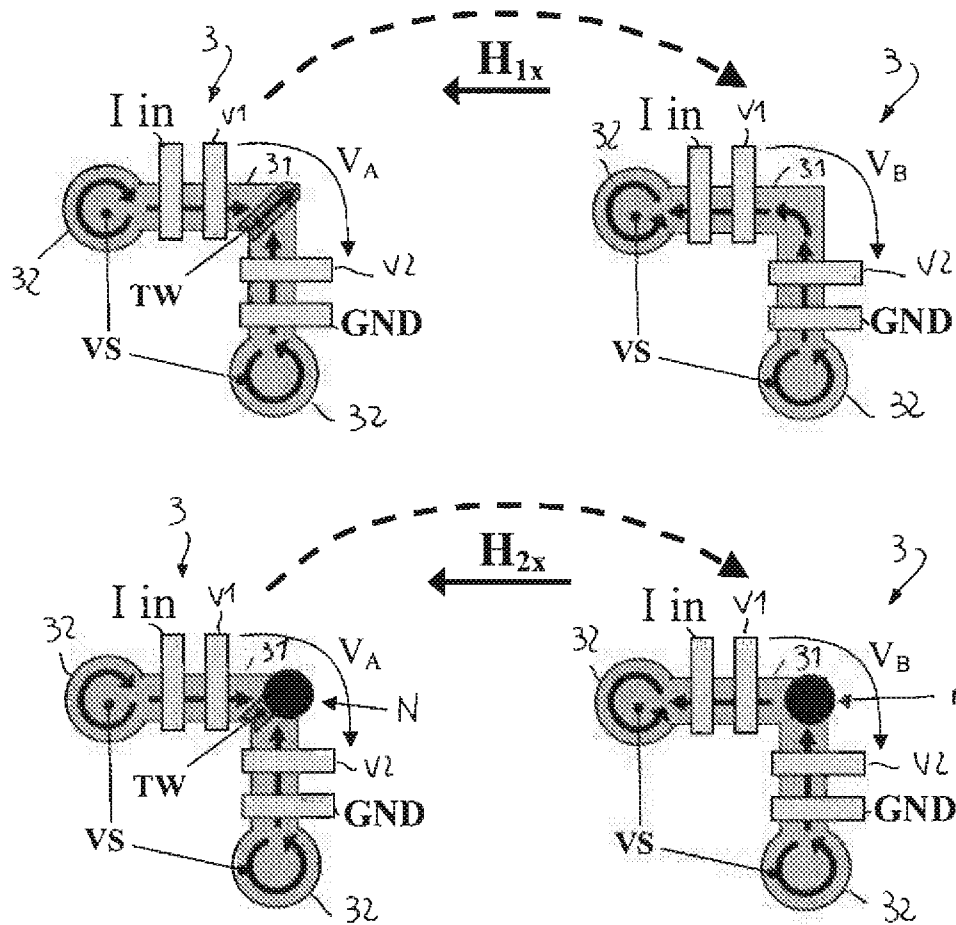


Fig. 6

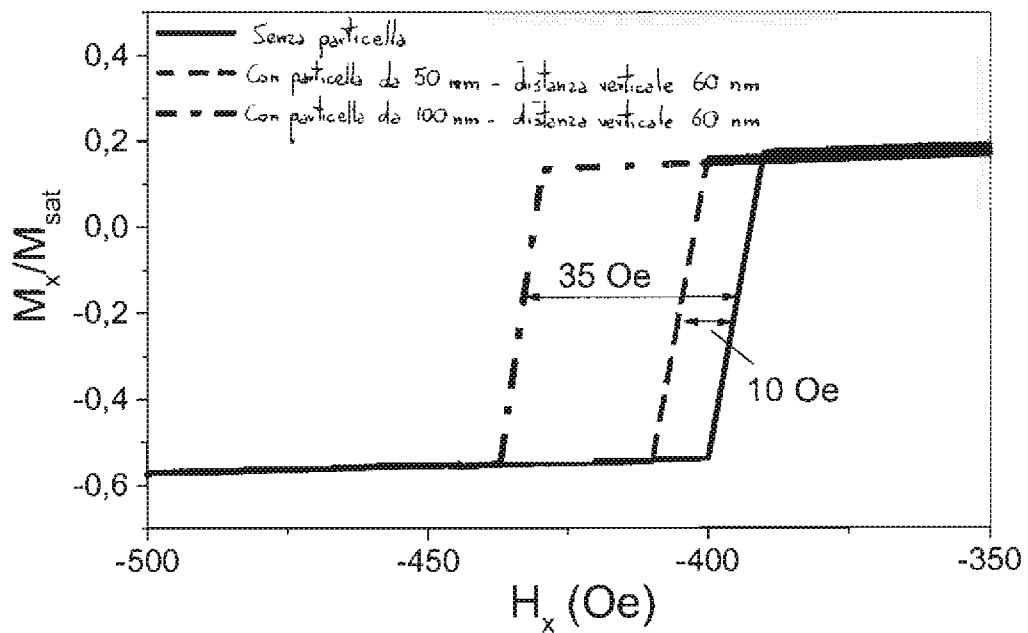


Fig. 7a

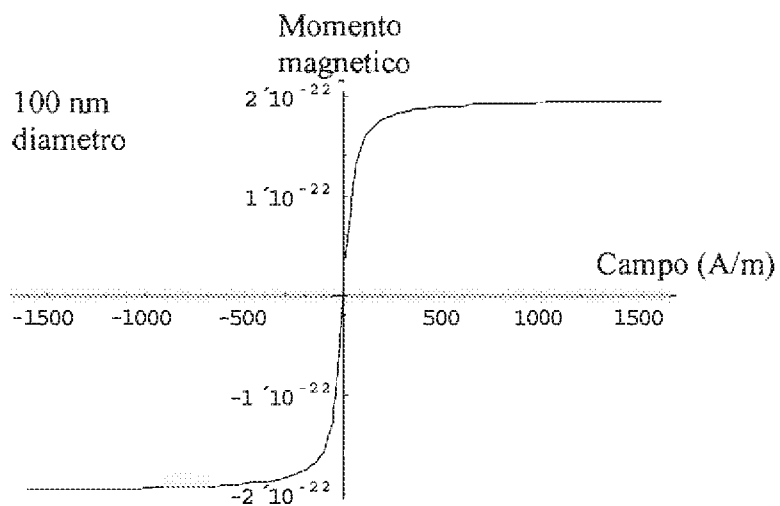
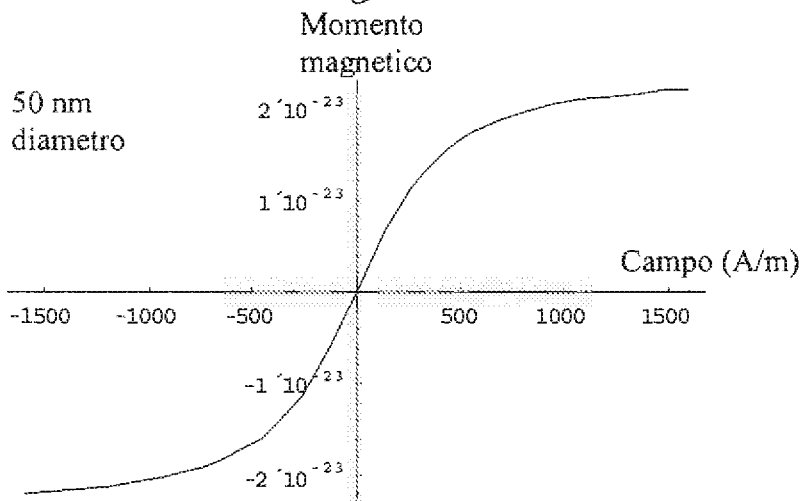


Fig. 7b

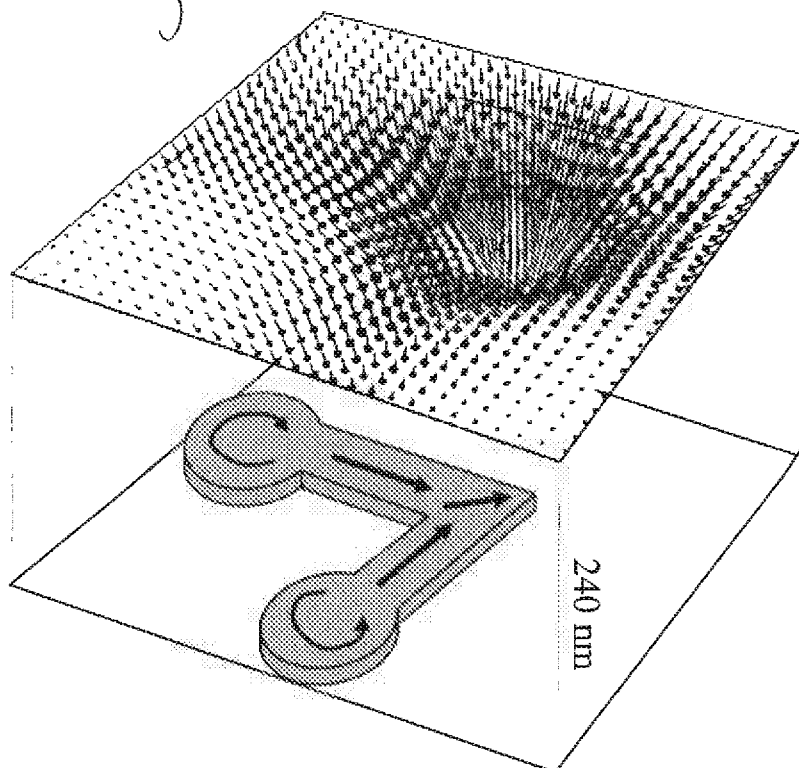


Fig. 8

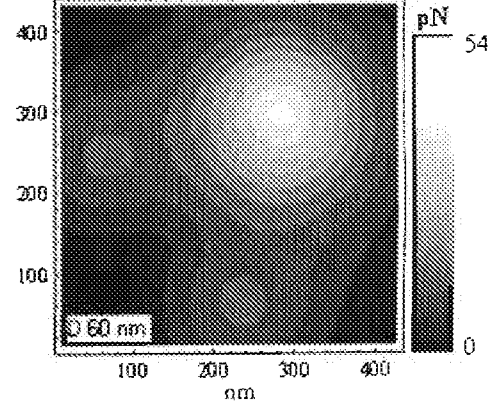
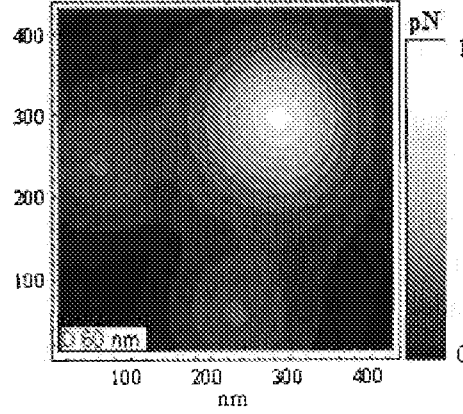
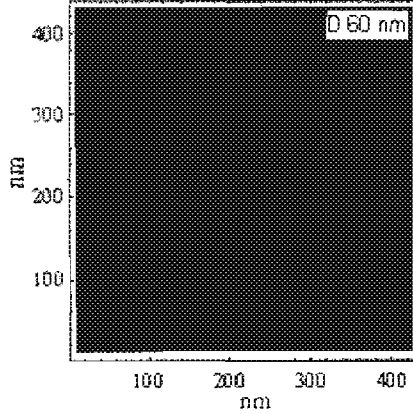
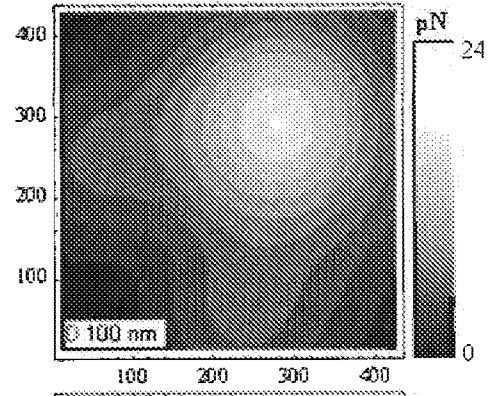
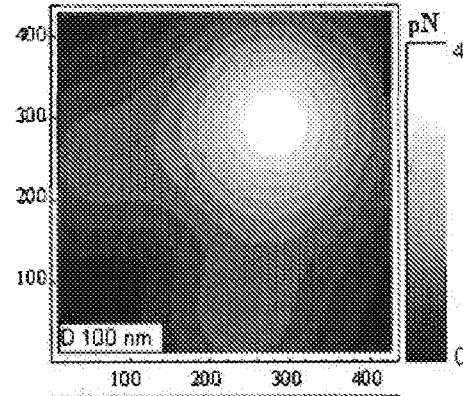
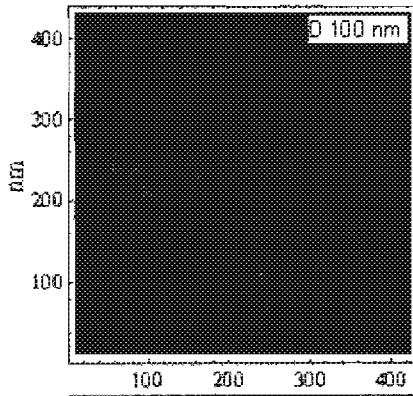
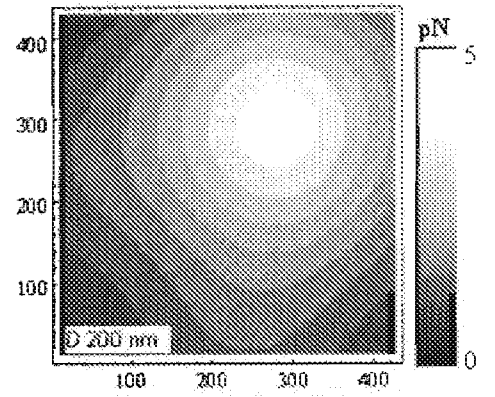
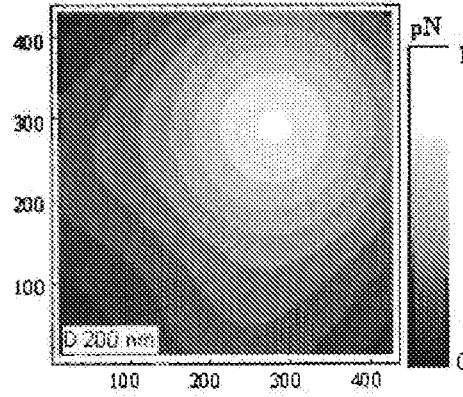
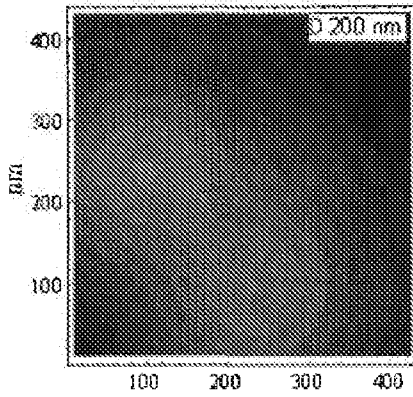
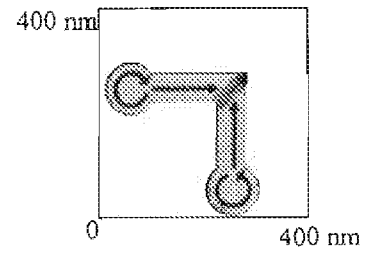
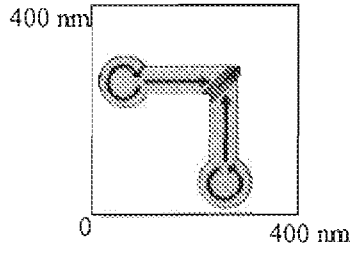
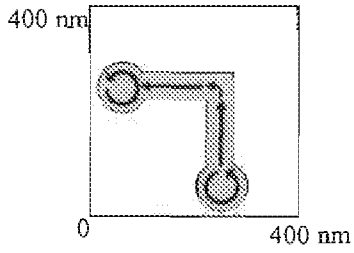
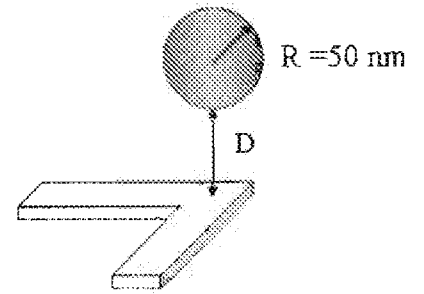
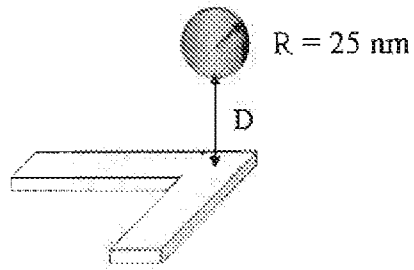


Fig. 9

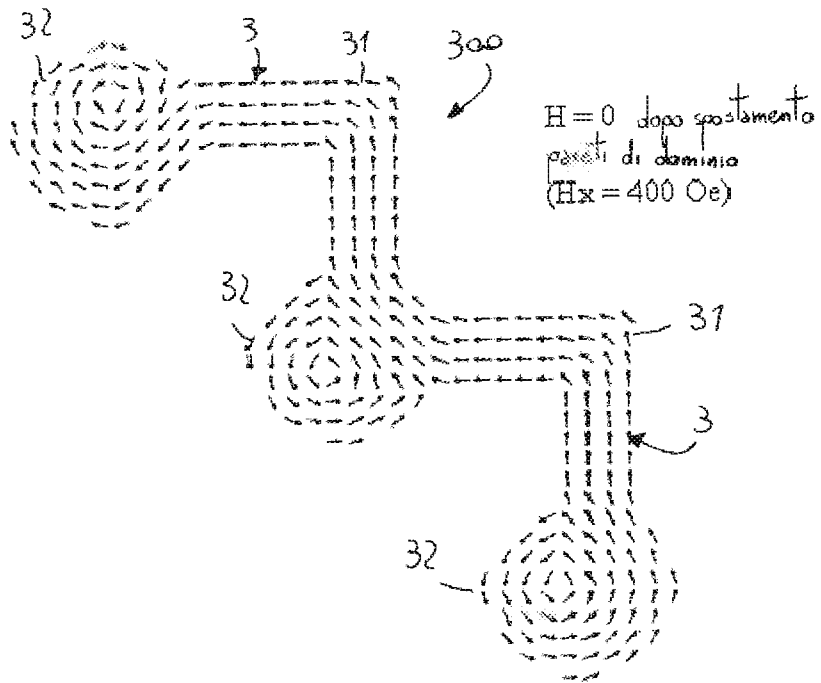
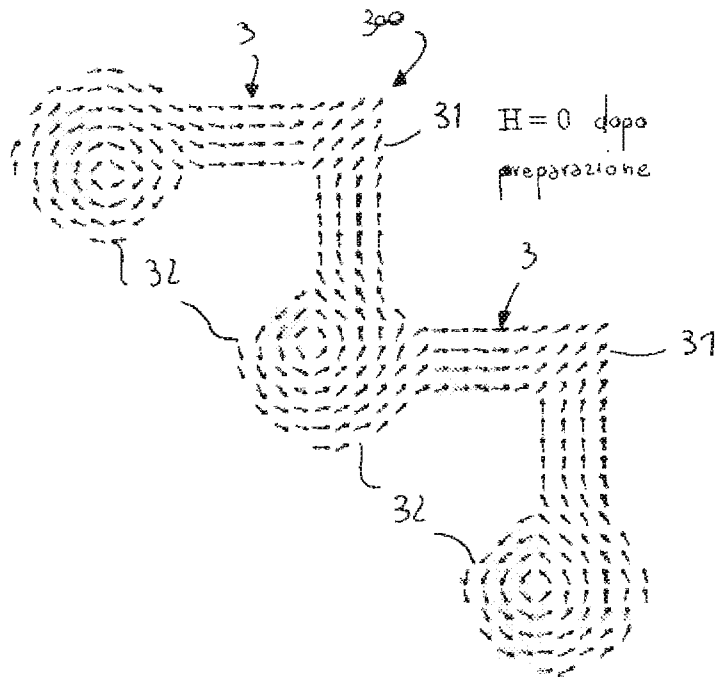


Fig. 10a

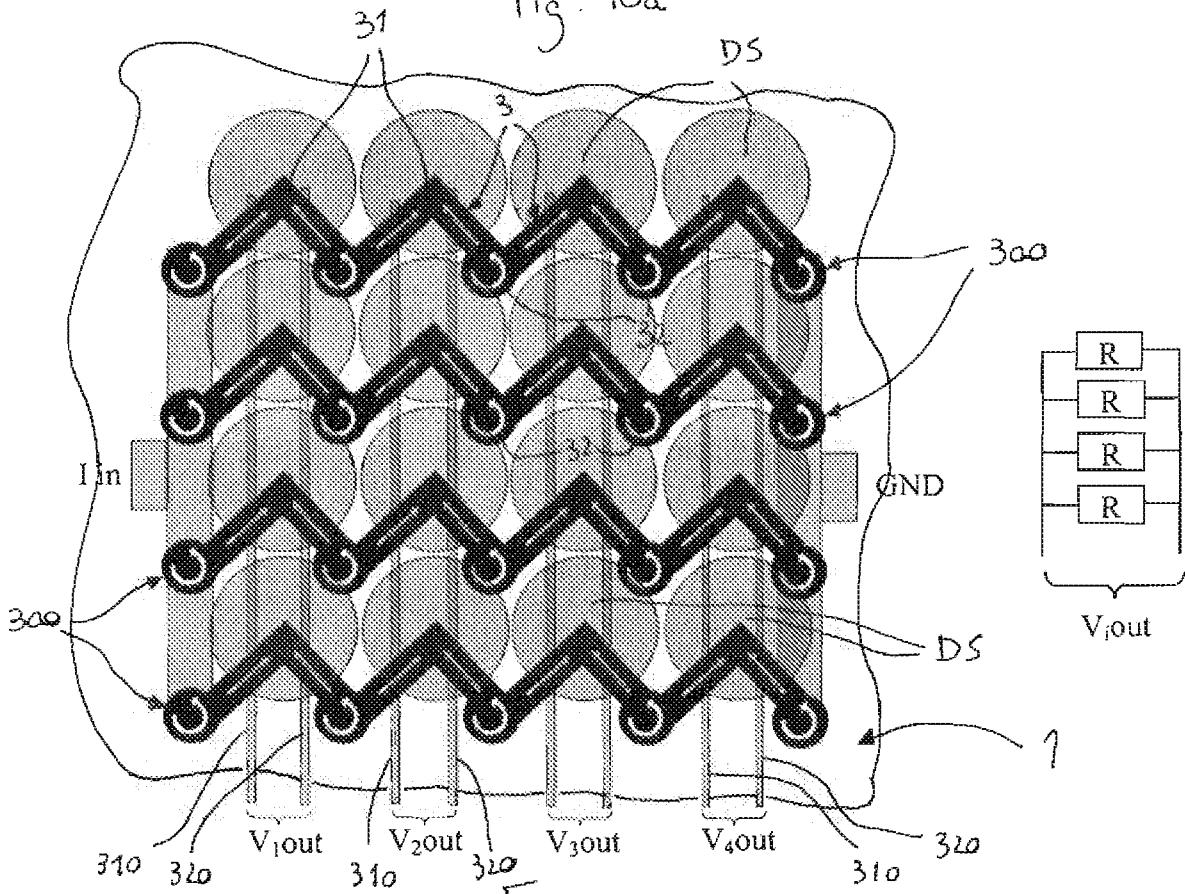


Fig. 10b

