

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

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
30 de enero de 2020 (30.01.2020)



(10) Número de publicación internacional
WO 2020/021154 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:
G01N 21/64 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2019/070533

(22) Fecha de presentación internacional:
26 de julio de 2019 (26.07.2019)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201830775 27 de julio de 2018 (27.07.2018) ES

(71) Solicitantes: **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID** [ES/ES]; Einstein 3, Ciudad Universitaria de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). **FUNDACIÓN IMDEA NANOCIENCIA** [ES/ES]; Faraday, 9, E-28049 Madrid (ES). **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS** [ES/ES]; Serrano, 117, E - 28006 Madrid (ES).

(72) Inventores: **HERNÁNDEZ JUÁREZ, Beatriz**; Avenida Francisco Tomás y Valiente 7, E-28049 Cantoblanco, Madrid (ES). **ARIAS GONZÁLEZ DE LA ALEJA, José**

Ricardo; Faraday 9, E-28049 Cantoblanco, Madrid (ES). **RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ, Héctor**; Avenida Francisco Tomás y Valiente 7, E-28049 Cantoblanco, Madrid (ES). **ACEBRÓN RODICIO, María**; Faraday 9, E-28049 Cantoblanco, Madrid (ES). **IBORRA RODRÍGUEZ, Francisco José**; Centro Nacional de Biotecnología (CNB, CSIC), Darwin 3, E-28049 Madrid (ES).

(74) Mandatario: **ABG INTELLECTUAL PROPERTY LAW, S.L.**; Avda. de Burgos, 16D, Edificio Euromor, E-28036 Madrid (ES).

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

(54) Title: METHOD FOR DETECTION OF MARKED STRUCTURES

(54) Título: MÉTODO DE DETECCIÓN DE ESTRUCTURAS MARCADAS

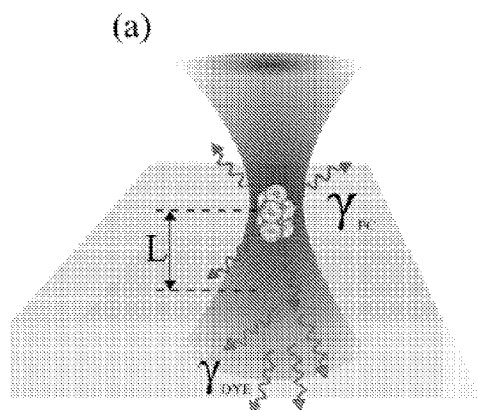


Figura 4

(57) Abstract: The present invention relates to a method for detecting marked structures, to its uses and to a device designed to carry out the method.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a un método para la detección de estructuras marcadas, a sus usos y a un aparato diseñado para llevar a cabo dicho método.

WO 2020/021154 A1

(84) **Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*
- *antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))*

DESCRIPCIÓN

MÉTODO DE DETECCIÓN DE ESTRUCTURAS MARCADAS

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para la detección de estructuras marcadas, a sus usos y a un aparato diseñado para llevar a cabo dicho método.

10 Antecedentes de la invención

La microscopía de fluorescencia es una herramienta básica para la investigación de muestras biológicas. En ella, los objetos son iluminados mediante radiación electromagnética de una determinada longitud de onda y la imagen observada es el resultado de la radiación electromagnética emitida por fluoróforos que han absorbido la excitación primaria y reemitido una luz con distinta longitud de onda. Dentro de las técnicas disponibles, son especialmente relevantes aquellas en las que la excitación tiene lugar en las ventanas biológicas del infrarrojo cercano (700-950 nm y 1000-1350 nm), en cuyo caso la profundidad de penetración en el tejido puede llegar a algunos milímetros.

En particular, la microscopía multifotónica (excitación óptica por dos o más fotones) combina dicha característica con una resolución cuyo límite es el volumen de focalización del láser por lo que se ha convertido en una de las técnicas de microscopía de fluorescencia más usadas. Sin embargo, uno de los problemas más significativos de la microscopía multifotónica es el blanqueamiento acelerado de los fluoróforos debido a los altos flujos de fotones (10^{27} - 10^{29} cm⁻².s⁻¹) a los que son sometidos [Fischer M., et al. "Fluorescence quantum yield of Rhodamine 6G in ethanol as a function of concentration using thermal lens spectrometry", vol.2614, nº 260, pp 115-118]. Este efecto, que además es irreversible, limita el uso de este tipo de microscopía a experimentos de unos minutos de duración. Asimismo, el sometimiento de especímenes biológicos a potencias ópticas elevadas puede conducir a la destrucción de las células irradiadas (fototoxicidad) [Debarre, D. et al. "Mitigating phototoxicity during multiphoton microscopy of live Drosophila embryos in the 1.0-1.2 µm wavelength range," PLoS One, vol. 9, nº 8, p.e104250, 2014].

Los puntos cuánticos (PCs) son nanopartículas luminiscentes (PL) que poseen propiedades ópticas y electrónicas diferenciadas. Por ejemplo, al ser iluminados emiten luz en una longitud de onda muy específica que depende del tamaño y de otras características de dicho punto cuántico. Estas propiedades hacen que los puntos cuánticos sean adoptados como sondas fluorescentes en biología y medicina para microscopía, detección y diagnóstico.

El documento Liu *et al.* [H. Liu, H. Maruyama, Vibration-assisted optical injection of a single fluorescent sensor into a target cell, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2015, 220, pp 40-49] describe la inyección de una sonda micrométrica (5 micras de diámetro) en una célula bajo la vibración del punto focal de unas pinzas ópticas. Se trata de una sonda compleja que comprende puntos cuánticos y que, bajo iluminación UV, cambia su potencial ζ permitiendo fijarse a la superficie de la membrana celular. Para seguir el avance de dicha sonda a través de la membrana celular que está marcada con fluoróforos, el documento de Liu *et al.* utiliza la transmisión de energía de resonancia de fluorescencia (*Fluorescence Resonance energy transfer o FRET*) que se produce entre los puntos cuánticos de la sonda y los fluoróforos de membrana. Dichos puntos cuánticos se excitan mediante radiación UV. En el documento Liu *et al.*, por tanto la observación de la membrana, tras aplicar radiación UV, esta limitada a una zona de tamaño micrométrico donde ha tenido lugar la adhesión de la sonda. Además, esta técnica puede ser invasiva puesto que el uso de esta radiación puede producir daños en las estructuras biológicas y puesto que la sonda penetra en la célula.

El mecanismo FRET contempla una transferencia de energía no radiativa entre donantes y aceptores (que pueden ser fluoróforos), mediada por interacciones entre moléculas o en general entre dipolos, limitando las distancias en las que tienen lugar. Por tanto, las técnicas basadas en FRET se encuentran limitadas por las distancias entre donante y aceptor. Por contra, en transferencias radiativas, la propagación de radiación emitida por un emisor se ve afectada por la absorción, emisión o dispersión, y por tanto, las distancias a las que ocurre pueden ser mucho mayores, ya que no dependen de interacciones inter-moleculares o inter-dipolos.

Consecuentemente, los métodos de detección de estructuras presentan problemas como baja resolución y selectividad, tiempos de medida limitados por la degradación de la vida útil de los marcadores y posible foto-toxicidad sobre la muestra, limitación en cuanto al área de estudio y modificación de las muestras. Son necesarios, por tanto,
5 nuevos métodos de detección de estructuras marcadas que solventen alguna o todas las limitaciones anteriores.

Breve descripción de la invención

10 La presente invención proporciona un nuevo método de detección de estructuras marcadas que permite el aumento tanto de selectividad y resolución de dicha detección. También, permite alargar los tiempos de medida sin dañar la muestra (debido a una reducción de la irradiancia sobre la muestra). Además, dicho método permite el estudio de distintas áreas de la muestra marcada a lo largo de una misma medida sin perturbar
15 significativamente dicha muestra ya que se trata de una técnica no invasiva.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un método de detección de estructuras marcadas que comprende las etapas de:

- i) proporcionar:
 - 20 – una estructura marcada con un marcador luminiscente, donde dicho marcador luminiscente presenta un espectro de absorción;
 - al menos una nanopartícula luminiscente (PL), donde dicha al menos una PL presenta un espectro de emisión; donde dicho espectro de emisión de dicha al menos una PL se solapa con el espectro de absorción del marcador
25 luminiscente de la etapa (i);
 - una pinza óptica, donde dicha pinza óptica comprende un láser focalizado; donde dicho láser focalizado presenta una emisión en un rango de longitudes de onda que no se solapa con el espectro de absorción del marcador luminiscente de la etapa (i);
- 30 ii) confinar y simultáneamente excitar dicha al menos una PL de la etapa (i) mediante la pinza óptica de la etapa (i) dando lugar a al menos una PL excitada y confinada;
- iii) opcionalmente desplazar la al menos una PL excitada y confinada de la etapa (ii) mediante la pinza óptica de la etapa (i); y

iv) excitar el marcador luminiscente de la etapa (i) mediante la radiación emitida por dicha al menos una PL excitada y confinada de la etapa (ii) o (iii), dando lugar a un marcador luminiscente excitado; donde dicho marcador luminiscente excitado emite una señal luminiscente.

5 Un segundo aspecto de la invención estaría dirigido al uso de un marcador luminiscente en el método de detección de estructuras marcadas de la presente invención en cualquiera de sus realizaciones particulares.

Un tercer aspecto de la invención estaría dirigido al uso de una partícula luminiscente
10 (PL) en el método de detección de estructuras marcadas de la presente invención en cualquiera de sus realizaciones particulares.

Un cuarto aspecto de la invención estaría dirigido al uso de una pinza óptica en el método de detección de estructuras marcadas de la presente invención en cualquiera de
15 sus realizaciones particulares.

Un aspecto adicional de la presente invención se encuentra dirigido a un aparato diseñado para llevar a cabo el método de detección de estructuras marcadas de la presente invención que comprende:

- 20 i) medios para atrapar y rotar la una estructura marcada de la etapa (i);
ii) la pinza óptica de la etapa (i); y
iii) un detector de la señal de la etapa (iv) del método de detección de estructuras marcadas de la presente invención en cualquiera de sus realizaciones particulares.

25

Figuras

Estas y otras características y ventajas de la invención, se pondrán más claramente de manifiesto a partir de la descripción detallada que sigue de una forma preferida de
30 realización, dada únicamente a título de ejemplo ilustrativo y no limitativo, con referencia a las figuras que se acompañan.

Figura 1: (a) Esquema de un posible sistema de excitación en cadena o de transferencia radiativa en el que una PL es excitada mediante un proceso de absorción de dos
35 fotones en el infrarrojo cercano, $2\gamma_{\text{NIR}}$, tras el que emite un fotón en el espectro visible,

γ_{VIS} , que a su vez excita a un marcador fluorescente (una molécula de colorante) que a su vez emite un fotón en el espectro visible a distinta longitud de onda del anterior, γ_{VIS} , que se detectará como una señal lumínica; (b) gráfica de intensidad de emisión/absorción frente a longitud de onda (nm) que muestra el solapamiento entre el espectro de emisión de PLs (puntos cuánticos coloidales, PCs línea continua) y el espectro de absorción de un colorante (línea discontinua).

Figura 2: Esquema experimental en el que un agregado de PCs es atrapado ópticamente y movido mediante una pinza óptica alrededor de una célula marcada. El haz laser de la pinza óptica, en el infrarrojo cercano, simultáneamente excita los PCs, cuya reemisión permite excitar a su vez las estructuras marcadas de la célula. Dicho esquema no está a escala.

Figura 3: Imágenes en transiluminación obtenidas mediante un microscopio óptico y espectros de emisión recogidos a partir de un agregado de PCs atrapado ópticamente y excitado a distintas distancias (a-d) de la superficie de una célula marcada.

Figura 4: (a) Esquema experimental en el que un agregado de PCs se encuentra atrapado ópticamente y excitado dentro de una disolución de un colorante y a una profundidad (distancia L) respecto a la superficie interior que limita la parte inferior de una cámara de microfluídica que contiene dicho colorante (el esquema no está dibujado a escala); y (b) espectros de emisión medidos al atrapar y excitar un agregado de PCs a varias distancias L (profundidades) respecto a la superficie de dicha cámara de microfluídica que sirve como contenedor de la disolución de colorante.

Figura 5: (a) Esquema del solapamiento entre el espectro de emisión de dos especies de PCs coloidales, 1 y 2, que poseen un máximo de emisión a 530 y 580 nm respectivamente (líneas continuas 1 y 2) y el espectro de absorción de un colorante (línea discontinua), dicho solapamiento viene representado como el área sombreada debajo de la curva. Espectro de emisión medido para una disolución de un colorante dentro de la cual se atrapa y excita (b) un agregado de PCs tipo 1 a distintas profundidades (distancias L) y (c) un agregado de PCs tipo 2.

Figura 6: Esquema de un dispositivo experimental que permite la detección de estructuras marcadas formado por dos láseres (L1 y L2) que son combinados mediante un cubo divisor de haz (PBS) y dirigidos por medio de espejos (M1 y M2) hacia el interior de un microscopio de fluorescencia. El haz láser combinado es reflejado en un espejo dicróico (DM) y focalizado a través de un objetivo de microscopio (O) sobre la muestra (SH). Una lámpara (WL), un sistema de retículas (I&S) y un condensador (C) conforman el sistema de iluminación del experimento. La fluorescencia procedente de la muestra es recogida a través de un filtro (F) y enviada selectivamente a un espectrómetro (S) o a una cámara (VC) mediante diversos elementos ópticos (FL, lente de focalización; M3, espejo; P, prisma; RL1 y RL2, lentes de retransmisión).

Descripción detallada de la invención

A no ser que sea dicho lo contrario, todos los términos científicos aquí utilizados tienen el significado que es comúnmente entendido por el experto en la materia al que va dirigida esta descripción. En la presente invención, las formas singulares incluyen las formas plurales a menos que se indique lo contrario. En particular, los pronombres determinados (el, la, lo) o indeterminados (un, uno, una) singulares no limitan a un número cardinal y pueden referirse a más de un elemento (por ejemplo, a uno, dos, tres o más). Esto es particularmente relevante en la presente invención al referirse por ejemplo a “una estructura marcada”, “un marcador luminiscente”, “una pinza óptica” y “un láser focalizado”.

El objeto principal de la presente invención es proporcionar un método de detección de estructuras marcadas que comprende las etapas de:

- i) proporcionar:
 - una estructura marcada con un marcador luminiscente, donde dicho marcador luminiscente presenta un espectro de absorción;
 - al menos una nanopartícula luminiscente (PL), donde dicha al menos una PL presenta un espectro de emisión; donde dicho espectro de emisión de dicha al menos una PL se solapa con el espectro de absorción del marcador luminiscente de la etapa (i);
 - una pinza óptica, donde dicha pinza óptica comprende un láser focalizado; donde dicho un láser focalizado presenta una emisión en un rango de

- longitudes de onda que no se solapa con el espectro de absorción del marcador luminiscente de la etapa (i);
- ii) confinar y simultáneamente excitar dicha al menos una PL de la etapa (i) mediante la pinza óptica de la etapa (i) dando lugar a al menos una PL excitada y confinada;
- 5 iii) opcionalmente desplazar la al menos una PL excitada y confinada de la etapa (ii) mediante la pinza óptica de la etapa (i); y
- iv) excitar el marcador luminiscente de la etapa (i) mediante la radiación emitida por dicha al menos una PL excitada y confinada de la etapa (ii) o (iii), dando lugar al
- 10 marcador luminiscente de la etapa (i) excitado; donde dicho marcador luminiscente excitado emite una señal luminiscente.

Etapa (i)

- 15 El método de detección de estructuras marcadas de la presente invención comprende la etapa (i) de proporcionar:
- una estructura marcada con un marcador luminiscente, donde dicho marcador luminiscente presenta un espectro de absorción;
 - al menos una nanopartícula luminiscente (PL), donde dicha al menos una PL

20 presenta un espectro de emisión; donde dicho espectro de emisión de dicha al menos una PL se solapa con el espectro de absorción del marcador luminiscente de la etapa (i); y

 - una pinza óptica, donde dicha pinza óptica comprende un láser focalizado; donde dicho láser focalizado presenta una emisión en un rango de longitudes

25 de onda que no se solapa con el espectro de absorción del marcador luminiscente de la etapa (i).

En el contexto de la presente invención, el término “estructura marcada” o “estructuras marcadas” se refiere a una estructura que comprende uno o varios marcadores

30 luminiscentes; dicha estructura puede estar presente en especímenes biológicos y no biológicos. Cuando dicha estructura se encuentra presente en especímenes biológicos, puede estar marcada por cualquiera de los marcadores luminiscentes habitualmente utilizados para el marcado biológico y conocidos por el experto en la materia. En una realización particular, dicha estructura marcada puede ser una célula o parte de una

célula como por ejemplo una membrana celular. Como ejemplo no limitativo, dicha estructura marcada puede ser una célula Jurkat-T impermeabilizada cuyas proteínas han sido inespecíficamente marcadas con un colorante fluorescente como por ejemplo Alexa Fluor® 546.

5

En el contexto de la presente invención, el término "luminiscencia" caracteriza la propiedad de un material de absorber energía (por ejemplo, en forma de una radiación electromagnética, compuesta por fotones) que, a continuación, emite en forma de radiación electromagnética.

10

En el contexto de la presente invención, el término "marcador luminiscente" se refiere a un material, por ejemplo un grupo funcional, compuesto o composición química, que es capaz de absorber energía en forma de radiación electromagnética en un determinado rango de longitudes de onda y de volver a emitir radiación electromagnética en otro

15 rango de longitudes de onda diferente; por tanto, se caracteriza por poseer un espectro de absorción y un espectro de emisión característico. Ejemplos no limitativos de marcadores luminiscentes son marcadores fluorescentes, marcadores fosforescentes o combinaciones de los mismos. Preferiblemente, el marcador luminiscente de la presente invención se selecciona entre fluoróforos, cromóforos y combinaciones de los anteriores.

20

En el contexto de la presente invención, el término "marcador fluorescente" es sinónimo de fluorocromo, es decir, de un material, un grupo funcional, compuesto o composición química, que es capaz de absorber energía en forma de radiación electromagnética en un determinado rango de longitudes de onda y de emitir radiación electromagnética en

25

otro rango de longitudes de onda mayor que el primero (es decir con menor energía). Ejemplos no limitativos de fluorocromos adecuados para su uso en la presente invención son cualquiera de los fluorocromos conocidos por el experto en la materia, por ejemplo los que aparecen en la base de datos de la página web

<http://www.fluorophores.tugraz.at/substance/> a fecha 19 de Julio de 2018

30

[Fluorophores.org is a user-driven platform for fluorescent dye data initiated by the Applied Sensor Group of the Institute of Analytical Chemistry at the Graz University of Technology in Austria]. Preferiblemente fluorocromos seleccionados de: fluoresceína y sus derivados como la 5-carboxifluoresceína, 6-carboxifluoresceína, ácido 6-(fluoresceína)-5-(y 6)-carboxamida-hexanoico e isotiocianato de fluoresceína; colorantes

AlexaFluor® y sus derivados como AlexaFluor 488®, Alexa Fluor® 546 o AlexaFluor 594®; colorantes de cianina como Dy2, Cy3, Cy5, Cy7; cumarina opcionalmente sustituida; R-ficoeritrina, aloficoeritrina y sus derivados; rodamina, tetra-metil-rodamina, rodamina 6G y sus derivados; Princeton Red; conjugados de R-ficoeritrina; miembros
5 de las ficoliproteínas y puntos cuánticos.

En una realización más particular, el marcador luminiscente de la etapa (i) es un marcador fluorescente; preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en AlexaFluor®, rodamina y sus derivados; preferiblemente es un marcador fluorescente
10 seleccionado de Alexa Fluor® 546, tetra-metil-rodamina y rodamina 6G.

En una realización particular, el marcador luminiscente de la etapa (i) presenta un espectro de absorción; donde dicho espectro de absorción del marcador luminiscente de la etapa (i) se solapa con el espectro de emisión de dicha al menos una PL.;
15 preferiblemente se solapa al menos en un 10% del rango; preferiblemente en un 60% del rango de longitudes de onda del espectro de emisión de dicha al menos una PL; más preferiblemente se solapa en un rango de longitudes de onda del 80%.

En una realización particular el marcador luminiscente de la invención, presenta un espectro de absorción y un espectro de emisión; preferiblemente presenta un espectro
20 de absorción y un espectro de emisión, en particular dicho marcador se puede excitar y, una vez en estado excitado, emitir una señal luminiscente.

Como ejemplo no limitativo, el marcador luminiscente Alexa Fluor® 546 es un marcador fluorescente cuyo máximo de absorción de su espectro de absorción se encuentra en
25 torno a los 546 nm y cuyo máximo de emisión del espectro de emisión se encuentra en torno a 573 nm (color naranja visto a través de un microscopio de fluorescencia convencional) y cuyo coeficiente de extinción es de 104000 al máximo de emisión en $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$. Por ejemplo, el marcador Alexa Fluor® 546 excitado da lugar a una señal luminiscente con un máximo centrado en torno a los 573 nm

30

En el contexto de la presente invención, la expresión “espectro de absorción” se refiere a la intensidad de radiación electromagnética incidente que un material absorbe en un rango de longitudes de onda determinado.

En el contexto de la presente invención, la expresión “espectro de emisión” se refiere a la intensidad de radiación electromagnética que un material emite en un rango de longitudes de onda determinado.

- 5 En una realización particular, la una estructura marcada con un marcador luminiscente de la etapa (i) y la al menos una nanopartícula luminiscente (PL) se encuentran en un medio líquido; preferiblemente en un medio acuoso u orgánico; más preferiblemente en un medio acuoso; aún más preferiblemente en un tampón fosfato salino (PBS). En una realización más particular, el medio líquido es un medio de cultivo.

10

En una realización particular, la una estructura marcada con el marcador luminiscente de la etapa (i) y la al menos una nanopartícula luminiscente (PL) se encuentran en una cámara de microfluídica; preferiblemente en una cámara de microfluídica transparente en el espectro visible e infrarrojo cercano.

15

En una realización particular, la una estructura marcada de la etapa (i) está presente en especímenes biológicos y no biológicos; preferiblemente en especímenes biológicos; más preferiblemente en células. Ejemplos no limitativos de células adecuadas para la presente invención son linfocitos T, HL60, Jurkat, macrófagos, HeLa (en suspensión),

- 20 también células adherentes como HeLa, fibroblastos, MFC7, etc.

En una realización aún más particular, la una estructura marcada de la etapa (i) es una proteína marcada en una célula; preferiblemente una proteína marcada inespecíficamente o específicamente en una célula; más preferiblemente una proteína

- 25 marcada específicamente; aún más preferiblemente una proteína marcada específicamente con un marcador luminiscente.

- En el contexto de la presente invención, la expresión “nanopartícula luminiscente (PL)” se refiere a una partícula que comprende por lo menos una de sus dimensiones en un
- 30 rango de tamaños igual o inferior a 100 nm; que es capaz de absorber energía en forma de radiación electromagnética en un determinado rango de longitudes de onda y de volver emitir radiación electromagnética en otro rango de longitudes de onda diferente y que presenta un espectro de emisión. En el contexto de la presente invención se debe entender que el término “nanopartícula luminiscente (PL)” o “nanopartículas

luminiscentes (PLs)” a lo largo de la descripción y las reivindicaciones también incluye los significados más específicos de “nanopartícula fotoluminiscente (PF)” o “nanopartículas fotoluminiscentes (PFs) y también de “punto cuántico (PC)” o “puntos cuánticos (PCs)”.

5

En una realización particular, la al menos una partícula luminiscente de la etapa (i) es al menos una nanopartícula fotoluminiscente o al menos un punto cuántico (PC); preferiblemente al menos un punto cuántico (PC); más preferiblemente es un agregado de puntos cuánticos (PCs).

10

En el contexto de la presente invención, la expresión “nanopartículas fotoluminiscentes” se refieren a nanopartículas de naturaleza orgánica o inorgánica capaces de absorber energía en forma de radiación electromagnética en un determinado rango de longitudes de onda y de volver emitir radiación electromagnética en otro rango de longitudes de

15 onda diferente (mayores o menores longitudes de onda; preferiblemente mayores). Ejemplos no limitativos de nanopartículas fotoluminiscentes son nanopartículas de naturaleza inorgánicas como sulfatos, fosfatos y fluoruros dopados con iones de tierras raras, partículas de sulfuros o seleniuros de Ag; puntos cuánticos; nanodiamantes; nanopartículas de carbono (carbon quantum dots); y nanopartículas de naturaleza
20 orgánica como partículas poliméricas dopadas con colorantes; preferiblemente nanopartículas de naturaleza inorgánica.

Ejemplos no limitativos de nanopartículas fotoluminiscentes son nanopartículas de naturaleza inorgánica dopadas con iones metálicos luminiscentes, preferiblemente como
25 iones lantánidos.

Las nanopartículas de naturaleza inorgánica comprendidas en las nanopartículas fotoluminiscentes se pueden seleccionar entre sulfatos, fosfatos y fluoruros conocidos dependiendo del dopante a incorporar. Puesto que la mayoría de dopantes
30 fotoluminiscentes son iones metálicos di- o trivalentes, se prefiere usar sulfatos, fosfatos o fluoruros de átomos de metales di- o trivalentes no luminiscentes tales como los metales del grupo 2 (metales alcalinotérreos, tales como Mg, Ca, Sr, o Ba), o del grupo 3 (Sc, Y o La) o del grupo 13 (por ejemplo, Al, Ga, In o Tl) o Zn.

Respecto al tipo de iones metálicos fotoluminiscentes a incorporar como dopantes comprendidos en las nanopartículas fotoluminiscentes, no hay restricciones específicas mientras éstos sean capaces de convertir los fotones absorbidos en radiación luminiscente. Preferiblemente como iones metálicos dopantes de las sales inorgánicas dopadas con iones metálicos luminiscentes se utilizan iones lantánidos. El ión(es) lantánido dopante se puede seleccionar de manera conveniente entre Ce (elemento número 58), Pr (59), Nd (60), Sm (62), Eu (63), Gd (64), Tb (65), Dy (66), Ho (67), Er (68), Tm (69), o Yb (70); preferiblemente entre Yb (70), Er (68), Tm (69) o Nd (60). En una realización particular, los dopantes preferidos son el Er^{3+} , Nd^{3+} y Yb^{3+} .

10

En el contexto de la presente invención, la expresión “punto cuántico (PC)” o “puntos cuánticos (PCs)” se refiere a partículas semiconductoras cristalinas que presentan propiedades ópticas sintonizables con el tamaño de la partícula. Comprenden elementos pertenecientes a los grupos II-VI, III-V, o IV-VI de la tabla periódica.

15

En una realización particular, la al menos una partícula luminiscente (PL) de la etapa (i) es al menos un punto cuántico (PC), preferiblemente un al menos un punto cuántico (PC) que comprende elementos pertenecientes a los grupos de la tabla periódica II-VI, II-V, o IV-VI; más preferiblemente un al menos un punto cuántico (PC) que comprende compuestos seleccionados de arseniuro de indio (InAs), fosfuro de indio (InP), sulfuro de cadmio (CdS), seleniuro de cadmio (CdSe), telurio de cadmio (CdTe), sulfuro de plomo (PbS), seleniuro de plomo (PbSe), telurio de plomo (PbTe), sulfuro de zinc (ZnS), seleniuro de zinc (ZnSe), CdSeZnS , CuInSe , Cd_3As_2 , Cd_3P_2 , C, así como mezclas de los estos compuestos.

25

En una realización particular el al menos un punto cuántico (PC) de la presente invención presenta una configuración núcleo corteza (*core-shell*), núcleo-corteza-corteza (*core-shell-shell*), una configuración con elementos aleados o una configuración en forma de “giant quantum dots”; preferiblemente una configuración núcleo corteza (*core-shell*) o núcleo-corteza-corteza (*core-shell-shell*). En el contexto de la presente invención el término “*giant quantum dot*” se refiere a sistemas núcleo-corteza donde la corteza es de un espesor mayor a 10 capas atómicas de material.

30

En una realización particular, la al menos una partícula luminiscente de la etapa (i) es un

agregado de puntos cuánticos (PCs); particularmente un agregado de puntos cuánticos (PCs) de CdSeZnS; preferiblemente un agregado de puntos cuánticos (PCs) de CdSeZnS recubiertos; más preferiblemente un agregado de puntos cuánticos (PCs) de CdSeZnS recubierto de SiO₂. En una realización aún más particular el agregado de puntos cuánticos comprende entre 2 y 10000 puntos cuánticos; preferiblemente entre 2 y 1000 puntos cuánticos.

En una realización particular, la al menos una partícula luminiscente de la etapa (i) está funcionalizada; preferiblemente comprende ligandos en su superficie; más preferiblemente comprende grupos funcionales en su superficie.

En una realización particular, la al menos una partícula luminiscente de la etapa (i) está encapsulada en una matriz; preferiblemente una matriz inorgánica; más preferiblemente en una matriz inorgánica formada por óxidos inorgánicos; aún más preferiblemente seleccionada de alúmina, óxido de silicio (SiO₂), óxido de titanio y combinaciones de los mismos; aún más preferiblemente óxido de silicio (SiO₂).

En una realización particular, la al menos una partícula luminiscente de la etapa (i) es al menos un punto cuántico (PC) encapsulado en una matriz inorgánica; preferiblemente al menos un punto cuántico (PC) de CdSeZnS encapsulado en SiO₂.

Los autores de la presente invención han observado que, sin estar vinculado a una teoría en particular, al utilizar puntos cuánticos encapsulados en una matriz se reduce el efecto de blanqueo de dichos puntos cuánticos, aumentando la estabilidad de emisión. Además, se ha observado que el encapsulado aumenta la biocompatibilidad de dichos puntos cuánticos y los hace dispersables en medios polares. Finalmente, el encapsulado o la matriz que recubre los puntos cuánticos o sus agregados favorecen las transferencias de energía radiativas frente a las no radiativas.

La al menos una nanopartícula luminiscente (PL) del método de detección de estructuras marcadas de la presente invención presenta un espectro de emisión; donde dicho espectro de emisión de dicha al menos una PL se solapa con el espectro de absorción del marcador luminiscente del método de detección de la presente invención. En una realización particular dichos espectros se solapan en al menos un 10% de sus

longitudes de onda; preferiblemente en al menos un 20%; más preferiblemente en al menos un 30%; aún más preferiblemente en al menos un 40%. En una realización particular el máximo del espectro de emisión de dicha al menos una PL se solapa con el máximo del espectro de absorción del marcador luminiscente del método de detección de la presente invención.

La pinza óptica del método de detección de estructuras marcadas de la presente invención comprende un láser focalizado; donde dicho un láser focalizado presenta una emisión en un rango de longitudes de onda que no se solapa con el espectro de absorción del marcador luminiscente de la etapa (i). Es decir, la pinza óptica del método de detección de estructuras marcadas de la presente invención no es capaz de provocar la emisión de luminiscencia del -marcador luminiscente de la presente invención. En una realización particular, la pinza óptica del método de detección de la presente invención no es capaz de excitar al marcador luminiscente de la etapa (i).

15

En el contexto de la presente invención, la expresión "pinza óptica" es sinónima de la expresión "trampa óptica" tal y como conoce el experto en la materia y se refiere a un láser focalizado que genera una fuerza atractiva sobre objetos dieléctricos, lo cual permite atrapar, confinar o sostener una partícula y moverla o desplazarla físicamente [Ashkin A, Dziedzic JM, Bjorkholm JE, Chu S (1986). "Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles". Opt. Lett. 11 (5): 288–290]. En particular, dicha partícula puede ser al menos una nanopartícula luminiscente (PL) o al menos un punto cuántico. Dicha pinza óptica puede formarse, alternativamente, combinando dos haces láser que viajan en direcciones contrarias (contrapropagantes) en un foco común tal como se describe, por ejemplo, en el artículo [Smith S.B., Cui Y., Bustamante C. Optical-trap force transducer that operates by direct measurement of light momentum. Methods Enzymol. 2003;361:134–162].

En una realización particular, el láser focalizado de la pinza óptica de la etapa (i) de la presente invención presenta una emisión monocromática en un rango de longitudes de onda que no se solapa con el espectro de absorción del marcador luminiscente de la etapa (i). En una realización más particular, el láser focalizado de la pinza óptica de la etapa (i) de la presente invención, no es capaz de generar luminiscencia del marcador mediante ningún proceso óptico. En una realización particular, el rango de longitudes de

onda de la emisión del laser focalizado de la pinza óptica de la invención no se encuentra comprendido en el espectro de absorción del marcador luminiscente.

En una realización particular, la pinza óptica de la etapa (i) comprende un haz láser
5 focalizado monocromático.

En una realización particular, la pinza óptica de la etapa (i) comprende un haz láser monocromático, monomodo, continuo y focalizado; preferiblemente un haz láser de diodo monocromático, monomodo, continuo y focalizado.
10

En una realización particular, la pinza óptica de la etapa (i) comprende un haz láser de femtosegundo.

En una realización preferida, la pinza óptica de la etapa (i) comprende un láser de
15 régimen continuo.

En una realización preferida, la pinza óptica de la etapa (i) comprende un láser altamente focalizado; preferiblemente altamente focalizado mediante un objetivo de alta apertura numérica.
20

En una realización particular, la pinza óptica de la etapa (i) tiene una potencia entre 300 y 100 mW; preferiblemente entre 200 mW y 120 mW; más preferiblemente de 150 mW.

En una realización particular, la pinza óptica de la etapa (i) presenta una longitud de
25 onda que se encuentra en un rango entre 650 nm y 950 nm; preferiblemente entre 700 y 900 nm; más preferiblemente entre 750 y 850 nm; más preferiblemente de 845 nm. En una realización más particular, la pinza óptica de la etapa (i) presenta una emisión en un rango de longitudes de onda comprendidas entre 650-950 nm que excita a dicha al menos una PL.

30 En una realización particular, la pinza óptica de la etapa (i) comprende un flujo de fotones de entre $10^{20} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y $10^{26} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Los autores de la presente invención han observado que, sin estar vinculado a una

teoría en particular, el hecho de que la pinza óptica del método de detección de estructuras marcadas de la presente invención no sea capaz de excitar al marcador luminiscente de la presente invención permite aumentar la selectividad del método y evitar la degradación de dichos marcadores.

5

Etapas (ii)

El método de detección de estructuras marcadas de la presente invención comprende la etapa (ii) de confinar y simultáneamente excitar dicha al menos una nanopartícula luminiscente (PL) de la etapa (i) mediante la pinza óptica de la etapa (i) dando lugar a al menos una nanopartícula luminiscente (PL) excitada y confinada.

En el contexto de la presente invención, la expresión “confinada” en relación a la nanopartícula luminiscente de la presente invención de las etapas (ii), (iii) y (iv) se refiere al estado en el que la nanopartícula luminiscente de la presente invención se encuentra “atrapada” en el láser focalizado de la pinza óptica tal y como sería conocido por un experto en la materia. Particularmente, el confinamiento de la nanopartícula luminiscente permite desplazar dicha partícula al desplazar dicho haz focalizado.

En el contexto de la presente invención, la expresión “excitada” en relación a una partícula luminiscente de la presente invención de las etapas (ii), (iii) y (iv), se refiere un estado excitado debido a su interacción con la radiación electromagnética del láser focalizado de la pinza óptica tal y como sería conocido por un experto en la materia.

En una realización particular, la excitación de la al menos una PL de la etapa (ii) se produce mediante absorción del láser focalizado comprendido en la pinza óptica de la etapa (i) y la al menos una PL de la etapa (i); preferiblemente mediante un mecanismo de absorción de dos fotones entre el láser focalizado comprendido en la pinza óptica de la etapa (i) y la al menos una PL de la etapa (i); más preferiblemente mediante un mecanismo de absorción de dos fotones entre el láser monocromático, monomodo, continuo y focalizado comprendido en la pinza óptica de la etapa (i) y la al menos una PL de la etapa (i).

En una realización particular, la excitación de la al menos una PL de la etapa (ii) se

produce por un mecanismo de excitación a un fotón o multifotónico; preferiblemente multifotónico; más preferiblemente por un mecanismo de absorción de dos fotones.

En el contexto de la presente invención, la expresión “mecanismo de absorción de dos
5 fotones” se refiere a un mecanismo en el que una partícula luminiscente, como por
ejemplo, un punto cuántico o un agregado de puntos cuánticos, es capaz de absorber
energía en forma de fotones o de radiación electromagnética en un determinado rango
de longitudes de onda de una determinada energía y de volver emitir radiación
10 de los fotones individuales tal y como es conocido para un experto en la materia. Es
decir, una partícula luminiscente es capaz de absorber dos fotones de baja energía
resultando en la emisión de un fotón de mayor energía que cualquiera de los fotones
absorbidos inicialmente. Para determinados tipos de partículas luminiscentes es
típicamente requerido un alto flujo de fotones como el que se produce en una radiación
15 laser para que se produzcan este tipo de mecanismos.

Etapas (iii)

El método de detección de estructuras marcadas de la presente invención comprende
20 opcionalmente la etapa (iii) de desplazar la al menos una PL excitada y confinada de la
etapa (ii) mediante la pinza óptica de la etapa (i).

En una realización particular, la presente invención se encuentra dirigida a un método de
detección de estructuras marcadas que comprende las etapas de:

- 25 i) proporcionar:
- una estructura marcada con un marcador luminiscente, donde dicho marcador luminiscente presenta un espectro de absorción;
 - al menos una nanopartícula luminiscente (PL), donde dicha al menos una PL presenta un espectro de emisión; donde dicho espectro de
30 emisión de dicha al menos una PL se solapa con el espectro de absorción del marcador luminiscente de la etapa (i);
- ii) una pinza óptica, donde dicha pinza óptica comprende un láser focalizado; donde dicho un láser focalizado presenta una emisión en un rango de longitudes de onda que no se solapa con el espectro de

- absorción del marcador luminiscente de la etapa (i); confinar y simultáneamente excitar dicha al menos una PL de la etapa (i) mediante la pinza óptica de la etapa (i) dando lugar a al menos una PL excitada y confinada;
- 5 iii) desplazar la al menos una PL excitada y confinada de la etapa (ii) mediante la pinza óptica de la etapa (i); y
- iv) excitar el marcador luminiscente de la etapa (i) mediante la radiación emitida por dicha al menos una PL excitada y confinada de la etapa (ii) o (iii), dando lugar a marcador luminiscente excitado; donde dicho marcador
- 10 luminiscente excitado emite una señal luminiscente.

En el contexto de la presente invención, la expresión “desplazar” en relación a la al menos una partícula luminiscente excitada y confinada de la etapa (ii) mediante la pinza óptica de la etapa (i) del método de detección de la presente invención, se refiere a

15 mover dicha partícula hasta una posición determinada mediante la pinza óptica de la etapa (i). Dicho movimiento no se realiza solamente una vez sino que podría ser repetido. Es decir, sería posible desplazar a la al menos una partícula luminiscente (PL) excitada y confinada de la etapa (ii) mediante la pinza óptica de la etapa (i) a distintos puntos respecto a la estructura marcada. Dicho desplazamiento podría consistir en un

20 desplazamiento individual o en una serie de desplazamientos sucesivos. Como ejemplo no limitativo, la figura 3 de la presente invención muestra un agregado de puntos cuánticos que se encuentra “confinado” y excitado mediante una pinza óptica, y cómo es posible desplazar dicho agregado en el interior de un medio líquido dentro de una cámara de microfluídica.

25 En una realización particular, el desplazamiento de la etapa (iii) se produce hasta que la PL excitada y confinada se encuentra a una distancia respecto a la estructura marcada de la etapa (i) tal que la radiación emitida por dicha al menos una PL excitada y confinada excita al marcador luminiscente de dicha estructura marcada; preferiblemente

30 inferior a 10 micras; más preferiblemente una distancia entre 10 micras y 1 nm; más preferiblemente una distancia entre 1 micras y 1 nm. Como ejemplo no limitativo, la figura 3 de la presente invención muestra un agregado de puntos cuánticos que se encuentra “confinado” y excitado mediante una pinza óptica. En dicho ejemplo no limitativo, se puede observar que, a una distancia determinada de dicho agregado a la

superficie marcada (una célula) se obtienen señales luminiscentes de dicha estructura marcada (Figuras 3c y 3d).

El método de detección de estructuras marcadas de la presente invención comprende la
5 etapa (iv) de excitar el marcador luminiscente de la etapa (i) mediante la radiación emitida por dicha al menos una PL excitada y confinada de la etapa (ii) o (iii), dando lugar a marcador luminiscente excitado; donde dicho marcador luminiscente excitado emite una señal luminiscente.

10 En una realización particular, la al menos una PL excitada y confinada de cualquiera de las etapas (ii), (iii) y (iv) emite radiación electromagnética; preferiblemente en un rango de longitudes de onda que se solapa con el espectro de absorción del marcador luminiscente de la etapa (i); preferiblemente en un rango de longitudes de onda de entre 300 y 800 nm.

15

En una realización particular, la al menos una PL excitada y confinada de cualquiera de las etapas (ii), (iii) y (iv) emite fotones con una energía capaz de excitar el marcador luminiscente de la etapa (i).

20 En una realización particular, la excitación del marcador luminiscente de la etapa (iv) se produce mediante una transferencia radiativa entre la al menos una PL excitada y confinada de cualquiera de las etapas (ii) o (iii) y (iv) y el marcador luminiscente de la etapa (i).

25 En una realización más particular, el marcador luminiscente de la etapa (i) actúa como aceptor de energía en la transferencia radiativa de la etapa (iv); en particular como aceptor de fotones.

En una realización más particular, la al menos una PL excitada y confinada de
30 cualquiera de las etapas (ii) o (iii) y (iv) actúa como donante de energía en la transferencia radiativa de la etapa (iv); en particular como donante de fotones.

En una realización más particular, el marcador luminiscente de la etapa (i) y la al menos una PL excitada y confinada de cualquiera de las etapas (ii) o (iii) y (iv) actúan como un

par donante-aceptor en el transferencia radiativa de la etapa (iv).

En el contexto de la presente invención, la expresión “transferencia radiativa” se refiere a procesos de interacción entre la al menos una PL excitada y confinada de cualquiera de las etapas (ii), (iii) o (iv) y el marcador luminiscente de la etapa (i) en donde parte o toda la radiación electromagnética emitida por la al menos una PL excitada y confinada es absorbida por el marcador luminiscente de la etapa (i) de forma que dicho marcador luminiscente pasa a un estado excitado. Es decir se produce un proceso radiativo entre la al menos una PL excitada y confinada de cualquiera de las etapas (ii), (iii) o (iv) y el marcador luminiscente de la etapa (i) a través de la emisión y absorción de fotones de una determinada energía. Dicho proceso sólo se produce cuando el espectro de emisión de dicha al menos una PL se solapa con el espectro de absorción del marcador luminiscente de la etapa (i).

Sin estar vinculado a una teoría en particular, los autores de la presente invención han encontrado que al excitar en la etapa (iv) del método de detección de la presente invención el marcador luminiscente de la etapa (i) mediante la radiación emitida por dicha al menos una PL excitada y confinada de la etapa (ii) o (iii) se evitarían problemas asociados al uso de una alta irradiancia como por ejemplo el blanqueamiento acelerado de los marcadores luminiscentes, tales como fluoróforos, y su degradación. Además también se ha observado que mediante este método se reduce la degradación de la estructura marcada para tiempos relativamente largos de medida, particularmente cuando dicha estructura forma parte de un espécimen biológico. También de esta forma, se aumenta la selectividad y la resolución de dicho método.

25

Sin estar vinculado a una teoría en particular, los autores de la presente invención han encontrado que cuando la al menos una PL excitada y confinada de cualquiera de las etapas (ii), (iii) y (iv) y el marcador luminiscente se encuentran a distancias superiores a 10 nm se produce una transferencia radiativa entre la al menos una PL excitada y confinada de cualquiera de las etapas (ii), (iii) y (iv) y el marcador luminiscente permitiendo excitar la marcador luminiscente. Así, la detección de la presente invención no está limitada a distancias pequeñas que poseen otras técnicas como la técnica de transmisión de energía de resonancia de fluorescencia (*Fluorescence Resonance energy transfer* o *FRET*). El experto en la materia sabría seleccionar las distancias

óptimas entre al PL excitada y confinada y el marcador luminiscente o la estructura marcada para estudiar dicha estructura. Dicha distancia no es limitativa del método ya que la PL confinada se puede desplazar.

- 5 En una realización particular, las etapas (iii) y (iv) del método de detección de la presente invención se repiten al menos una vez; preferiblemente entre 2 y 100 veces; más preferiblemente entre 2 y 50 veces.

- 10 Sin estar vinculado a una teoría en particular, los autores de la presente invención han encontrado que al repetir las etapas (iii) y (iv) del método de detección de estructuras marcadas de la presente invención se pueden estudiar distintas zonas o distintas estructuras marcadas en un mismo experimento o medida. Además, es posible estudiar la muestra durante más tiempo sin observar que dicha muestra se degrade.

- 15 En una realización particular, el marcador luminiscente excitado de la etapa (iv) emite luminiscencia; preferiblemente radiación en un rango de longitudes de onda entre 400 y 650 nm.

- 20 En una realización particular, el marcador luminiscente excitado de la etapa (iv) emite una señal luminiscente; preferiblemente una señal fluorescente; más preferiblemente una señal fluorescente formada por una emisión de radiación electromagnética en un rango de longitudes de onda de entre 300 y 800 nm; preferiblemente entre 400 y 700 nm.

- 25 En una realización particular, la señal luminiscente de la etapa (iv) se detecta mediante medios de detección lumínica; preferiblemente mediante un espectrómetro o una cámara; más preferiblemente mediante una cámara.

- 30 En el contexto de la presente invención los términos “espectrómetro” y “espectrofotómetro” son equivalentes.

En una realización particular, el método de detección de la presente invención se aplica en muestras biológicas.

En una realización más particular, el método de detección de la presente invención se aplica para mapear membranas celulares, biosensar proteínas de membrana o monitorizar señales eléctricas. En el contexto de la presente invención, el término “biosensar” se refiere a utilizar un método en un ser vivo para obtener información de un
5 proceso o de una estructura biológica. Un experto en la materia sería capaz de adaptar el método de la presente invención para poder biosensar.

Sin estar vinculado a una teoría en particular, los autores de la presente invención han encontrado que al excitar ópticamente la estructura marcada a detectar mediante el
10 método de detección de estructuras marcadas de la presente invención se pueden detectar dichas estructuras sin contacto y sometidas solo a la baja irradiancia de los PCs, por tanto de manera no invasiva, y de forma remota.

Usos

15 Un segundo aspecto de la invención estaría dirigido al uso de un marcador luminiscente en el método de detección de estructuras marcadas de la presente invención en cualquiera de sus realizaciones particulares. El marcador luminiscente puede comprender cualquiera de las características descritas en cualquiera de las realizaciones
20 particulares de la presente invención.

Un tercer aspecto de la invención estaría dirigido al uso de una partícula luminiscente (PL) en el método de detección de estructuras marcadas de la presente invención en cualquiera de sus realizaciones particulares. En una realización particular, dicha
25 partícula luminiscente se puede utilizar de forma individual o en conjunto con otras partículas luminiscentes del mismo tipo. La partícula luminiscente puede comprender cualquiera de las características descritas en cualquiera de las realizaciones particulares de la presente invención.

30 Un cuarto aspecto de la invención estaría dirigido al uso de una pinza óptica en el método de detección de estructuras marcadas de la presente invención en cualquiera de sus realizaciones particulares. La pinza óptica puede comprender cualquiera de las características descritas en cualquiera de las realizaciones particulares de la presente invención.

Medios para llevar a cabo el método

Un aspecto adicional de la presente invención se encuentra dirigido a un aparato diseñado para llevar a cabo el método de detección de estructuras marcadas de la presente invención que comprende:

- i) medios para atrapar y rotar la una estructura marcada de la etapa (i);
 - ii) la pinza óptica de la etapa (i) del método de la presente invención; y
 - iii) medios de detección lumínica de la señal luminiscente de la etapa (iv) del método de detección de estructuras marcadas de la presente invención;
- preferiblemente un detector de la señal de la etapa (iv) del método de detección de estructuras marcadas.

En una realización particular, el aparato diseñado para llevar a cabo el método de detección de estructuras marcadas de la presente invención comprende además

- (iv) un contenedor, preferiblemente una cámara de microfluídica, y medios para visualizar dicho contenedor, preferiblemente una cámara óptica; más preferiblemente una cámara acoplada a un microscopio óptico.

En una realización particular, los medios de detección lumínica del aparato de la presente invención comprenden un espectrómetro.

En una realización particular, los medios de detección lumínica del aparato de la presente invención no usan filtros espectrales; preferiblemente no usan filtros espectrales para separar las señales de los distintos emisores.

Los autores de la presente invención han observado que la utilización de un espectrómetro permite reducir costes en el método de detección de estructuras marcadas además de permitir observar, de forma inequívoca, la emisión de los PCs y de los fluoróforos. Además, el aparato diseñado para el método de detección de la presente invención comprende un diseño más sencillo ya que no necesita usar filtros espectrales para separar las señales de emisión.

El uso de un marcador luminiscente, el uso de una partícula luminiscente (PL), el uso de una pinza óptica en el método de la presente invención y el aparato diseñado para

llevar a cabo el método de la presente invención comprenden todas la características descritas para el marcador luminiscente, la partícula luminiscente (PL), la pinza óptica y el aparato descritas para el método de detección de estructuras marcadas de la presente invención en cualquiera de sus realizaciones particulares.

5

Ejemplos

La invención se describe a continuación mediante los siguientes ejemplos que deben ser considerados como meramente ilustrativos y en ningún caso limitativos del ámbito de la presente invención.

10

Ejemplo 1: Detección de estructuras marcadas en células.

En el presente ejemplo se estudió la detección de estructuras marcadas en células.

15

Como estructuras marcadas se emplearon células Jurkat-T impermeabilizadas cuyas proteínas fueron inespecíficamente marcadas con un colorante fluorescente que en este caso es Alexa Fluor® 546. Alexa Fluor® 546 presenta un espectro de absorción con un máximo en torno a los 546 nm, y un espectro de emisión con un máximo centrado en torno a los 573 nm.

20

Por otro lado se sintetizaron nanopartículas luminiscentes (PL), concretamente puntos cuánticos (PCs) formados por nanocristales de una aleación de CdSeZnS encapsulados en SiO₂ (PCs *ad hoc*) con un máximo de emisión en 540 nm siguiendo el método descrito en Acebrón M. et al. [M. Acebrón, J. F. Galisteo-López, D. Granados, J. López-Ogalla, J. M. Gallego, R. Otero, C. López, and B. H. Juárez, "Protective Ligand Shells for Luminescent SiO₂-Coated Alloyed Semiconductor Nanocrystals," ACS Appl. Mater. Interfaces, p. 150319103751001, 2015.]. El encapsulado de SiO₂ de las puntos cuánticos favorece los procesos radiativos frente a los procesos no radiativos (i.e. FRET) al crear una "barrera" de entre 10 and 100 nm.

25

30

Cabe destacar que se seleccionó dicho par colorante/punto cuántico ya que el máximo de emisión de dicho punto cuántico en 540 nm se solapa con el espectro de

absorción del colorante fluorescente utilizado como marcador, el Alexa Fluor® con un máximo de absorción en torno a los 546 nm. No obstante otros pares colorante/punto cuántico (o PL en general) que cumpliesen con la condición de solapamiento de espectros de absorción/emisión podrían utilizarse igualmente.

5

Las células con estructuras marcadas con dicho colorante fluorescente fueron depositadas en el fondo de una cámara de micro-fluídica manufacturada a partir de dos cubreobjetos de vidrio. A continuación, los PCs se dispersaron en un tampón fosfato salino libre de calcio (PBS) a pH 7,4 y fueron inyectados en la cámara de
10 micro-fluídica. Los PCs en la cámara de micro-fluídica estaban tanto dispersos como puntos cuánticos individuales como formando agregados.

Se utilizaron unas pinzas ópticas (trampa óptica) formadas por un láser de diodo de 845 nm monomodo continuo y focalizado manejado a una potencia tal que a la
15 trampa óptica llegan 150 mW para atrapar, excitar y desplazar tanto PCs individuales como agregados.

Uno de dichos agregados de PCs fue atrapado, excitado y desplazado con las pinzas ópticas descritas por los alrededores de la célula marcada de forma que excitó a
20 distintos marcadores luminiscentes que emitieron a su vez una señal luminiscente. Cada una de las transferencias radiativas de dicho proceso fue como sigue: la excitación de dicho agregado de puntos cuánticos se produjo mediante un proceso de absorción de dos fotones en el infrarrojo cercano, $2\gamma_{\text{NIR}}$ provenientes del láser monomodo continuo y focalizado de la pinza óptica descrita anteriormente (emisión a
25 845 nm). Este proceso de excitación de dos fotones consiste en que el punto cuántico o agregado de puntos cuánticos es capaz de absorber dos fotones de baja energía resultando en la emisión de un fotón de mayor energía que cualquiera de los fotones absorbidos inicialmente. Tras la absorción de dos fotones de 845 nm, el agregado de PCs emitió fotones más energéticos en el espectro visible, γ_{VIS} , a unos
30 540 nm. Dichos fotones a su vez excitaron al marcador Alexa Fluor® 546 que, como ya hemos comentado, tiene un máximo en su espectro de absorción alrededor de los 546 nm. Dicho marcador excitado a su vez emitió espontáneamente un fotón en el espectro visible, de alrededor de 573 nm, γ_{VIS} , que se detectó como señal lumínica mediante un espectrómetro (Ocean Optics USB2000+). Al desplazar dichos puntos

cuánticos atrapados y excitados a un nuevo punto, y repetirse la transferencia radiativa descrita, se recogió señal luminiscente proveniente de otras zonas marcadas de la membrana celular.

- 5 La Figura 1 presenta un (a) esquema de un sistema de excitación en cadena o de transferencia radiativa en el que un punto cuántico es excitado mediante un proceso de absorción de dos fotones en el infrarrojo cercano, $2\gamma_{\text{NIR}}$, tras el que emite un fotón en el espectro visible, γ_{VIS} , que a su vez excita a un marcador fluorescente (una molécula de colorante) que a su vez emite un fotón en el espectro visible a distinta
- 10 longitud de onda del anterior, γ_{VIS} , que se detectará como una señal lumínica. La figura 1b muestra una gráfica de intensidad de emisión/absorción frente a longitud de onda (nm) que muestra el solapamiento entre el espectro de emisión de PCs coloidales (línea continua) y el espectro de absorción de un colorante (línea discontinua).

15

La Figura 2 muestra el esquema experimental del método de detección de estructuras marcadas en el que un agregado de PCs se encuentra atrapado mediante unas pinzas ópticas cerca de la superficie de una célula marcada. La figura no está dibujada a escala.

20

- El sistema experimental utilizado para la realización experimental ilustrada en el Ejemplo 1 se modificó la posición de la cámara de microfluídica respecto a las pinzas ópticas de manera que los agregados de PCs pudieron ser situados en distintas posiciones relativas respecto a la célula. De esta forma, se utilizaron los agregados
- 25 de PCs atrapados y excitados mediante la pinza óptica para excitar diversas regiones marcadas de la célula. La Figura 3 muestra imágenes en transiluminación obtenidas mediante una cámara (MTV-1802CB, DBS) acoplada a un microscopio óptico (Zeiss Axiovert 135M) y los espectros de emisión recogidos mediante un espectrómetro. Un agregado de PCs atrapado ópticamente y excitado se situó a distintas distancias (a-d)
- 30 de la superficie de una célula marcada con Alexa Fluor® 546. Como se puede observar en dicha figura, cuando el agregado de PCs atrapado y excitado mediante una pinza óptica se encontraba a aproximadamente 10 micras de la membrana celular marcada, el espectro de emisión recogido correspondió al de dicho agregado cuyo máximo se encuentra centrado en 540 nm (Figura 3a). Se observó que,

conforme el agregado de PCs se desplazó a posiciones más cercanas a la célula, la intensidad de su espectro de emisión fue disminuyendo. Cuando el agregado de PCs atrapado y excitado se situó a una distancia submicrométrica se obtuvo un espectro correspondiente a la emisión del agregado de PCs cuyo máximo se encuentra centrado en 540 nm junto con una emisión de los marcadores luminiscentes de membrana de Alexa Fluor® 546 con un máximo centrado en torno a los 573 nm (Figura 3c). Al situar dicho agregado de PCs atrapado y excitado sobre la célula (aunque no en contacto con dicha célula ya que se quedarían fijados), es decir, formando la trampa y recogiendo la luz a través de la célula, se obtuvo un espectro correspondiente a la emisión de los marcadores de la célula (Figura 3d).

Este experimento demostró la posibilidad de excitar ópticamente fluoróforos presentes en una célula, es decir estructuras marcadas, mediante la emisión de un agregado de PCs atrapado y excitado mediante pinzas ópticas. También demostró la capacidad para resolver en función de la localización de los PCs atrapados respecto a la estructura marcada (en este caso, la célula). Finalmente, se demostró también que el método de detección de estructuras marcadas es selectivo a la detección de dichas estructuras marcadas. Destacar también que los marcadores no emiten como consecuencia de su interacción con la pinza óptica utilizada.

20

Ejemplo 2: Detección de marcadores dispersos en un medio acuoso.

En el presente ejemplo se estudió la detección de marcadores luminiscentes dispersos en un medio acuoso. Como marcador luminiscente se utilizó la tetra-metil-rodamina (TRITC según sus siglas en inglés), un colorante fluorescente con un espectro de absorción con un máximo en torno a los 557 nm y un espectro de emisión con un máximo en torno a los 576 nm. Se disolvió tetra-metil-rodamina (TRITC) en agua hasta alcanzar una concentración de 2,7 nM y se inyectó dicha solución acuosa en una cámara de micro-fluídica.

30

Más tarde, se inyectaron PCs (recubiertos con óxido de silicio (SiO_2)) descritos en el ejemplo 1 en dicha cámara de micro-fluídica dando lugar a PCs individuales y agregados en el medio acuoso. Un agregado de PCs fue atrapado y excitado dentro de dicho medio mediante una pinza óptica (ver figura 4(a)). Mediante movimientos de

la cámara de microfluídica, se modificó la posición del agregado de PCs atrapado y excitado respecto de la superficie de dicha cámara de microfluídica. Es decir, dicho agregado de puntos cuánticos atrapado y excitado se situó a distintas profundidades (distancia variable L) de la superficie de la cámara y se estudió el espectro de emisión
5 procedente de la región de la trampa. Para ello, la luminiscencia o fluorescencia procedente de la muestra fue recogida a través del objetivo de atrapamiento y enviada a un espectrómetro. En la figura 4(b) se muestran varios espectros de emisión medidos al atrapar y excitar dicho agregado de PCs a varias distancias L (profundidades) de la superficie de la cámara de microfluídica que sirve como
10 contenedor de la disolución de TRITC.

Se observó que la señal procedente de los PCs se pierde a medida que L aumenta (Figura 4(b)), es decir a medida que los PCs se excitan a mayor profundidad dentro de la disolución, mientras que la emisión correspondiente al TRITC aumenta. Esto es
15 debido a que en el proceso de transferencia radiativa, al aumentar L , existe una mayor probabilidad de que los fotones emitidos por el agregado de PCs confinado y excitado sean absorbidos por una molécula de TRITC llegando por tanto menos fotones correspondientes a dicha emisión del agregado de PCs al detector. Cabe destacar que sólo produce emisión de TRITC cuando existen PCs excitados en el
20 medio. Este experimento demostraría por tanto que la excitación del marcador de la presente invención transcurre a través de un proceso de transferencia radiativa.

Ejemplo 3: Efecto del solapamiento del espectro de emisión del PCs y del espectro de absorción del marcador fluorescente.

25

En el presente ejemplo se estudió el efecto del solapamiento del espectro de emisión de los PCs utilizados y del espectro de absorción del marcador fluorescente.

En el presente ejemplo como marcador luminiscente se utilizó rodamina 6G (Ro-6G
30 según sus siglas en inglés), un colorante fluorescente con un espectro de absorción con un máximo en torno a los 530 nm y un espectro de emisión con un máximo en torno a los 566 nm. Se disolvió Ro-6G en etanol hasta alcanzar una concentración de 2 μ M. Dicha solución se inyectó en una cámara de microfluídica.

Por otro lado, se utilizaron dos tipos de puntos cuánticos que fueron denominados como puntos cuánticos de tipo 1 y de tipo 2. Tipo 1: puntos cuánticos encapsulados en sílice con un máximo de emisión en 527 nm similares a los que fueron descritos en el Ejemplo 1. Tipo 2: se sintetizaron y encapsularon en sílice puntos cuánticos con un máximo de emisión en 580 nm siguiendo el método descrito en Acebrón M. et al. [M. Acebrón, J. F. Galisteo-López, D. Granados, J. López-Ogalla, J. M. Gallego, R. Otero, C. López, and B. H. Juárez, "Protective Ligand Shells for Luminescent SiO₂-Coated Alloyed Semiconductor Nanocrystals," ACS Appl. Mater. Interfaces, p. 150319103751001, 2015.].

10

Por tanto, el espectro de emisión de los puntos cuánticos de tipo 1 se solapaba con el espectro de absorción del colorante Ro-6G y mientras que el de los de tipo 2 no. La Figura 5a muestra un esquema del solapamiento entre el espectro de emisión de dos PCs coloidales del tipo 1 y de tipo 2 (líneas continuas 1 y 2) y del espectro de absorción de un colorante (línea discontinua), dicho solapamiento está representado como el área sombreada debajo de la curva.

15

Se midieron distintos espectros de emisión para una muestra que comprende una disolución de Ro-6G en la que se atrapa y excita (b) un agregado de PCs del tipo 1 a distintas profundidades de la superficie de la cámara de microfluídica (distancias L) tal y como se muestra en la Figura 5b. Se repitieron las mismas medidas para un agregado de PCs del tipo 2 que se muestra en la Figura 5c. Los espectros de emisión obtenidos mostraron que al desplazar un agregado de PCs de tipo 1 una distancia L en la dirección transversal de la cámara de microfluídica se observó un cambio en el espectro de emisión procedente de la misma (figura 5b), al aumentar la distancia L, disminuye la señal correspondiente al espectro de emisión del agregado de PCs de tipo 1 a favor de la intensidad de emisión de la Ro-6G (Figura 5b). No obstante, esto no se observó cuando se manipulan los PCs que emiten en 580 nm (Fig 5c) ya que, en este caso, la luz procedente de los PCs abandona la cámara de microfluídica sin ser absorbida por la Ro-6G, de forma que el espectro de emisión no cambia cuando se aumenta L.

20

25

30

De esta forma, se demostró la importancia del solapamiento del espectro de emisión de los puntos cuánticos utilizados con el espectro de absorción del colorante o marcador luminiscente utilizado para detectar estructuras marcadas.

5 Ejemplo 4: Dispositivos utilizados.

La Figura 6 muestra un esquema de un dispositivo experimental. El dispositivo utilizado para realizar los ejemplos 1-3 de la presente invención estaba formado por dos láseres (L1 y L2) que son combinados mediante un cubo divisor de haz (PBS) y dirigidos por medio de espejos (M1 y M2) hacia el interior de un microscopio de fluorescencia. El láser combinado es reflejado en un espejo dicróico (DM) y focalizado a través de un objetivo de microscopio (O) sobre la muestra (SH). Una lámpara (WL), un sistema de retículos (I&S) y un condensador (C) conforman el sistema de iluminación del experimento. La muestra a estudio se colocó dentro de una cámara de microfluídica manufacturada a partir de dos cubreobjetos de vidrio que, además, se podía mover tridimensionalmente mediante tornillos micrométricos.

La trampa óptica fue implementada en el microscopio óptico mediante la combinación de dos fuentes láser monomodo continuo y focalizado de diodo en el infrarrojo con una longitud de onda de 845 nm (L1 y L2) manejadas a una potencia tal que a la trampa óptica llegan 150 mW. El objetivo del microscopio con el que se focaliza el láser es de alta apertura numérica ($NA=1.2$), de inmersión en agua y está corregido al infinito. La trampa se forma en el punto focal del objetivo, cuya distancia de trabajo es 0.7 mm. El objetivo recogió, además, la emisión luminiscente en el área de la trampa. La fluorescencia procedente de la muestra, tras atravesar el espejo dicróico, fue filtrada mediante un filtro espectral paso-bajo a 750 nm (F) y enviada selectivamente a un espectrómetro (S, Ocean Optics USB2000+) o a una cámara de vídeo (MTV-1802CB, DBS) (VC) mediante diversos elementos ópticos (FL, lente de focalización; M3, espejo; P, prisma; RL1 y RL2, lentes de retransmisión). Se empleó un tiempo de integración de 5 s para cada medida del espectrómetro.

El experimento se visualizó a tiempo real y mediante imágenes obtenidas mediante trans-iluminación (Figura 3), para la que se cuenta con una lámpara halógena de 100

W y un condensador de baja apertura numérica ($NA=0.3$). La luz de la lámpara se bloquea durante la adquisición de espectros.

- Una vez descrita suficientemente la naturaleza de la presente invención, así como
- 5 una forma de llevarla a la práctica, sólo queda añadir que en su conjunto y partes que la componen es posible introducir cambios de forma, materiales y de disposición siempre y cuando dichas alteraciones no varíen sustancialmente dicha invención.

REIVINDICACIONES

1. Un método de detección de estructuras marcadas que comprende las etapas de:
 - i) proporcionar:
 - 5 – una estructura marcada con un marcador luminiscente, donde dicho marcador luminiscente presenta un espectro de absorción;
 - al menos una nanopartícula luminiscente (PL), donde dicha al menos una PL presenta un espectro de emisión; donde dicho espectro de emisión de dicha al menos una PL se solapa con el espectro de absorción del marcador luminiscente de la etapa (i);
 - 10 – una pinza óptica, donde dicha pinza óptica comprende un láser focalizado; donde dicho láser focalizado presenta una emisión en un rango de longitudes de onda que no se solapa con el espectro de absorción del marcador luminiscente de la etapa (i);
 - 15 ii) confinar y simultáneamente excitar dicha al menos una PL de la etapa (i) mediante la pinza óptica de la etapa (i) dando lugar a al menos una PL excitada y confinada;
 - iii) opcionalmente desplazar la al menos una PL excitada y confinada de la etapa (ii) mediante la pinza óptica de la etapa (i); y
 - 20 iv) excitar el marcador luminiscente de la etapa (i) mediante la radiación emitida por dicha al menos una PL excitada y confinada de la etapa (ii) o (iii), dando lugar al marcador luminiscente excitado; donde dicho marcador luminiscente excitado emite una señal luminiscente.
- 25 2. El método de detección según la reivindicación 1, donde dicho marcador luminiscente se selecciona entre fluoróforos, cromóforos y combinaciones de los anteriores.
3. El método de detección según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde
30 dicha al menos una PL se encuentra encapsulada en una matriz.
4. El método de detección según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde dicha al menos una PL esta funcionalizada.

5. El método de detección según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde dicha al menos una PL es al menos un punto cuántico (PC).
- 5 6. El método de detección según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el un láser focalizado de la etapa (i) presenta una emisión en un rango de longitudes de onda comprendidas entre 650-950 nm que excita a dicha al menos una PL.
7. El método de detección según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde la excitación de la al menos una PL de la etapa (ii) se produce mediante un
10 mecanismo de absorción de dos fotones.
8. El método de detección según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde las etapas (iii) y (iv) se repiten al menos una vez.
- 15 9. El método de detección según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde dicha al menos una PL confinada y excitada de la etapa (ii) emite luminiscencia; preferiblemente radiación en un rango de longitudes de onda entre 400 y 650 nm.
- 20 10. El método de detección según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde la señal producida por el marcador luminiscente excitado de la etapa (iv) es una emisión luminiscente; preferiblemente fluorescente en el rango de entre 400 y 700 nm.
- 25 11. El método de detección según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde la señal luminiscente de la etapa (iv) se detecta mediante un espectrómetro.
12. El método de detección según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde dicha estructura marcada de la etapa (i) está presente en especímenes
30 biológicos y no biológicos.
13. El método de detección según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde dicho método se aplica en muestras biológicas.
- 35 14. El método de detección según la reivindicación 13, donde dicho método se aplica para mapear membranas celulares, biosensar proteínas de membrana o

monitorizar señales eléctricas.

15. Uso de un marcador luminiscente en el método de detección de estructuras marcadas según cualquiera de las reivindicaciones 1-14.
- 5
16. Uso de una partícula luminiscente (PL) en el método de detección de estructuras marcadas según cualquiera de las reivindicaciones 1-14.
17. Uso de una pinza óptica en el método de detección de estructuras marcadas según cualquiera de las reivindicaciones 1-14.
- 10
18. Aparato diseñado para llevar a cabo el método de detección de estructuras marcadas según cualquiera de las reivindicaciones 1-14 que comprende:
- 15
- i) medios para atrapar y rotar la estructura marcada de la etapa (i);
 - ii) la pinza óptica de la etapa (i) del método de detección de estructuras marcadas según cualquiera de las reivindicaciones 1-14; y
 - iii) un detector de la señal de la etapa (iv) del método de detección de estructuras marcadas según cualquiera de las reivindicaciones 1-14.

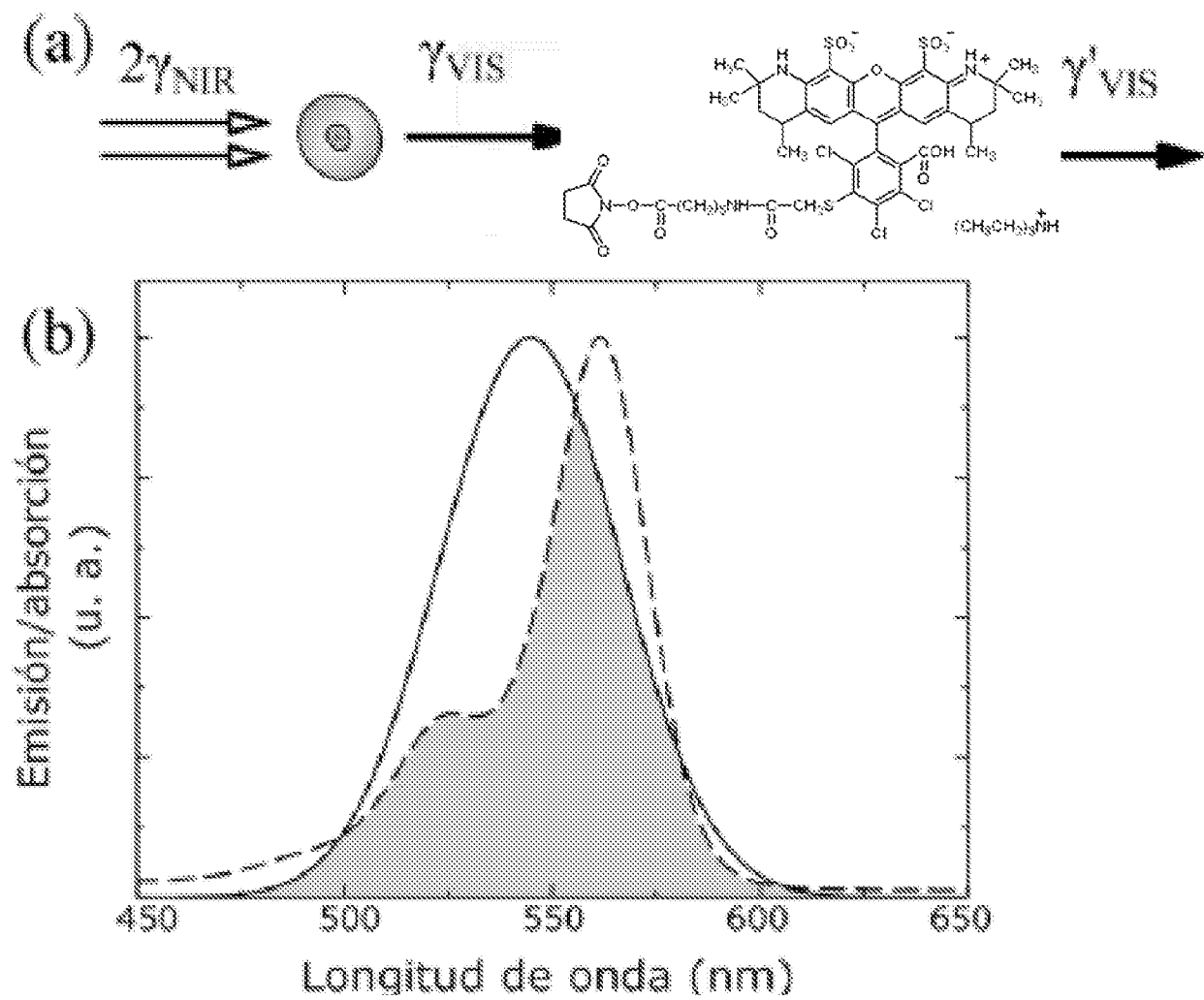


Figura 1.

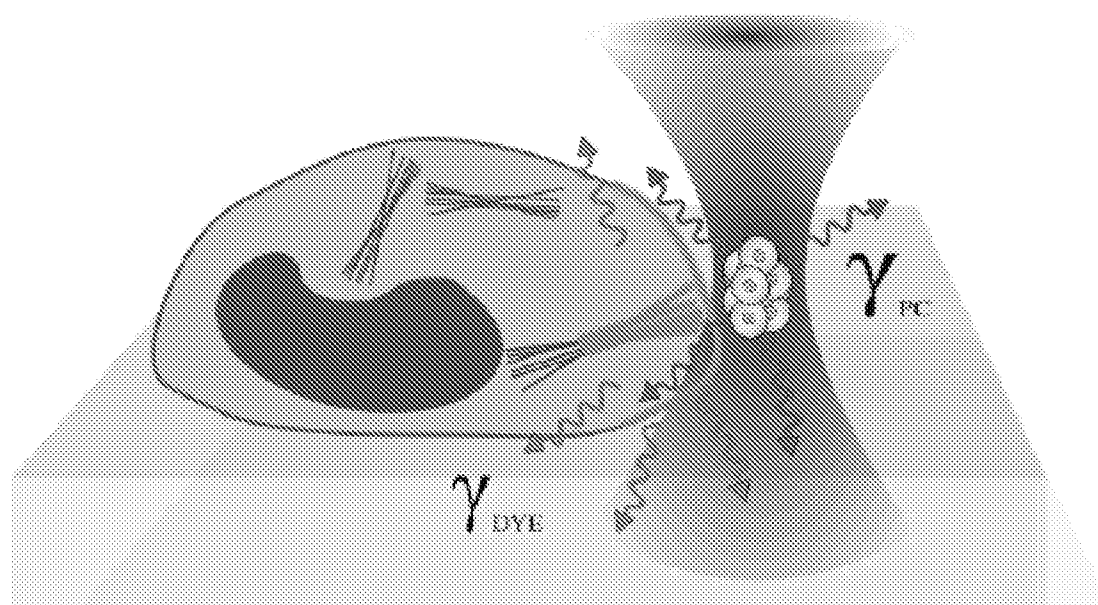


Figura 2.

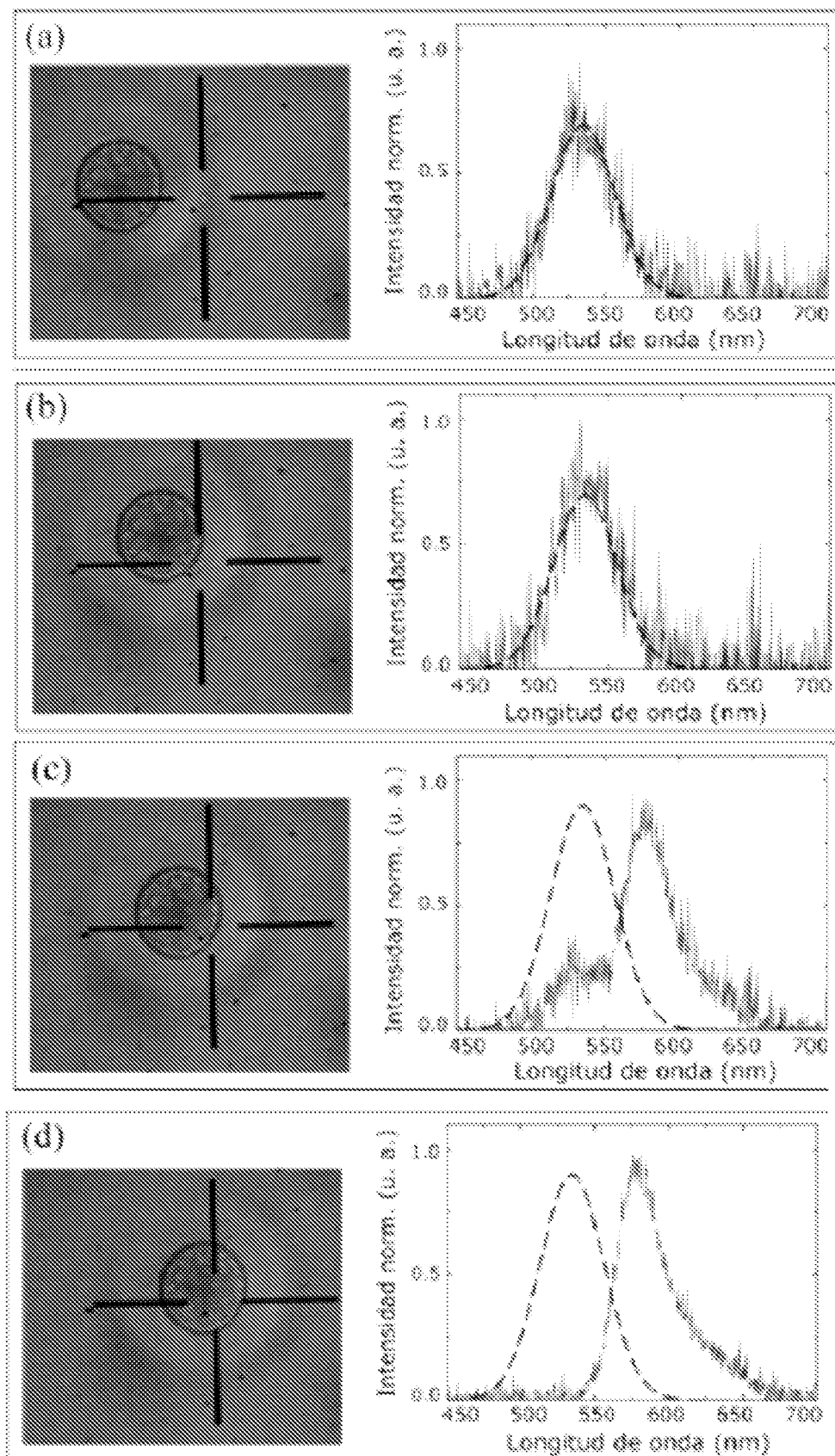


Figura 3.

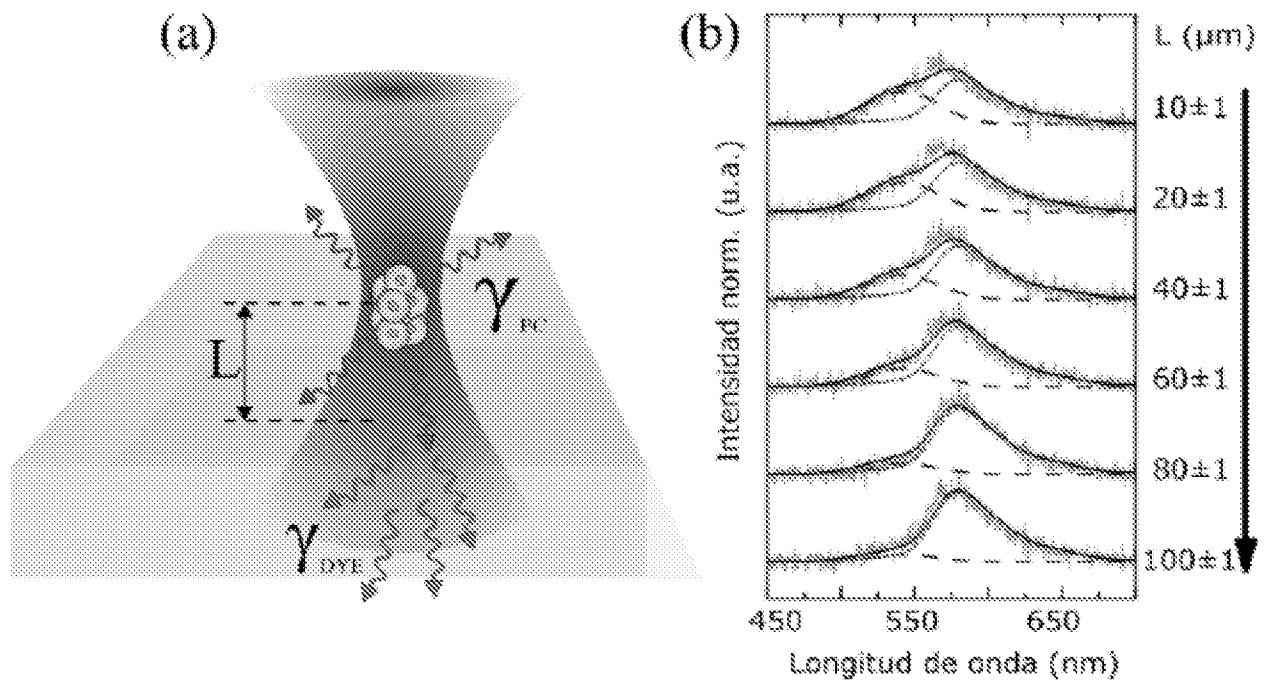


Figura 4

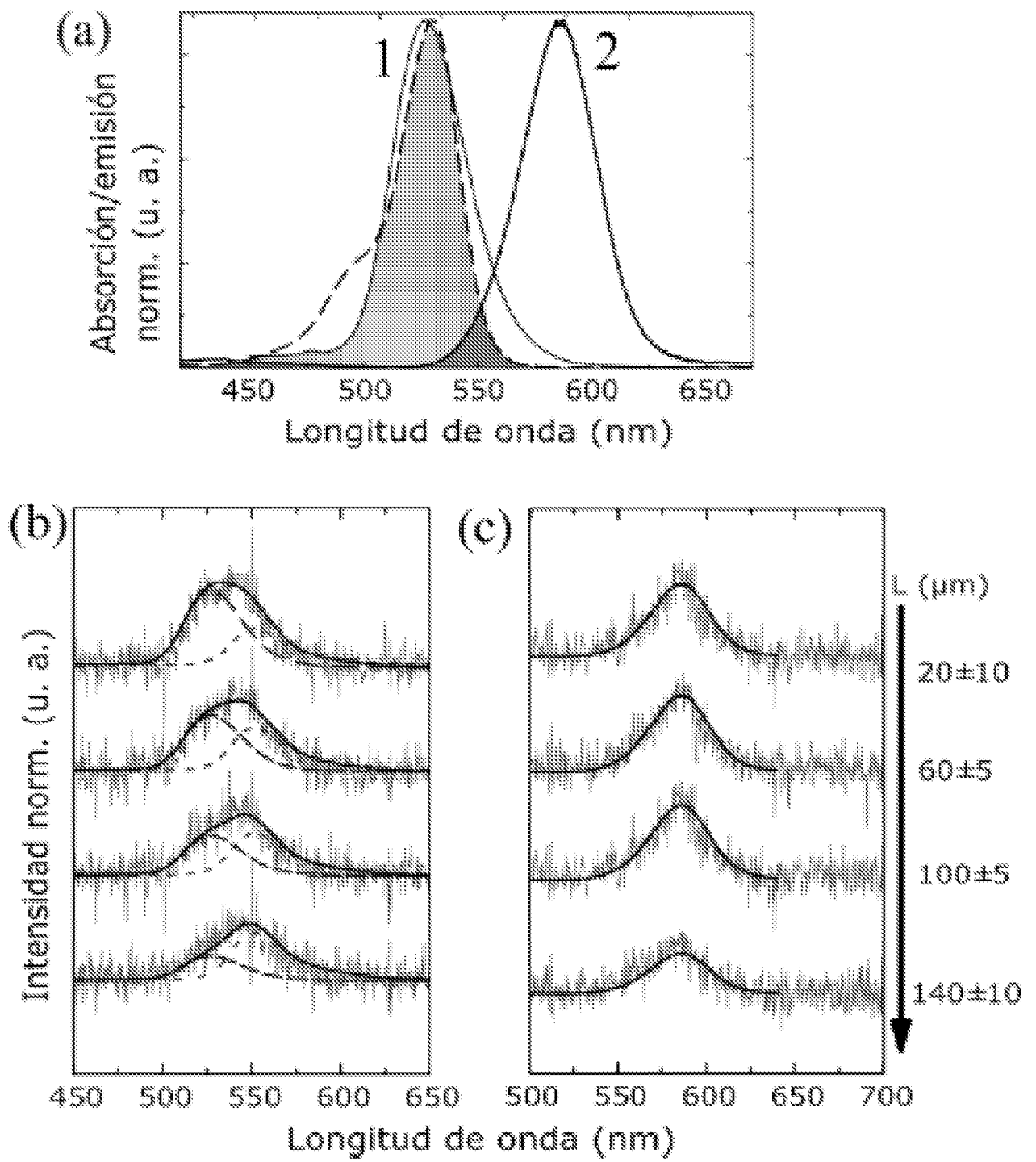


Figura 5

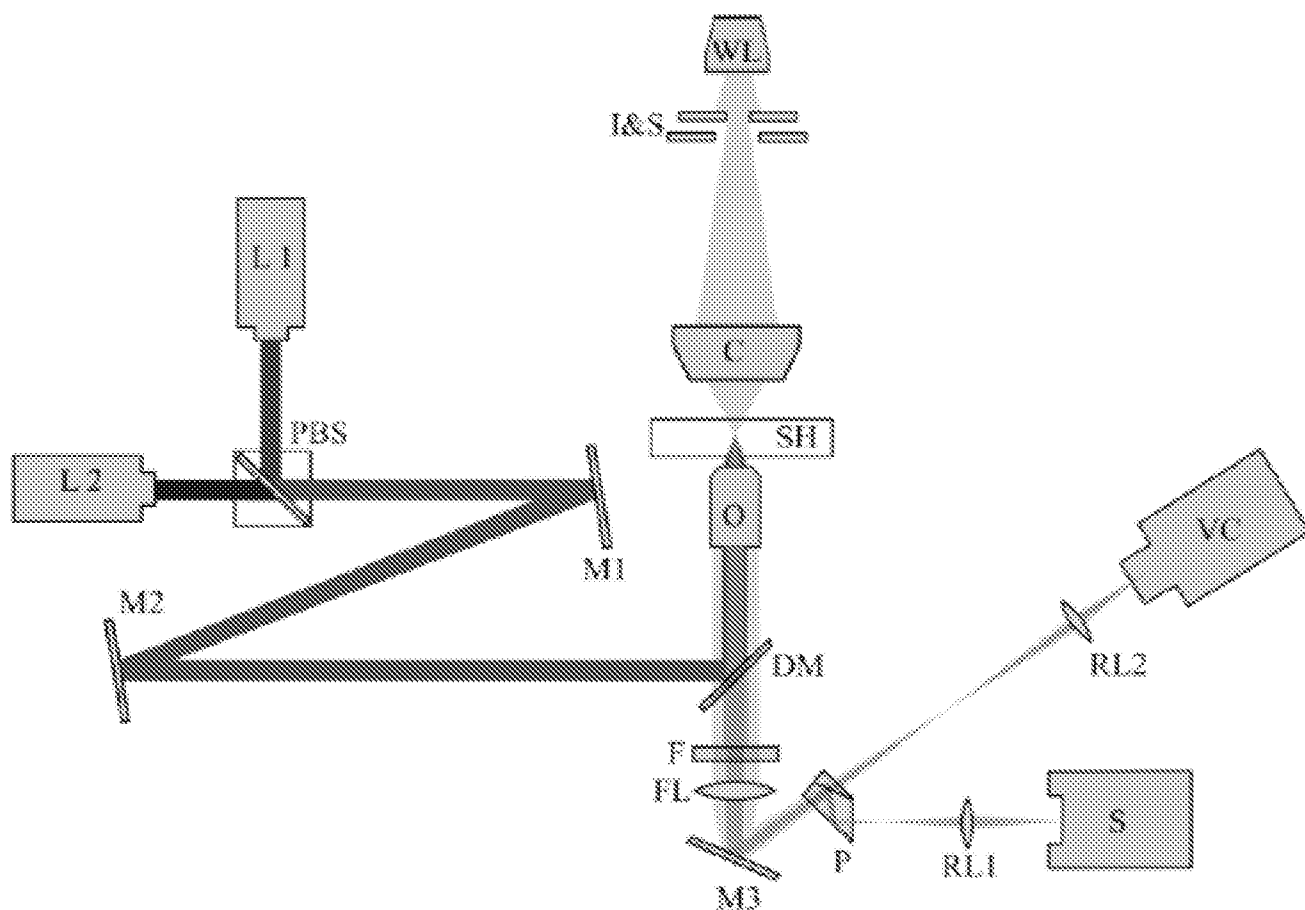


Figura 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2019/070533

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N21/64 (2006.01)

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, G02B

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

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

EPODOC, INVENES, WPI, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIU, H. et al.: "Vibration-assisted optical injection of a single fluorescent sensor into a target cell". Sensors and Actuators B: Chemical, 22/05/2015, N° 220, pages 40-49 [on line][retrieved the 14/11/2019]. See pages 41-46.	1-18
A	CN 103439242 A (UNIV SOUTH CHINA NORMAL) 11/12/2013, abstract; paragraphs [0005]-[0024]; figures.	1-18
A	CN 106932372 A (UNIV TONGJI) 07/07/2017, the whole document.	1, 2, 6, 10-15, 17, 18
A	US 4822746 A (WALT, D.) 18/04/1989, abstract; column 4, line 32 - column 5, line 13; column 6, line 38 - column 8, line 10; column 17, line 1 - column 18, line 61; figures 4 and 5.	1

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

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

Date of the actual completion of the international search
15/11/2019

Date of mailing of the international search report
(18/11/2019)

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer
Ó. González Peñalba

Telephone No. 91 3495475

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2019/070533

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2005/114151 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION; NARA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 01/12/2005.	-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2019/070533

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CN103439242 A	11.12.2013	CN103439242B B	11.05.2016
-----	-----	-----	-----
CN106932372 A	07.07.2017	CN106932372B B	06.08.2019
-----	-----	-----	-----
US4822746 A	18.04.1989	US5252494 A	12.10.1993
		US5254477 A	19.10.1993
		US5114864 A	19.05.1992
		US5143853 A	01.09.1992
-----	-----	-----	-----
WO2005114151 A1	01.12.2005	JP2005337730 A	08.12.2005
-----	-----	-----	-----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2019/070533

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD **G01N21/64** (2006.01)

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, G02B

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

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

EPODOC, INVENES, WPI, INSPEC

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	LIU, H. et al.: "Vibration-assisted optical injection of a single fluorescent sensor into a target cell". Sensors and Actuators B: Chemical, 22/05/2015, Nº 220, páginas 40-49 [en línea][recuperado el 14/11/2019]. Ver páginas 41-46.	1-18
A	CN 103439242 A (UNIV SOUTH CHINA NORMAL) 11/12/2013, resumen; párrafos [0005]-[0024]; figuras.	1-18
A	CN 106932372 A (UNIV TONGJI) 07/07/2017, todo el documento.	1, 2, 6, 10-15, 17, 18
A	US 4822746 A (WALT, D.) 18/04/1989, resumen; columna 4, línea 32 - columna 5, línea 13; columna 6, línea 38 - columna 8, línea 10; columna 17, línea 1 - columna 18, línea 61; figuras 4 y 5.	1

☒ 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.
15/11/2019

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
18 de noviembre de 2019 (18/11/2019)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
Ó. González Peñalba
Nº de teléfono 91 3495475

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2019/070533

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	WO 2005/114151 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION; NARA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 01/12/2005.	-

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2019/070533

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
CN103439242 A	11.12.2013	CN103439242B B	11.05.2016
-----	-----	-----	-----
CN106932372 A	07.07.2017	CN106932372B B	06.08.2019
-----	-----	-----	-----
US4822746 A	18.04.1989	US5252494 A	12.10.1993
		US5254477 A	19.10.1993
		US5114864 A	19.05.1992
		US5143853 A	01.09.1992
-----	-----	-----	-----
WO2005114151 A1	01.12.2005	JP2005337730 A	08.12.2005
-----	-----	-----	-----