(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 319 491**

(21) Número de solicitud: 200702623

(51) Int. Cl.:
G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación: **05.10.2007**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **07.05.2009**

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud: **07.05.2009**

(71) Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas** (Titular al 81,25 %)
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universidad Autònoma de Barcelona (Titular al 18,75 %)

(72) Inventor/es: **Esteve i Tintò, Jaume;**
Plaza Plaza, José Antonio;
Gómez Martínez, Rodrigo;
Duch Llobera, Marta;
Fernández Rosas, Elisabet;
Rosa Cano, Enrique de la;
Suárez Gonzalez, Teresa;
Vázquez Pérez, Patricia;
Boya Tremoleda, Patricia;
Sánchez Baeza, Francisco José;
Marco Colas, María Pilar;
González Pinacho, Daniel;
Muriano Castañón, Alejandro;
Nogués Sanmiquel, María del Carme;
Barrios Sanroma, Leonardo y
Ibáñez de Sans, María Elena

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

(54) Título: **Dispositivo intracelular para el estudio de parámetros intracelulares en células, órganos y tejidos.**

(57) Resumen:
Dispositivo intracelular para el estudio de parámetros intracelulares en células, órganos y tejidos.
Esta invención se refiere al diseño y fabricación de un micronano dispositivo sensor de reducido tamaño (en el rango del micrómetro, 10-6 metros al nanómetro, 10-9 metros), el cual es introducible mediante procedimiento conocido, en células aisladas o en tejidos vivos para permitir el estudio y actuación externa en los procesos biológicos, bioquímicos y biofísicos que tienen lugar en su interior. La utilización de esta nueva técnica no implica de antemano y sin otra alternativa, la destrucción, o, cuanto menos, la alteración de la célula. Las técnicas de fabricación empleadas se han tomado de la microelectrónica actual.

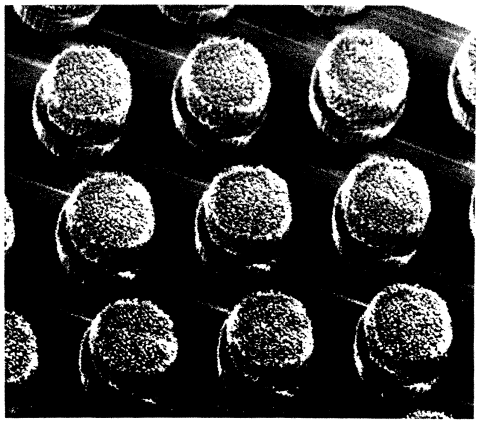


Figura 6

ES 2 319 491 A1

DESCRIPCIÓN

Dispositivo intracelular para el estudio de parámetros intracelulares en células, órganos y tejidos.

Esta invención se refiere a un dispositivo intracelular caracterizado por estar fabricado de modo controlado para ser introducido, o inyectado, dentro de células, órganos y tejidos vivos, y con el cual realizar trabajos en el área de la Biología o de la investigación bio-físico-química, y que comprende una lógica interna operativa.

Sector de la técnica

Esta patente de invención constituye una aplicación de las técnicas de fabricación de dispositivos micronanoelectrónicos en la ingeniería biomédica. El campo de empleo de esta patente, en general, está en todas aquellas actividades, o proyectos, que emplean, o se sirven para sus tareas, de seres vivos, como plantas, animales o microorganismos, también, puede utilizarse en el sector de la bio-físico-química farmacéutica. Otro importante sector de aplicación reside en el diagnostico clínico de patologías.

Estado de la técnica

Existen actualmente, técnicas en Biología que permiten el estudio de células o tejidos tanto de forma intro como extracelular, como pueden ser el llamado Patch Clamp, electroforesis capilar, citometria de flujo, matrices de electrodos y fluorescencia, por citar algunos. Sin embargo, todas estas técnicas tienen sus limitaciones a la hora de registrar la información, como igualmente, al analizar los procesos que tienen lugar en el medio intracelular. Recientemente, el rápido desarrollo de las técnicas de micro y nanofabricación ha permitido la obtención de sistemas microelectromecánicos (se nombran por su acrónimo inglés, MEMS, o MicroElectroMechanical Systems) enfocados al estudio y análisis más específico de células vivas. Estos sistemas han introducido nuevos conceptos como son, el denominado "Lab on a Chip" (LOC) [1,2], el Sistemas de Microanálisis Total (μTAS) [3] o el BioMEMs [4] que ofrecen más oportunidades para el análisis de células o tejidos. Estos dispositivos incluyen estructuras que pueden contener partes móviles como voladizos y diafragmas, estructuras estáticas como canales de flujos y pozos, superficies sensibles funcionalizadas químicamente, y dispositivos eléctricos como resistores y transistores.

En la literatura reciente en este dominio del conocimiento científico, se emplea un nuevo concepto de "laboratorio en una célula" (LIC, Laboratory in a cell) [5]. Esta concepción integra el uso de la unidad biológica "célula", como un laboratorio que realiza operaciones bioquímicas con las avanzadas herramientas micronano tecnológicas, para acceder y analizar, a la postre, los procesos que tienen lugar dentro de ese laboratorio celular. Para hacer esto se han de combinar micronano herramientas y/o dispositivos con materiales o sustancias específicas que respondan o interaccionen con el laboratorio celular. Se citan como ejemplos de estos materiales o substancias, los marcadores fluorescentes, los recubrimientos selectivos de iones específicos y los polímeros fusionables y funcionalizables, ésto es, operables, de modo selectivo.

Procede ahora pues explorar caminos de experimentación que permitan estudiar el interior de la célula. Los métodos de microscopia óptica y fluorescente, empleados hasta hoy en el análisis y observación desde el exterior de la célula, constituyen una herramienta biológica ampliamente experimentada [6,7]. El interés por conocer y estudiar nuevos procesos celulares conlleva la necesidad de desarrollar nuevas técnicas que permitan al experimentador mayor precisión y resolución: a modo de ejemplo, se han de citar aquí las técnicas como la resonancia magnética o el conocido como PET (*Positron Emision Tomography*).

Dado que los procesos celulares se suceden de manera dinámica, la mayor parte de los métodos actuales de determinación de los parámetros celulares se realizan en células manipuladas de una forma que compromete su viabilidad de forma irreversible. La necesidad de determinar parámetros celulares en células vivas bajo condiciones fisiológicas o patológicas, ha impulsado el desarrollo de métodos basados en la introducción de sustancias fluorescentes libres o acopladas a proteínas como también el desarrollo de técnicas del tipo FRET (acrónimo inglés de Fluorescence Resonance Energy Transfer), y, FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching), etc. [8].

Paralelamente, con este objetivo, se han desarrollado otras técnicas basadas en la incorporación de agentes que doten de propiedades fluorescentes a micro/nanopartículas de diferentes tipos, como son polímeros [9], puntos cuánticos o "quantum dots" [10], dendrímeros [11], o materiales como oro, ferrita, platino, cobre etc. Ejemplos de estas técnicas se han venido utilizando desde hace unos años para la construcción de marcadores o de receptores moleculares [12]. También la combinación de partículas de dimensiones nanométricas con propiedades súper o paramagnéticas ha permitido su uso en la identificación de células u orgánulos intracelulares [13], obtención de imágenes de resonancia magnética [14], vehiculización de fármacos [15] o inducción de hipertermia [16,17]. Los primeros sistemas totalmente automáticos para ensayos de tipo inmunoquímico se basaban en la utilización de pequeñas partículas magnéticas [18]. Por otra parte, la incorporación de propiedades fluorescentes a estas micro/nanoparticulas ha ofrecido un nuevo potencial para el estudio de imágenes *in-vitro* o *in-vivo* [19]. Un ejemplo de esto son los denominados Sol gel, derivados de la sílice, que permiten establecer enlaces de tipo covalente con marcadores orgánicos, convirtiéndolos en excelentes materiales para crear nanoparticulas fluorescentes [20].

Otra línea de investigación ya firmemente establecida es la utilización de diversos tipos de micronanopartículas para alterar la célula desde su interior. Ejemplo de ello es la vehiculización de fármacos. Inicialmente se trataba de

un método para proteger el fármaco frente a la acción del metabolismo de degradación, pero con posterioridad se ha desarrollado la tecnología necesaria para dirigir esos fármacos hacia las células diana elegidas utilizando marcadores celulares apropiados que distinguen receptores o proteínas específicos en las células diana. Si bien estas construcciones aún no han llegado a formas comerciales, se está trabajando intensamente en ellas y en su aplicación en el campo de la terapia del cáncer [21,22]. En esta misma linea de investigación, se están empleando dendrímeros para generar nano transportadores multifuncionales que permitan dirigir los agentes terapéuticos a la localización exacta [23].

El desarrollo de herramientas similares para observar el comportamiento de la célula sin alterarla que puedan servir de sensores o actuadores no ha seguido una progresión paralela hasta el momento actual.

La vida media relativamente corta de la mayoría de las micronano partículas y sus moléculas conjugadas en el ambiente intracelular hace imposible el seguimiento de procesos celulares que tengan lugar durante periodos de tiempo prolongados. La alternativa de emplear proteínas fusionadas con marcadores fluorescentes dentro de las células, requiere el empleo de técnicas de transgénia o transfecciones virales, pero ello es técnicamente más complejo y presenta además problemas para su aplicación en humanos. Por tanto, es interesante desarrollar nuevos métodos que proporcionen sensores intracelulares más estables para así lograr la determinación de los parámetros de la fisiopatología celular animal y humana [24]. Ésto haría posible tener capacidad de detectar situaciones patológicas antes de que éstas se manifiesten.

Un ejemplo ilustrativo de la aplicación de estas técnicas, lo constituye la observación de las fluctuaciones de los niveles de concentración del catión Ca^{2+} citoplasmático. Existen varias alternativas electrofisiológicas y fluorimétricas para medir dichas fluctuaciones, una de ellas es la fabricación de micronanoparticulas con moléculas conjugadas que permitiría a los experimentadores o facultativos verificar un nuevo método de determinación de Ca^{2+} que, además de las ventajas de los ya existentes, aportaría estabilidad al agente sensor permitiendo la medición del parámetro celular durante largos periodos de tiempo, como se ha puesto de manifiesto en [25].

En esta misma linea de progreso, varios de los autores de esta Memoria han manifestado [26], recientemente, una concepción similar a lo hasta ahora aquí reseñado. Se trató entonces en un paso preliminar de este trabajo, de una descripción del método seguido en la preparación de unas micronano partículas muy sencillas y elementales, sin entrar aún en la compleja tecnología del dispositivo objeto de esta Memoria. Igualmente, en la referencia [27] se demostró, únicamente, su no toxicidad cuando fueron fagocitadas por macrófagos.

Bibliografía

[1] **Leduc**, P *et al*. Towards an *in vivo* biologically inspired nanofactory. *Nature Nanotechnology Vol 2 Commentary* 3-7, 2007.

[2] **Tudos** A, **Besselink** G, **Schassfoord** R. Trends in miniaturized total analysis systems for point-ofcare testing un clinical chemistry. *Lap on Chip*, 1:83-95, 2001.

[3] **Reyes** D, **Iossifids** D, **Aurooux** P, **Manz** A. Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology, *Anal Chem*, 74:2623-2636, 2002.

[4] **Bharat Bhushan**. Nanotribology and nanomechanics of MEMS/NEMS and BioMEMS/BioNEMS materials and devices Microelectronic Engineering, Volume 84, *Issue* 3, March 2007, Pages 387-412 *Nature Nanotechnology* 2, 3 - 7 (01 Jan 2007) Commentary.

[5] **Andersson** H, van den **Berg** A. Microtechnologis and nanotechnologis for single-cell analysis. *Curr Opin Biotechnol*, 15:44-49, 2004.

[6] **Slavki**, J. Fluoresecent Probes in Cellular and Molecular Biology, *CRC press*:Boca Ratón, Fl, 1994.

[7] **Nuccitelli**, R. *In Methods in Cell Biology*, vol (40): 368, 1994

[8] **Day** RN, **Schaufele** F. Imaging molecular interactions in living cells. *Mol. Endocrinol*. 2005, 19:1675-86.

[9] **Elke** *et al, Journal of Controlled Release* 76 (2001):149-168.

[10] **Benoit Dubertret**, *et al, In Vivo* Imaging of Quantum Dots Encapsulated in Phospholipid Micelles, *Science* 29 November 2002 298: 1759-1762 [DOI: 10.1126/science.1077194] (in Reports)

[11] R. G. **Denkewalter** *et al*., U.S. patent 4,289,872 (1981), N. **Malik** *et al*., U.S. patent 7,005,124, 2006.

[12] "Nanobiotechnology", **Niemeyer**, CM, **Mirkin**, CA Eds. *Wiley-VCH*, Weinheim 2004

[13] **Perrin-Cocon**, L. A.; **Marche**, P. N.; **Villiers**, C. L. *Biochem. J*. 1999, 338, 123-130.

[14] **Koenig**, S. H.; **Kellar**, K. E. *Acad. Radiol*. 1996, 3, 273.

[15] **Kohler**, N.; **Sun**, C.; **Wang**, J.; **Zhang**, M. *Langmuir* 2005, 21, 8858-8864.

[16] **Roger**, J.; **Pons**, J. N.; **Massart**, R.; **Halbreich**, A.; **Bacri**, J. C. Eur. Phys.J.: *Appl. Phys*. 1999, 5, 321-325.

[17] **Moroz**, P.; **Jones**, S. K.; **Gray**, B. N. *Int. J. Hyperthermia* 2002, 18, 267- 284

[18] Q.A. **Pankhurst**. *et al*., Applications of Magnetic Nanoparticles in Biomedicine, *J. Phys D. Appli. Phys*, 36,(2003):177-181

[19] **Bertorelle**, F. **Wilhelm**, C., **Roger**, J., **Gazeau**, F., **Ménager**, C. and **Cabul**, V. *Langmuir* 2006, 22, 5385-5391.

[20] **Burns**, A., **Ow**. H., and **Wiesner**, U., *Chem. Soc. Rev*. 2006, 35, 1028-1042

[21] M. **Ferrari**, U.S. patent 6, 107,102 (2000).

[22] **Ferrari**, M., Cancer NanoTechnology: Oportunities and Challenges, *Nature Reviews* Vol 5, 2005.

[23] **Torchilin**, VP 2006 Multifunctional nanocarriers. *Advance Drug Delivery Reviews*, 58:1532-1555

[24] **Park** EJ, **Brasuel** M, **Behrend** C, **Philbert** MA, **Kopelman** R. Ratiometric optical PEBBLE nanosensors for real-time magnesium ion concentrations inside viable cells. *Anal Chem*. 2003, 75:3784-91.

[25] **Macrez** N, **Mironneau** J. Local Ca2+ signals in cellular signalling. *Curr Mol Med*. 2004, 4:263-75.

[26] M. **Duch**, J. **Esteve**, R. **Gómez**, J.A. **Plaza**, L. **Barrios**, E. **Ibáñez**, E. **Fernández**, C. **Nogués**, Micro-Nano Devices for Single Living Cell Studies, Presentación en la Conferencia de Dispositivos Electrónicos (CDE-2007), 31 enero al 2 febrero, Madrid, España, 2007.

[27] E. **Fernández**, E. **Ibaflez**, L. **Barrios**, JA. **Plaza**, J. **Esteve**, M. **Duch**, R. **Gómez**, C. **Nogués**, Macrophages capability to phagocyte silicon microparticles analysed by confocal laser scanning microscope, Focus On Microscopy Conference, April 10-13, Valencia, Spain, 2007.

Descripción de la invención

Descripción breve

Esta Memoria de invención se refiere a la fabricación controlada de micronano dispositivos intracelulares que permitan su introducción en el interior de células vivas, o tejidos vivos, con la misión de funcionar como sensores neutros o actuadores en el interior celular. Estas micronano herramientas, pueden tener cierta circuitería añadida con el fin de convertirlas en unos dispositivos inteligentes al servicio del ingeniero o del investigador. La invención pretende resolver la limitación existente actualmente en los campos de la biología y de la medicina que, de una manera tradicional, han estudiado las células y los tejidos como si se tratase de un macro conjunto integral y, así mismo, se añade a esto, que las técnicas experimentales empleadas hasta ahora, que lo han hecho siempre desde el exterior. Sin duda, la posibilidad que surge al disponer de micronano dispositivos capaces de introducirse dentro de las células de un tejido vivo, constituye una técnica avanzada que permitirá, tanto el estudio celular neutro, como alteraciones en su naturaleza intrínseca. También posibilita el direccionamiento de dichos dispositivos a zonas concretas en el interior de ese medio biológico con objetivos científico-técnicos.

Expresado de un modo más concreto, la invención aquí presentada se refiere a verdaderos dispositivos intracelulares que sirvan para el estudio *in vivo* de parámetros en diferentes procesos dentro de células y en tejidos. Los dispositivos intracelulares comprenden uno o varios elementos sensores para determinar parámetros químicos y/o físicos intracelulares y con capacidad de registro y/o emisión de una señal observable por los operadores. Se fabrican con tecnología microelectrónica y nanofabricación que se caracteriza por tener dimensiones en el rango de 20 nm a 5 μm. Igualmente, se preparan en grandes cantidades, con forma y dimensiones bien definidas, y, todos ellos idénticos entre si, como es típico de la fabricación microelectrónica.

Descripción detallada de la invención

Esta invención pretende resolver la limitación existente actualmente en los campos de la biología y de la medicina que, desde siempre, han estudiado y manipulado células y tejidos como un conjunto integral y, tradicionalmente, desde el exterior, por tanto, tratando de no afectar la actividad biológica intracelular.

El dispositivo de la invención es por lo tanto intracelular para ser introducido o inyectado, dentro de células, órganos y tejidos vivos y con el cual realizar estudios biológicos o trabajos de investigación bio-físico-química *in vivo*, caracterizado porque comprende las siguientes partes:

a) un sustrato de silicio monocristalino con orientación cristalográfica bien determinada,

b) una forma geométrica variable, a determinar según el tipo de trabajo o estudio, a realizar,

c) unas dimensiones físicas laterales comprendidas entre los 50 nanómetros y las 5 micras, y un espesor entre 20 nanómetros y 2 micras,

d) una o varias superficies en donde, mediante la técnica de la micro nano litografía, se han trazado estructuras lógicas operativas observables desde el medio externo al celular, u orgánico, por medio de técnicas apropiadas,

e) una o varias de sus superficies cubiertas, mediante la técnica de la micronano litografía, por materiales que presentan una reactividad superficial diferenciada.

La superficie cubierta del dispositivo puede quedar recubierta, a su vez, por una sustancia con actividad biológica que permita la funcionalidad del dispositivo fabricado, para dirigirlo a una determinada región de la célula o detectar algún compuesto químico, por ejemplo, dicha sustancia con actividad biológica puede estar seleccionada entre moléculas fluorescentes, proteínas, anticuerpos y protectores de muerte célular.

El dispositivo intracelular de la invención puede comprender motivos lógicos operativos complejos, tales como dispositivos MENS y NEMS.

La superficie cubierta del dispositivo puede quedar recubierta, a su vez, para formar motivos lógicos, por compuestos funcionalizados con diferentes receptores moleculares que actúan como sensores de la señal química y la transforman en una señal medible mediante sistemas externos no invasivos de la organización celular.

La presente invención se basa en que los inventores han observado que los dispositivos intracelulares fabricados, de dimensiones micro o nano (dimensiones físicas laterales comprendidas entre los 50 nanómetros y las 5 micras, y un espesor entre los 20 nanómetros y las 2 micras), unido a la impresión de bien determinados rasgos trazados de forma selectiva y controlada en las superficies mediante las técnicas de litografía y crecimiento, son capaces de introducirse intracelularmente y actuar como sensores o actuadores de distintas actividades biológicas (como se manifiesta en el ejemplo 1) y permiten, a su vez, el estudio *in vivo* de parámetros en diferentes procesos dentro de las células y los tejidos.

El termino micronano dispositivo intracelular se refiere a un dispositivo fabricado con tecnologías, microelectrónicas y de nanofabricación, que puede ser introducido, o fagocitado, dentro de células vivas y tejidos y allí realizar funciones bien determinadas de detección, tal y como lo efectúa un elemento sensor cualquiera, y, además de eso, también puede servir para hacer cambios de funcionalidad celular. Pero es más, estos dispositivos intracelulares pueden comprender uno o varios elementos sensibles, o aptos, para determinar parámetros químicos y/o físicos intracelulares e, igualmente, con capacidad de registro y/o emisión de una señal que sea observable y medible por los experimentadores. La manera de llevar a cabo un buen número de determinaciones y actuaciones, todas ellas casi en un mismo tiempo, se logra mediante la definición e implementación de una llamada "lógica interna operativa"

Se define esta lógica interna como la colocación en la superficie del dispositivo de una serie de trazos o motivos (logrados mediante aplicación de técnicas conocidas como la litografia y otras varias mencionadas más adelante). Esos trazos o motivos son necesarios para que el dispositivo pueda efectuar todas y cada una de las funciones o tareas, biofisico-químicas, para las cuales se ha diseñado. Cada trazo o motivo de una lógica corresponde a una funcionalidad bien determinada. La fabricación de dispositivos micronano electrónicos con una lógica interna, fijada en función de unas previsiones experimentales, es la principal aportación de esta patente de invención, ya que no aparecía descrita anteriormente en las referencias [26, 27]. La gran ventaja industrial de estos dispositivos reside en el hecho de que se pueden fabricar con una bien experimentada tecnología microelectrónica y de nanofabricación, ambas caracterizadas por lograr dimensiones reducidas (en el rango antes mencionado), y que a su vez que se pueden producir en grandes cantidades, bajo formas y dimensiones distintas, y todas bien elegidas por el diseñador, como se logra en la fabricación microelectrónica.

Se trata ahora de mencionar las variables celulares observables mediante estos dispositivos inventados. Si se emplean como un sensor, se dirá entonces que se mide alguno de los llamados, de forma general, "Parámetros intracelulares físicos". Se trata en este caso de magnitudes físicas observables en el interior de las células como puedan ser, la viscosidad, temperatura y presión. Del mismo modo se hablará de los "Parámetros intracelulares químicos", que serán todas aquellas magnitudes químicas medibles, como, por ejemplo, el pH o el potencial redox. Aun más, tal y como se utiliza en la presente invención el término "Parámetro intracelular biológico", se refiere así, de igual manera, a cualquier magnitud que ponga en evidencia la presencia de determinados compuestos biológicos, o bien su acción dentro del medio. Para una mayor comprensión se citarán en este caso, la concentración de iones, la actividad enzimática o la presencia de proteínas y ligandos, etc. Es preciso comentar aquí, igualmente, que sí el dispositivo se utilizase como actuador, éste también podría servir para la vehiculización de substancias como medicamentos o para la eliminación de la célula mediante una acción como la hipertermia o por un tóxico.

Los dispositivos de esta patente se pueden fabricar en formas y dimensiones distintas en función del trabajo a realizar. Por tanto, no presentan, únicamente, una forma esférica y sí pueden tener dimensiones elegidas bajo un

criterio técnico. A su vez, un distintivo de esta patente, pueden contener una o más funciones lógicas diferentes, en un mismo dispositivo. Entendiendo cómo se ha dicho líneas arriba, por función lógica operativa interna cualquier deposito particularizado por su naturaleza y su forma, que permite realizar una determinada medida u observación de un parámetro o actividad en el interior de la célula residente.

Fabricación de micronanodispositivos intracelulares

La forma, dimensiones físicas y composición de los dispositivos presentados en esta Memoria de Patente dependen de la función a desarrollar. En la figura 1.A se muestra una vista en perspectiva de una posible geometría con forma de paralelepípedo con anchura A y longitud L. Donde (1) representa el material que hace de substrato y (2) la superficie de la estructura sobre la cual se podrá funcionalizar o realizar un micronanodispositivo MEMS (Microelectromechanical System) o NEMS (Nanoelectromechanical System), según el trabajo a realizar. En la figura 1.B se muestra una sección del dispositivo con espesor E.

Se ha dicho ya,que la función o trabajo a realizar implica dimensiones, forma y colocación de los trazos de la lógica interna, por la cual se va a fabricar el dispositivo. Para eliminar la posibilidad de daño celular es preferible diseñar el dispositivo con esquinas redondeadas para lo cual se ha elegido la geometría con forma de disco con diámetro D y espesor E, como se muestra en perspectiva en la figura 2.A y una sección del mismo en la figura 2.B.

Las Figuras 1.A y 2.A muestran en detalle dispositivos con forma de paralelepípedo y disco, respectivamente, con dimensiones laterales, L, A y D, preferentemente entre 50 nm y 5 μm y espesores, E, entre 20 nm y 2 μm. Estos dispositivos se fabrican con un substrato de silicio monocristalino de orientación cristalográfica (100) (1), u otro cualquiera, a conveniencia.

En general, se deposita por evaporación en ultra alto vacío sobre el substrato mencionado anteriormente, cualquier sustancia con actividad biológica suficiente para permitir la funcionalización del dispositivo con varios objetivos: detectar alguna sustancia química presente, localizarlo, poder dirigirlo a una determinada región de la célula o tejido. En particular el dispositivo intracelular va a tener una o varias de sus superficies cubiertas durante el proceso de fabricación, por materiales con una reactividad química superficial diferenciada. Estos materiales pueden ser oxido o nitruro de silicio, oro, platino, cobre u otros metales, óxidos metálicos de carácter ácido o alcalino como el de titanio, hierro, tantalio, boro, o silicatos o siliciuros de metales compatibles como el de tantalio, hierro, aluminio, etc, que a su vez pueden ser recubiertos por moléculas fluorescentes, proteínas, anticuerpos, sustratos, drogas antitumorales, protectores de muerte celular. La Figura 3 muestra una sección recta de un micronano dispositivo intracelular, como el de las Figuras 1 y 2, en el cual se ha cubierto la superficie (2) con algunas sustancias diseñadas (3) para su funcionalización.

Para determinadas aplicaciones, el micronano dispositivo puede también estar estructurado en tres dimensiones para constituir un MEMS o un NEMS intracelular, posibilidad que ofrece la tecnología de microfabricación y nanofabricación. Este hecho permite que en un solo dispositivo estructurado en varias dimensiones se le pueda dotar de una o varias funcionalidades.

La fabricación de los dispositivos de la presente invención se realiza con técnicas de microfabricación y nanofabricación tomadas de la industria microelectrónica y de la fabricación de MEMS y NEMS. Las técnicas de litografía se emplean durante el proceso de fabricación para definir la lógica interna y las áreas en dónde colocar los materiales funcionales dentro de los dispositivos. Dichas técnicas a aplicar en virtud de la funcionalidad que se le quiera dar al dispositivo, se escogerán entre las disponibles; son: la fotolitografía óptica, la litografía de rayos x, la litografía mediante cañón de haz de electrones, fotolitografía con microscopios de AFM (*Atomic Force Microscope*) y fotolitografía por nano-impresión. La resolución de la técnica litográfica determina las dimensiones del rasgo a definir. De hecho, actualmente, la fotolitografía óptica basada en láseres excímeros de ArF, emisión de luz de longitud de onda 193 nm puede llegar a realizar dimensiones cercanas a los 50 nm utilizando técnicas de optimización de la resolución. Para dimensiones menores, se utilizan técnicas de nanolitografía que emplean ondas de menor longitud como son, la litografía de ultravioleta extremo (longitudes de onda de 11-13 nm) o la litografía por haz de electrones (longitud de onda de 0.01 nm).

Las Figuras 4.A - 4.F muestran con detalle la fabricación de micronano dispositivos intracelulares por técnicas microelectrónicas. Se parte de un substrato que es una oblea de silicio (4) sobre la cual se tiene una capa de sacrificio (5), la Figura 4.A. Esta capa sacrificial puede estar depositada o crecida por cualquier método utilizado en microelectrónica, crecimiento térmico, deposito químico en fase de vapor, pulverización catódica (sputtering), evaporación u otros métodos comunes actualmente. Sobre esta capa se tiene la capa que definirá el micronano dispositivo intracelular (6). Un procedimiento alternativo a este por más barato es recurrir a la utilización de obleas SOI (Silicon On Insulator, silicio sobre aislante), donde el óxido enterrado hace la labor de capa de sacrificio y el silicio de la capa superior es el que define el material del micronanodispositivo intracelular.

Durante el proceso de fabricación, la oblea es cubierta por una capa de fotorresina positiva o negativa (7), Figura 4.B. Esta fotorresina es expuesta a la radiación, o al haz de electrones, a través de una máscara con orificios que definen las formas de los dispositivos de la manera usual en las fábricas de dispositivos microelectrónicos. Dependiendo de si se trata de resina positiva o negativa las zonas irradiadas o no irradiadas son eliminadas (8) con un revelador, Figura 4.C. Si se emplea como máscara la fotorresina (7) remanente, se ataca la capa que definirá el chip intracelular (9) hasta llegar a la capa de sacrificio (5), Figura 4.D. Este ataque se realiza con técnicas de grabado químico utilizando

mezclas ácidas o básicas, técnicas de grabado físico como ataques secos de iones reactivos, o, finalmente, un ataque por bombardeo de iones de galio. Seguidamente se elimina (10) la resina que se utilizó como máscara por un medio conveniente, plasma de oxigeno, decapantes de resina, acetona u otros disolventes, (Figura 4.E). Finaliza el proceso de fabricación del dispositivo con un ataque (11), principalmente en atacantes en fase líquida o vapor, de la capa de sacrificio (5) y los dispositivos intracelulares (12) quedan liberados, Figura 4.F. Entre los distintos pasos y procesos de fabricación se. llevan a cabo tratamientos químicos regulares con el fin de limpiar el sustrato de posibles restos anteriores.

Los materiales a emplear en esta fabricación controlada y que forman parte del rasgo funcional son crecidos, o depositados, por varios métodos "*ad hoc*" distintos; térmicamente, químicamente en fase vapor o asistidos por plasma. En el caso concreto de los materiales metálicos, éstos se depositan mediante técnicas de evaporación en alto vacío. Otras posibles técnicas, a emplear según sea el caso, son sputtering o pulverización catódica, métodos químicos y electroquímicos (electroless, electroplating).

Para la fabricación de dispositivos intracelulares más complejos se utilizan combinaciones de las técnicas microelectrónicas y de fabricación de MEMS y NEMS. Por ejemplo, en la Figura 5 se muestra un esquema en el cual se tienen varias capas de sacrificio (5) y n capas para definir dispositivos intracelulares (6) con el objeto de obtener un mayor número de dispositivos a la vez. En la Figura 6 se muestra una fotografía mediante microscopio de rastreo por electrones de dispositivos fabricados por la tecnología mostrada en Figura 5.

Hasta aquí se ha descrito, por simplicidad, un proceso para la fabricación de micronano dispositivos de un único material para medir una sola variable biológica, una única funcionalidad. En el caso de que el técnico o ingeniero precise la medida de varios parámetros biológicos intracelulares deberá repetir los pasos o añadir otros.

Las Figura 7.A y 7.B muestran una vista en perspectiva y un vista de una sección de un dispositivos con forma de paralelepípedo, con dos materiales (1) y (14) con dimensiones laterales, L y A, preferentemente entre 50 nm y 5 μm y espesores, El y E2, entre 20 nm y 2 μm. Estos dispositivos tienen la superficie de uno de los materiales (13) cubierta por una sustancia bioquímica y tienen la superficie del otro material (2) cubierta por otra sustancia bioquímica. Las sustancias que recubren los diferentes materiales poseen diferentes utilidades. Estas sustancias pueden detectar diferentes parámetros intracelulares, o unas se pueden utilizar para detectar y las otras para mover el micronano dispositivos intracelular a la zona precisa en la célula, donde se han de detectar los parámetros intracelulares o unas pueden servir para detectar y las otras para visualizar la partícula.

Las distintas lógicas internas depositadas van a ser observadas simultaneamente, luego entre ellas no debe haber ninguna interferencia o solapamiento. En la figura 8 se muestra un dispositivo como el de la invención con 5 materiales diferentes, separados unos de otros. El material (1) hace de substrato y puede unirse al resto de materiales (14), (15), (17) y (19). Estos materiales presentan superficies diferentes (2), (13), (16), (18) y (20) que pueden estar recubiertas con distintas moléculas, que tendrán diferentes utilidades. Estas sustancias pueden detectar diferentes parámetros intracelulares, unas se pueden emplear para detectar y las otras para dirigir el dispositivo intracelular a la zona precisa donde queremos revelar los parámetros intracelulares. Todos estos materiales pueden estar funcionalizados con diferentes receptores moleculares que actúan como sensores de la señal química (responden a la presencia de una especie química y a su concentración en el medio) y la transforman en una señal medible desde el exterior celular mediante sistemas no invasivos o destructores de la organización celular. Entre los posible receptores se encuentran los substratos selectivos de enzimas o proteínas de cascadas de comunicación química intracelular, receptores de especies químicas sencillas, como ionóforos selectivos (captadores de cationes o aniones inorgánicos, incluido el H+ y OH-) o anticuerpos selectivos. La Figura 8 muestra una vista en perspectiva de un dispositivo con 5 materiales no alineados (1), (14), (15), (17) y (19) con dimensiones laterales de cada material preferentemente entre 50 nm y 5 μm y espesores de cada capa entre 20 nm y 2 μm. A modo de ejemplo, en la Figura 9 se muestra una fotografía mediante microscopio de rastreo por electrones de un dispositivo fabricado en el cual se tienen dos materiales separados y bien diferenciados, oro y polisilicio.

Por el mismo procedimiento se pueden preparar dispositivos intracelulares formados por varios materiales diseñados, mediante la técnica de fotolitografía, de manera tal que forman un código de barras, la única condición que han de guardar entre sí, es que sean biocompatibles. La Figura 10 muestra un dispositivo de la invención en el cual hay un material (1) que actúa como substrato y un material (14) que forma un motivo similar a un código de barras. Las superficies (2) y (13) se pueden recubrir con substancias específicas para dotarlas de una función escogida. Los materiales que pueden servir para definir los rasgos del motivo son, preferentemente, el silicio, o cualquiera de sus derivados como, el silicio policristalino, óxido de silicio, nitruro de silicio y materiales típicos de microelectrónica y MEMS y NENS como aluminio, cobre, oro, platino, cobalto, níquel, cromo, titanio, plata. La única condición impuesta en las aplicaciones es que sean biocompatibles. En el caso concreto de que se trate de fabricar dispositivos unos MEMS o NEMS la configuración de los materiales sobre el sustrato es aquella que sea necesaria para su realización. También, si uno de los materiales tiene características magnéticas, en este caso particular, se puede conseguir el direccionamiento del dispositivo mediante un campo magnético. Se debe comentar también, que por objetivo de la invención, se pretende de lograr su inocuidad tras la entrada en la célula (por fagocitosis, inyección o lipofección) y no causar su muerte, ni afectar a su entera viabilidad a largo plazo.

En resumen, esta invención proporciona al experimentador, o persona involucrada, los micronano dispositivos que permiten la medida de parámetros intracelulares físicos, químicos o biológicos o la actuación sobre elementos

de la misma y la posibilidad de monitorizar la medida o la actuación, desde el exterior. Estos dispositivos pueden también permitir la detección de anormalidades. Como modo operativo general, los elementos descritos detectan y/o cuantifican señales intracelulares, *in vivo*, de tipo químico o físico *in vivo*, mediante dispositivos que no afectan a la viabilidad y evolución de las células en estudio. Los dispositivos de esta invención pueden monitorizar varios parámetros simultáneamente, funcionalizando selectivamente dispositivos con diferentes materiales, lo cual permite un mejor seguimiento de los procesos y evolución celulares.

La lectura u observación del dispositivo se realiza mediante técnicas no invasivas. Una aplicación de alto valor técnico es la detección de señales celulares transitorias que marcan una ruta de respuesta celular definida y que quedan reveladas de forma permanente con estos dispositivos sin necesidad de separar subcultivosi celulares de forma periódica, como se hace en el momento presente, y donde no se garantiza la recogida de señal, en especial cuando no solo importa su existencia sino también su intensidad. Se pueden medir emisiones ópticas, como por ejemplo, detectar la fluorescencia emitida al reaccionar con algún parámetro bioquímico a detectar, o se puede tener una red de difracción o filtro, incorporado al dispositivo, que cambie con el parámetro intracelular a medir ópticamente desde el exterior de la célula o tejido. Además, los dispositivos intracelulares también se pueden detectar con procedimientos electromagnéticos.

Descripción detallada de las figuras

Figura 1: Representación de un dispositivo intracelular con forma de paralelepípedo de acuerdo con la invención.

1.A vista perspectiva y 1.B vista de una sección de una geometría con forma de paralelepípedo con anchura A, longitud L y espesor E, donde (1) representa el material que hace de substrato y (2) la superficie del dispositivo.

Figura 2: Representación de un dispositivo intracelular de la invención con forma de disco.

2.A vista perspectiva y 2.B vista de una sección, de una geometría con forma de disco con diámetro D y espesor E, donde (1) representa el material que hace de substrato y (2) la superficie del dispositivo.

Figura 3: Representación de una vista de una sección de un dispositivo intracelular con las superficies cubiertas por una sustancia con actividad biológica. Sección recta de un ispósitivo intracelular, como el de las Figuras 1 y 2, en el cual se ha cubierto la superficie (2) con algunas sustancias diseñadas para su funcionalización (3).

Figuras 4.A - 4.F: Esquema del proceso de fabricación de los dispositivos intracelulares basado en tecnología microelectrónica, procesos fotolitográficos y ataques de capas. Sección recta que muestra el proceso de fabricación de un dispositivo intracelular, con un soporte principalmente oblea de silicio (4), sobre el cual se tiene una capa de sacrificio (5) y donde (6) representa el material que formará los dispositivos. Para definir los dispositivos se deposita una capa de fotorresina (7) la cual es eliminada de determinadas zonas (8). Los dispositivos se definen mediante un ataque de las zonas (9) de la capa (6). La fotoresina es eliminada (10). Finalmente se realiza el ataque (11) de la capa sacrificial y los dispositivos (12) quedan liberados.

Figura 5: Esquema de un dispositivo intracelular basado en la tecnología presentada en la figura 4 en el cual se tienen apilados una serie de capas de materiales de sacrificio (5) y capas de materiales que forman los dispositivos (6), de tal manera que al atacar las capas sacrificiales se fabrica un elevado número de dispositivos de una sola vez.

Figura 6: Fotografía SEM de dispositivos intracelulares de polisilicio fabricados según la tecnología de la figura 5. Aumento, 6600X.

Figura 7: Representación de un dispositivo intracelular con forma de paralelepípedo con dos materiales.

7.A vista perspectiva y 7.B vista dé una sección de un dispositivo con forma de paralelopípedo con dos materiales (1) y (14) apilados de espesores El y E2 y dimensiones laterales, L y A con dos superficies (2) y (13) de dos materiales diferentes.

Figura 8: Representación de un dispositivo intracelular con 5 materiales diferentes separados. Se muestra una vista en perspectiva de un dispositivo con 5 materiales no alineados (1), (14), (15), (17) y (19) que permiten tener 5 superficies de diferentes materiales (2), (13), (16), (18) y (20).

Figura 9: Fotografía por microscopio de rastreo de electrones (SEM) de un dispositivo intracelular con dos materiales separados, oro y polisilicio. Aumento, 23000x.

Figura 10: Representación de un dispositivo intracelular con 2 materiales donde uno de ellos define un código de barras. El material (1) actúa como substrato y el material (14) actúa como código de barras. Las superficies (2) y (13) pueden ser recubiertas con substancias que presenten actividad biológica.

Figura 11: Fotografía con microscopio confocal (objetivo 60X) de células HeLa. En el interior de una de las células se observa un micronano dispositivo funcionalizado que emite fluorescencia (señal blanca de 3 micras).

Ejemplo de realización de la invención

Visualización de dispositivos intracelulares cubiertos de un colorante vital en células HeLa, una linea inmortalizada de células derivada del carcinoma de cérvix

El objetivo de este ejemplo es demostrar que los dispositivos fabricados pueden ser introducidos en las células. La conclusión final de este ejemplo es que el procedimiento presentado no es tóxico y funciona como un sensor de la viabilidad celular.

A. *Fabricación y empleo de los dispositivos intracelulares*

Para fabricar los dispositivos dotados de una lógica interna apropiada a este caso se toma una oblea de silicio monocristalino con orientación cristalográfica (100) de un diámetro de 100 milímetros y de espesor 525 micras. Sobre ella se deposita una capa de óxido de silicio de 1 μm de espesor, mediante la técnica PECVD (Plasma Enhance Chemical Vapour Deposition). Este material crecido se utilizará como capa de sacrificio en pasos posteriores del proceso. A continuación se deposita sobre la capa de óxido 0.5 μm de silicio policristalino por deposición química en fase vapor (en inglés esta técnica es conocida por las siglas LPCVD, Low Pressure Chemical Vapour Deposition). Sobre esta capa se definirán los dispositivos intracelulares.

Cómo se ha expuesto en los párrafos de la Descripción Detallada se realiza ahora el proceso fotolitográfico, esto es, la definición de los dispositivos, con la ayuda de una fotorresina positiva. Esto se lleva a cabo a irradiando dicha fotorresina con luz monocromática (longitud de onda 435 nm) un retículo de vidrio sobre el cual hay grabados, en cromo, las geometrías de los dispositivos. Para el caso concreto de este Ejemplo de la Invención se dispone de formas geométricas circulares de 3 μm de diámetro. Tras irradiar la fotorresina HiPR 6512 durante 5 a 8.5 segundos, se revela ésta en una disolución de revelador ODP 462 de Fujifilm. Aquella sólo queda presente sobre las zonas de la capa de silicio policristalino que definirán los dispositivos intracelulares. Se pasa al proceso siguiente. Consiste en un ataque vertical a toda la superficie de silicio policristalino en un equipo del proceso DRIE (Deep Reactive Ion Etching). Este ataque seco de plasma finalizará al alcanzar la capa de óxido de silicio. Después de este paso del proceso, los dispositivos están ya bien definidos pero todavía unidos al substrato por la capa de óxido. Seguidamente, se quita la fotorresina que se utilizó como máscara hasta dejar la oblea totalmente limpia de compuestos orgánicos. Los dispositivos intracelulares, con geometría circular (en este ejemplo) tienen un espesor de 0.5 μm dado por la capa de silicio policristalino depositado y un diámetro de 3 μm.

Con el fin exclusivo de separar los dispositivos preparados de su sustrato, se expone la oblea, con la cara grabada boca abajo, a unos vapores de ácido fluorhídrico (HF) concentrado al 49%, durante un tiempo aproximado de 40 minutos, de manera que el óxido enterrado se disuelva totalmente, incluso por debajo de los chips hasta que estos quedan liberados. Los vapores y los productos de la reacción de grabado del óxido se condensan en la superficie y hace que los dispositivos intracelulares queden adheridos ligeramente a la superficie de la oblea. Para separarlos de dicha superficie se sumerge la oblea en etanol y se somete a la acción de ultrasonidos. Finalmente, los dispositivos fabricados quedan flotando en el baño de etanol. Seguidamente, se separan del líquido mediante centrifugación a 14000 rpm durante 5 minutos. De cada oblea se obtienen más de 150 millones de dispositivos intracelulares idénticos.

Se pasa acto seguido a los pasos del proceso de activado y recubrimiento de los dispositivos intracelulares. Una fracción de ellos (1 mililitro puede contener algo más de un millón), fabricados por el sistema anterior se lavan y activan mediante la aplicación sucesiva de tratamientos en alcohol etílico, agua desionizada ultrapura, una mezcla de ácido nítrico y alcohol metílico (1:3), agua desionizada ultrapura y etanol. Después de cada etapa se separan los dispositivos por centrifugación a 15000 rpm y se extrae el líquido sobrenadante. A continuación se tratan con un agente heterobifuncional selectivo para superficies de óxido de silicio y que deja libre un grupo funcional reactivo adecuado para la siguiente etapa. En este ejemplo se trataron los dispositivos con aminopropiltrietoxisilano al 2% en alcohol etílico durante 1 hora, y se eliminó el exceso del reactivo mediante sucesivos lavados con alcohol etílico (de nuevo en cada etapa se separan los dispositivos por centrifugación). La siguiente etapa consiste en la introducción del sensor químico selectivo que en el caso del ejemplo es el diacetato de fluoresceina, capaz de emitir fluorescencia como respuesta a la actividad biológica enzimas (esterasas en este caso). Para ello los dispositivos se tratan con (5,6)-isotiocianato del diacetato de fluoresceina disuelta en dimetilformamida seca (al 0.05%) durante 12 horas en un sistema aislado de la humedad exterior. Otra vez se elimina el exceso de reactivo mediante lavados con dimetilformamida y con tert-butil-metileter. La preparación final se distribuye dispersa en 1 ml de este último disolvente.

En el caso de las partículas recubiertas con diacetato de clometilfluoresceína, el solvente es terbutilmetil éter, que es un disolvente aprótico poco polar y bastante volátil, que mantiene la integridad de la funcionalización. Para su introducción en los diferentes tipos celulares se requerirá un medio acuoso compatible con la viabilidad celular como, por ejemplo, un tampón fostato salino 15 mM pH 7,5. Las partículas se re-suspenden en un volumen adecuado para tener una concentración de partículas suficientes para cada ensayo. Dichos dispositivos se mantienen en el solvente original a 4ºC hasta el momento de su utilización. En el momento del experimento se toma una parte alícuota de dicha suspensión homogeneizada de micronano dispositivos y o bien se deja evaporar el solvente en su totalidad o se centrifugan a 12000 rpm durante 5 minutos, para eliminar el líquido sobrenadante. Posteriormente se añaden 100 microlitros de tampón fosfato pH 7.5 y se vuelve a centrifugar. Se repite el proceso una vez más y se resuspenden las partículas en 5 ml del mismo tampón que contendrán una densidad de partículas comprendidas entre 1000 y 50000

unidades. Los experimentos con microdispositivos se llevaron a cabo en células vivas (línea de células HeLa) para estudiar su funcionalidad y la viabilidad celular y toxicidad de los mismos en experimentos a largo plazo.

En este ejemplo, las células se mantienen creciendo en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (High glucosa) de GIBCO suplementado con 2 mM glutamina, 1% de Penicilina /Estreptomicina y un 10% de suero bovino fetal (a este medio le denominamos medio completo), en una atmósfera de 5% CO_2 a 37ºC, hasta el momento del experimento. Para introducir los microdispositivos de 3 micras de silicio policristalino recubiertos con diacetato de clometilfluoresceína en las células se empleó la lipofección, una técnica rutinaria habitual que emplea la lipofectamina para vehiculizar elementos al interior de las células. En una placa de 24 pocillos con un soporte de cristal (cubreobjetos de 12 mm de diámetro) en el interior de cada pocillo, se depositaron 50.000% células vivas. Al día siguiente, se aspiró el medio, se lavaron las células dos veces las células con medio Opti-MEM (GIBCO, Invitrogen) (el que se usará para la lipofección), y se mantienen con 500 microlitros de este medio durante al menos 1 hora. La mezcla utilizada para la lipofección se realizó con dicho Opti-MEM y con Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Para ello, por cada pocillo se preparó una mezcla con 50 ml de medio Opti-MEM y 1.25 ml de Lipofectamina 2000 (Invitrogen), que se dejó 5 minutos a temperatura ambiente. Por otro lado se preparó la mezcla con los micronanodispositivos en 5 microlitros de PBS (por cada 50.000 partículas) y 50 microlitros de Opti-MEM. Transcurridos los 5 minutos, se mezclaron ambas soluciones y se dejaron de 20 a 25 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se cubren las células con esta mezcla y se incuban a 37ºC de 3 a 5 horas, para hacer que los micronano dispositivos entren en el interior de las células. Posteriormente, se eliminó el medio que contenía las partículas y se añadió un mililitro de medio completo. Dichas células se cultivan de nuevo con una densidad inicial de 25.000 células por mililitro. Al cabo de diferentes periodos de tiempo, desde un día hasta 10 días, las células se fijaron con una disolución de paraformaldehido (PFA) al 4% durante 45 minutos, para ser observadas al microscopio. Transcurrido este tiempo, se lavan las células dos veces con PBS. Para identificar el núcleo se empleó la tinción con 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) durante 10 minutos. El soporte con las células se coloca sobre un portaobjetos con medio de montaje Fluoromount-G (SouthernBiotech) para su observación al microscopio.

B. *Determinación de la viabilidad celular. Observación por fluorescencia*

La identificación de los dispositivos cubiertos con diacetato de clometil fluoresceína en el interior de estas células, se llevo a cabo mediante la visualización con microscopía confocal. Los dispositivos de silicio policristalino son visibles por reflexión del láser y los sucesivos cortes en el eje z al microscopio demuestran que están en el interior de las células. La observación de las células después de 3 y 7 días de cultivo, permite comprobar que los micronano dispositivos se mantienen en el interior de las células, mientras estas se dividen activamente. Las células con los microdispositivos se mantuvieron vivas durante varios días mostrando enteramente la no toxicidad del proceso seguido.

Los micronano dispositivos recubiertos con diacetato de clometil fluoresceína presentes en el interior de las células además de ser detectados por reflexión del láser, muestran fluorescencia de color verde, debido a que las esterasas (enzimas presentes en el citoplasma celular) activas de las células vivas hidrolizan el diacetato de fluoresceína y emite color verde (Figura 11). Todos los micronano dispositivos que se localizaron por microscopía confocal en el interior de las células emitían fluorescencia, no así los que permanecen en el exterior, demostrando que no son tóxicos, ya que las células siguen vivas, y, por lo tanto, su capacidad como sensores de la viabilidad celular.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo intracelular para ser introducido o inyectado, dentro de células, órganos y tejidos vivos y con el cual realizar estudios biológicos o trabajos de investigación bio-físico-química *in vivo*, **caracterizado** porque comprende las siguientes partes:

a) un sustrato de silicio monocristalino con orientación cristalográfica bien determinada,

b) una forma geométrica variable, a determinar según el tipo de trabajo o estudio, a realizar,

c) unas dimensiones físicas laterales comprendidas entre los 50 nanómetros y las 5 micras, y un espesor entre 20 nanómetros y 2 micras,

d) una o varias superficies en donde, mediante la técnica de la micro nano litografía, se han trazado estructuras lógicas operativas observables desde el medio externo al celular, u orgánico, por medio de técnicas. apropiadas,

f) una o varias de sus superficies cubiertas, mediante la técnica de la micronano litografía, por materiales que presentan una reactividad superficial diferenciada.

2. Dispositivo intracelular según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la superficie cubierta queda recubierta, a su vez, por una sustancia con actividad biológica que permita la funcionalidad del dispositivo fabricado, para dirigirlo a una determinada región de la célula o detectar algún compuesto químico.

3. Dispositivo intracelular según la reivindicación 2, **caracterizado** porque dicha sustancia con actividad biológica está seleccionada entre moléculas fluorescentes, proteínas, anticuerpos y protectores de muerte célular.

4. Dispositivo intracelular según una de las reivindicaciones 1 a 3 **caracterizado** porque comprende motivos lógicos operativos complejos.

5. Dispositivo intracelular según la reivindicación 4 **caracterizado** porque comprende dispositivos MENS y NEMS.

6. Dispositivo intracelular según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la superficie cubierta queda recubierta, a su vez, para formar motivos lógicos, por compuestos funcionalizados con diferentes receptores moleculares que actúan como sensores de la señal química y la transforman en una señal medible mediante sistemas externos no invasivos de la organización celular.

7. Uso del dispositivo intracelular definido en cualquiera de las reivindicaciones anteriores para realizar estudios biológicos o trabajos de investigación bio-química *in vivo*, que permiten la medida de parámetros físicos, químicos y biológicos dentro de la célula, órganos y tejidos vivos, o para la actuación sobre elementos de la misma y hacer posible monitorizar la medida desde el exterior.

8. Uso del dispositivo intracelular definido en cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 6 para monitorizar varios parámetros celulares simultáneamente lo que permite un mejor seguimiento de la evolución celular.

9. Uso del dispositivo intracelular definido en cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 6 para detectar señales celulares que marcan una ruta de respuesta celular definida y que quedan puestas de manifiesto de forma permanente sin necesidad de separar subcultivos celulares de forma periódica.

10. Uso de un dispositivo intracelular definido en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 6 como actuador para la vehiculización de substancias o para la eliminación de la célula mediante una acción como la hipertermia o por un tóxico.

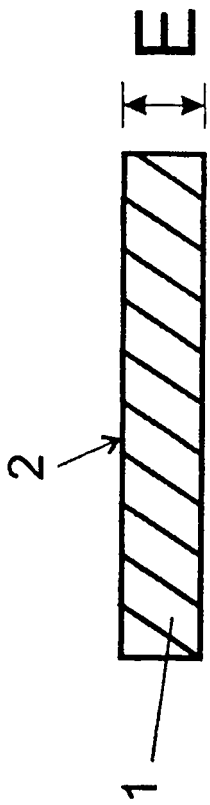


Figura 1.B

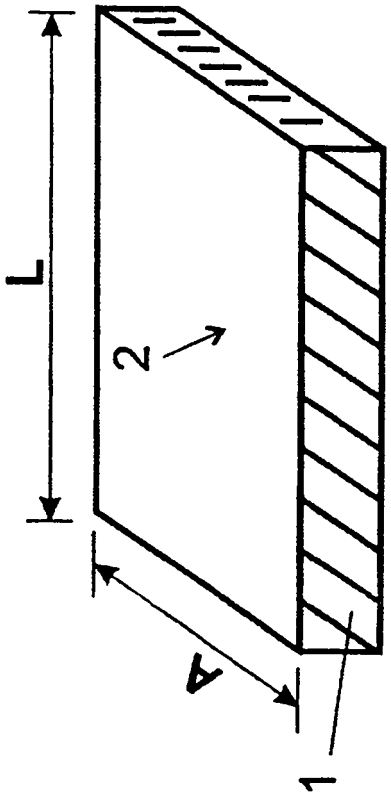


Figura 1.A

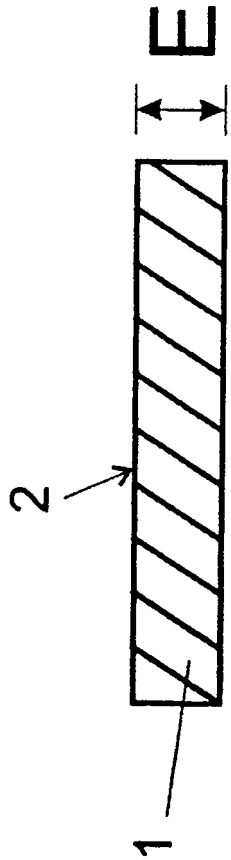


Figura 2.B

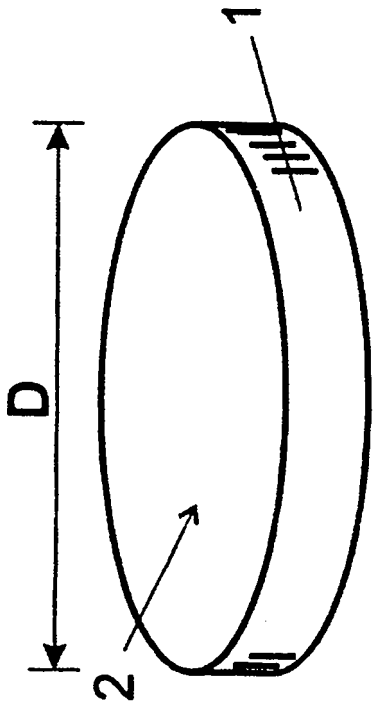


Figura 2.A

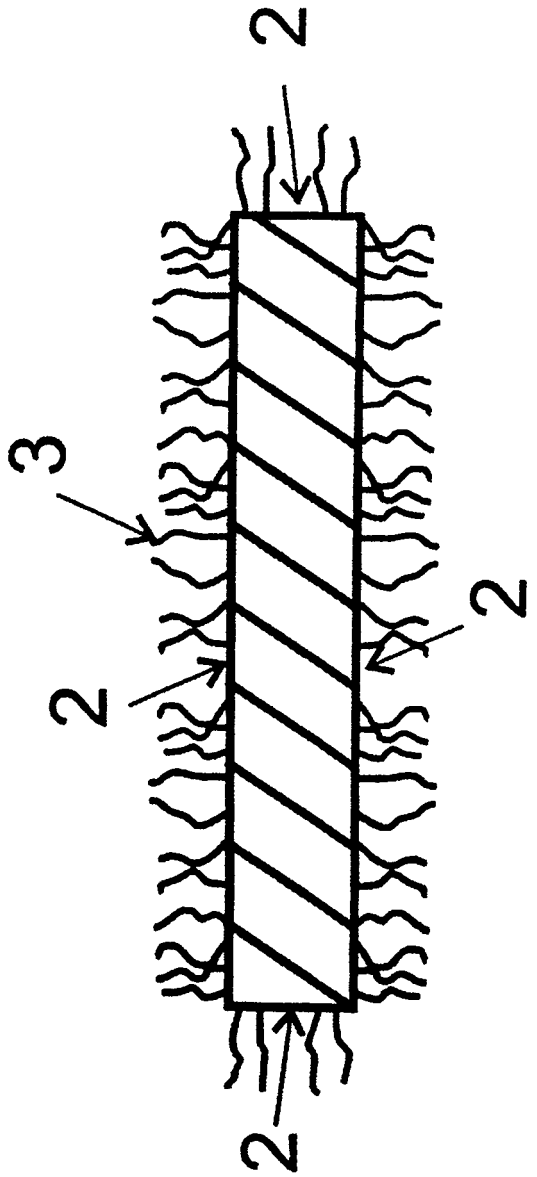


Figura 3

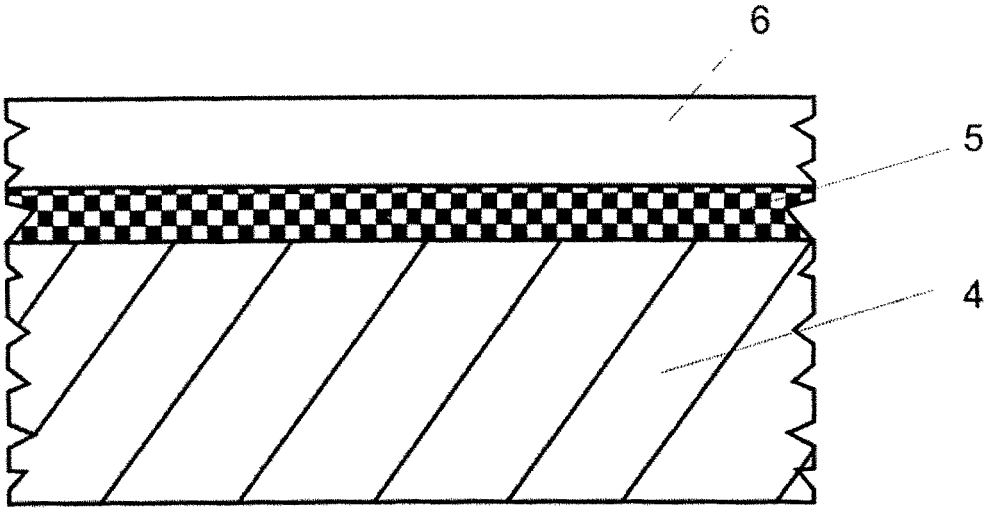


Figura 4.A

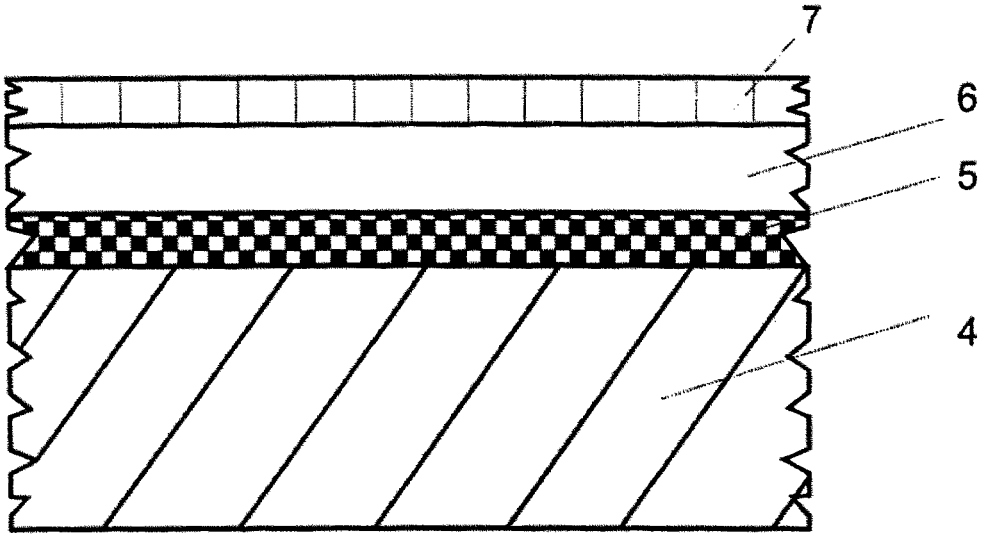


Figura 4.B

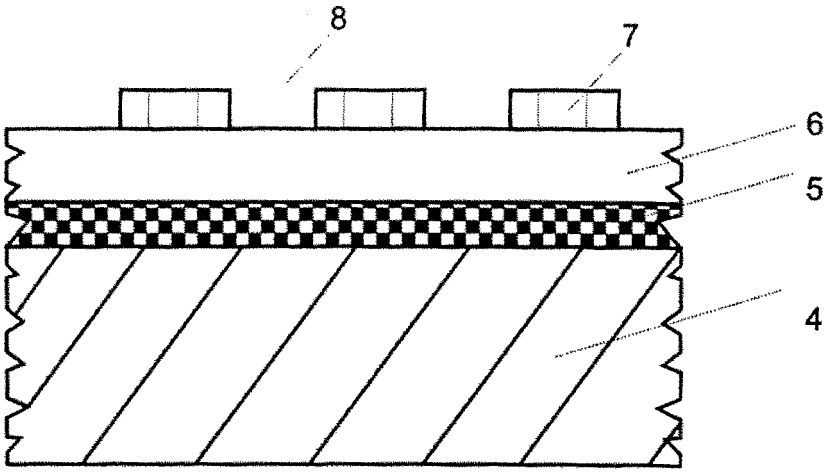


Figura 4.C

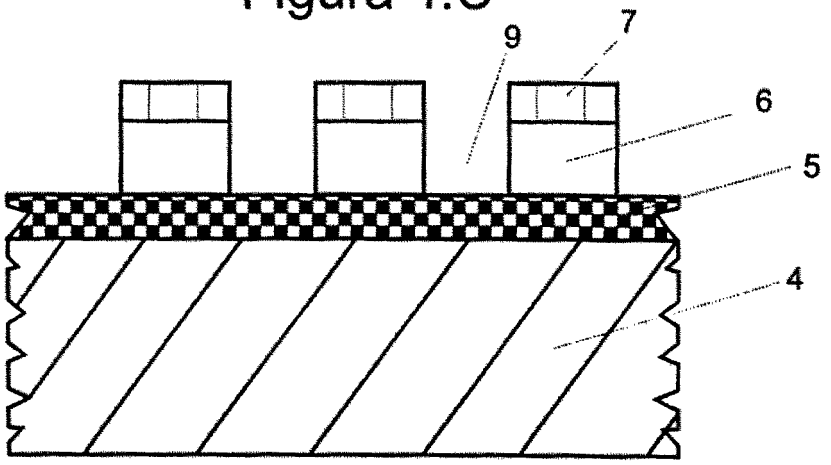


Figura 4.D

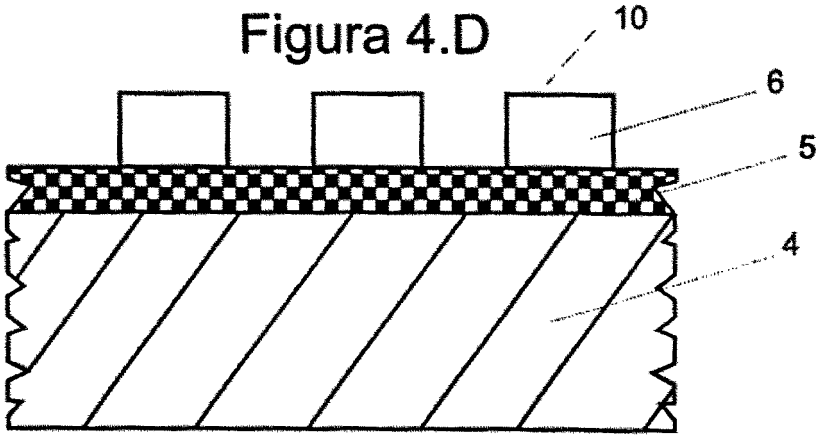


Figura 4.E

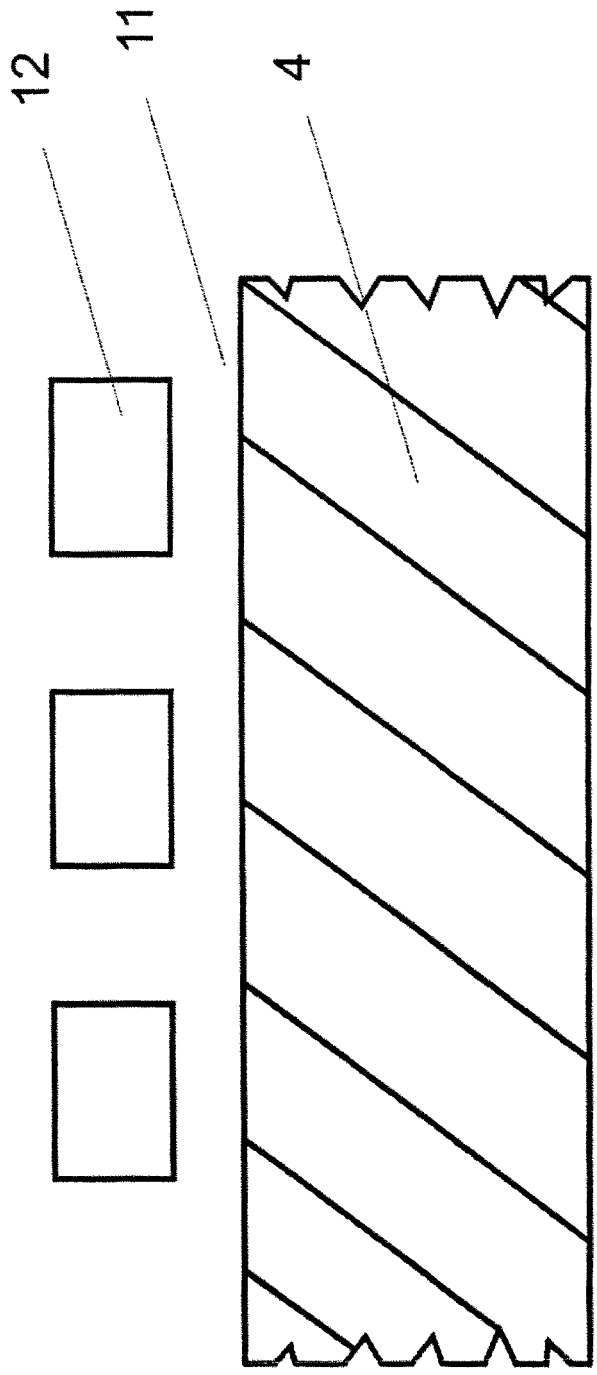


Figura 4.F

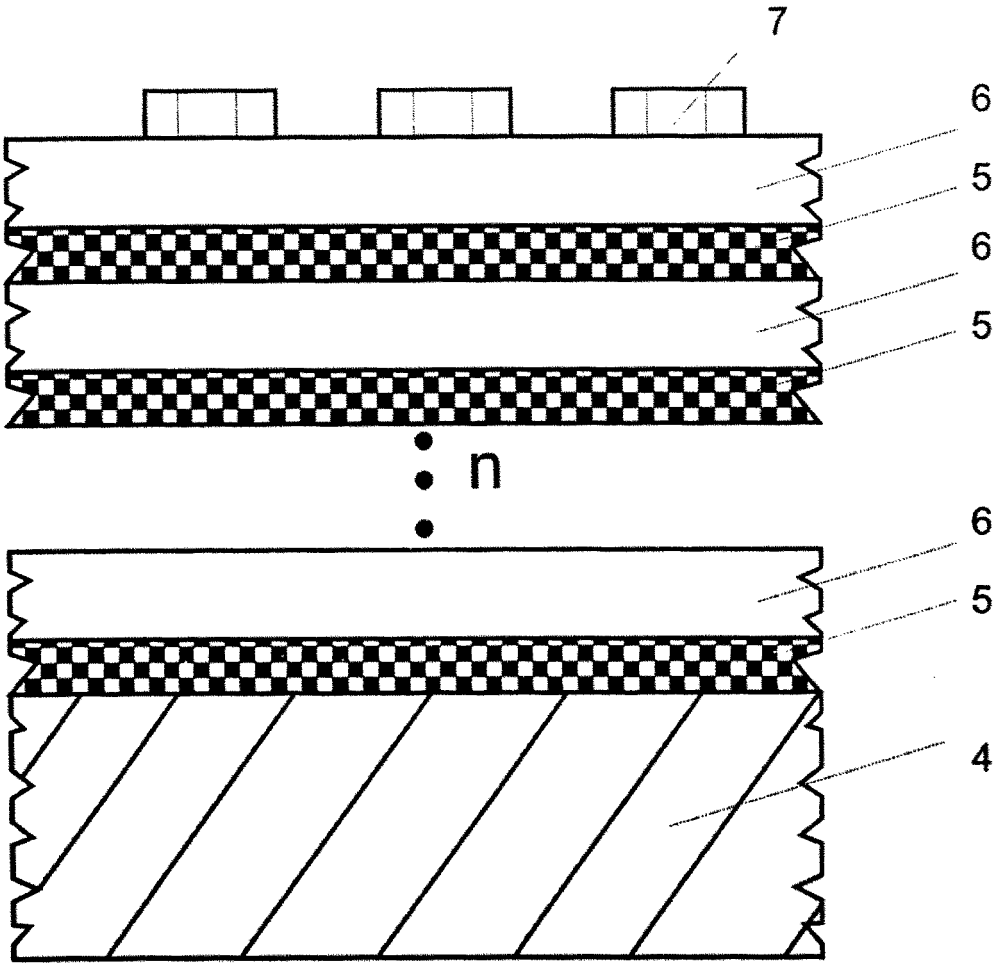


Figura 5

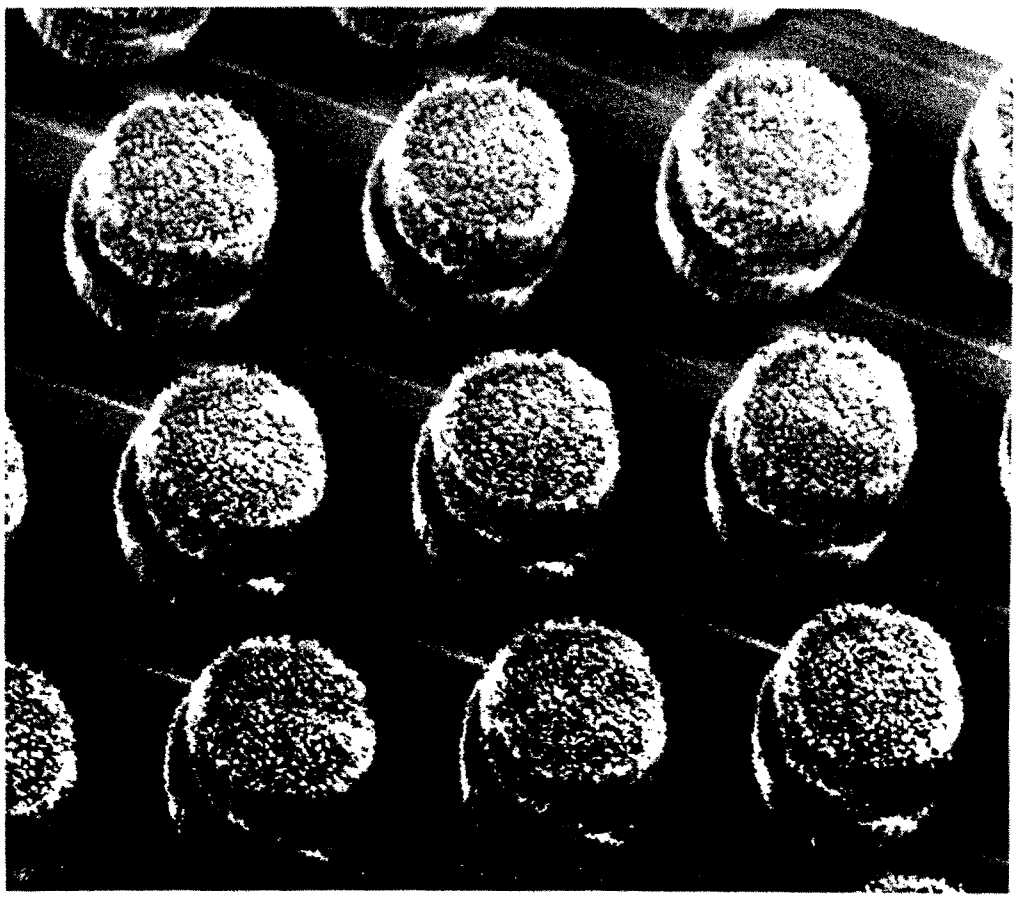


Figura 6

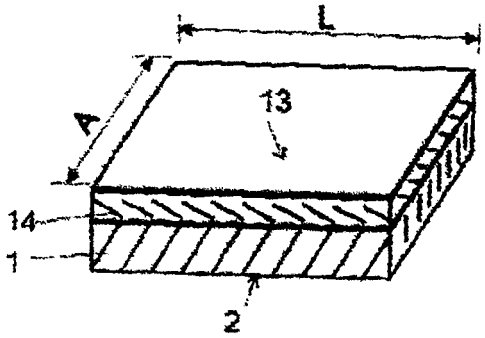


FIG. 7 A

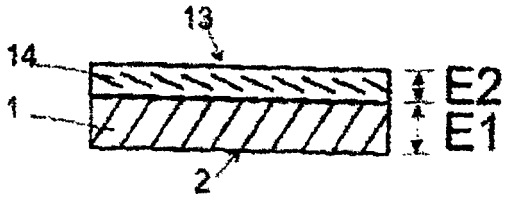


FIG. 7 B

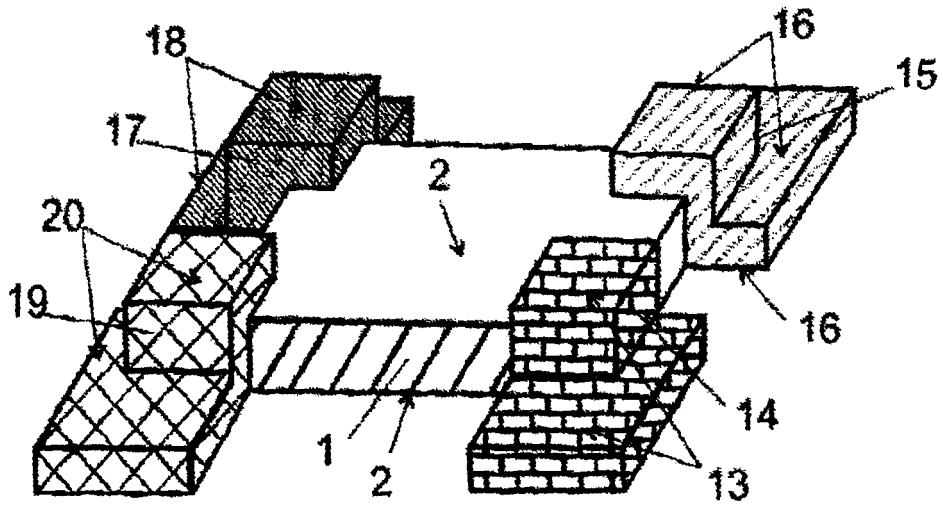


FIG. 8

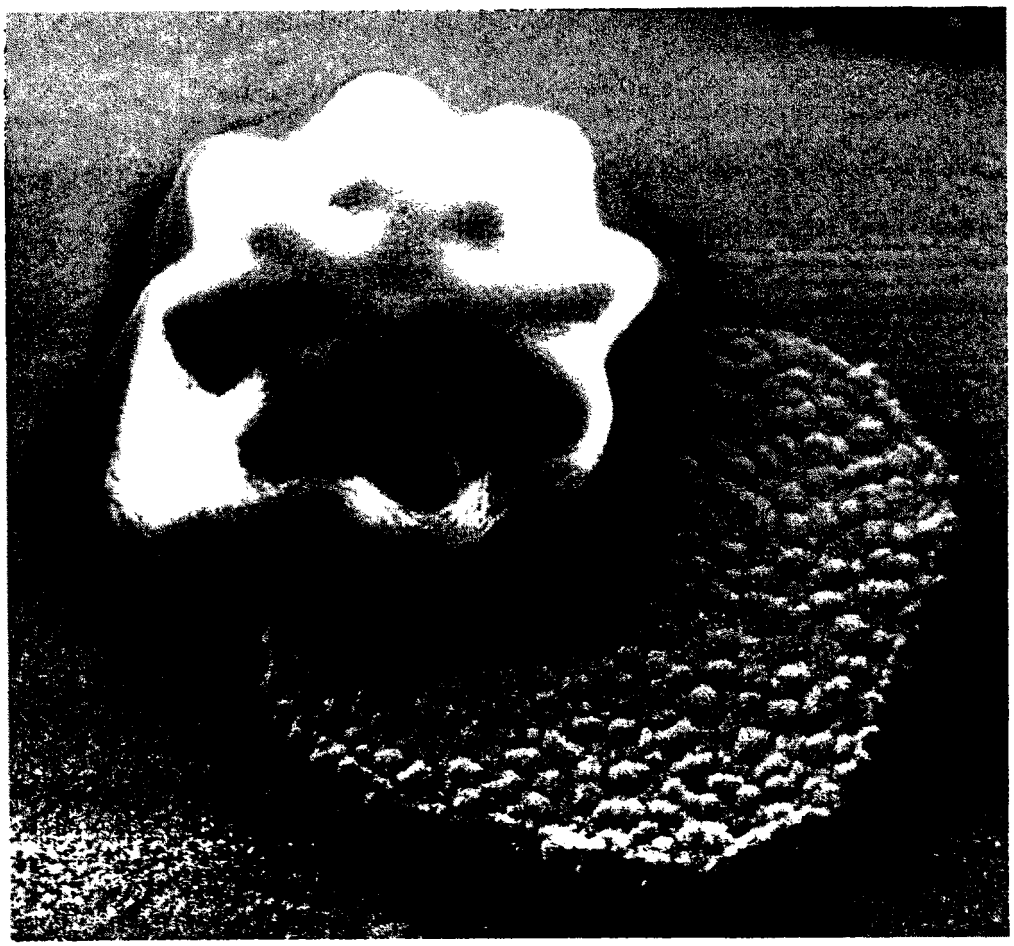


Figura 9

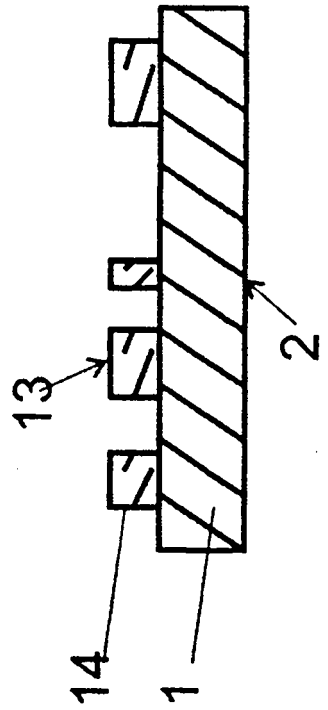


Figura 10.B

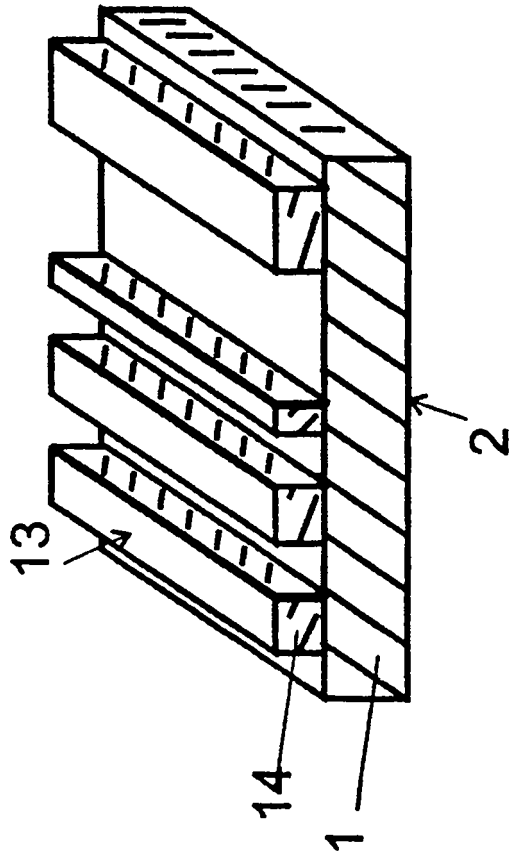


Figura 10.A

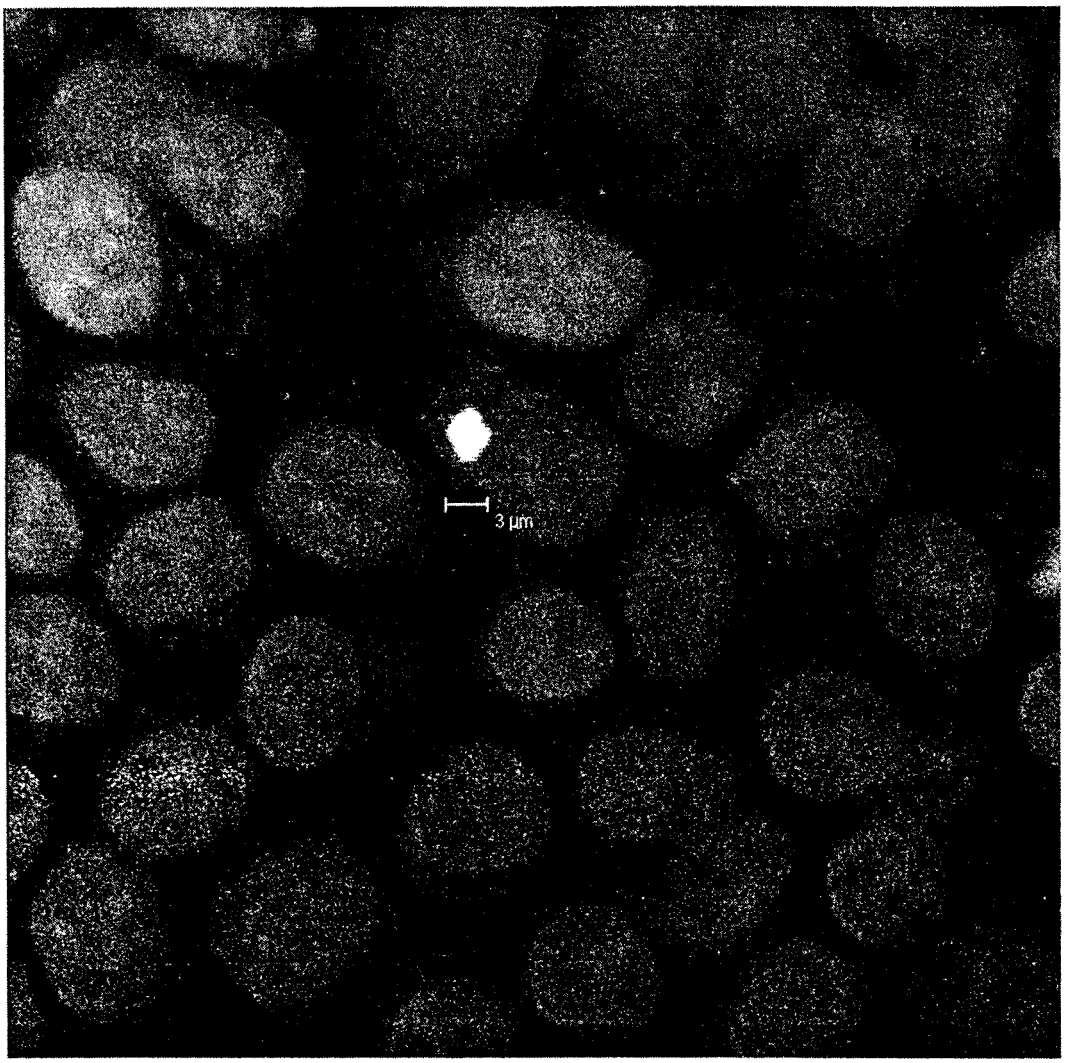


Figura 11

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) ES 2 319 491

(21) Nº de solicitud: 200702623

(22) Fecha de presentación de la solicitud: **05.10.2007**

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ZHI PING XU et al. "Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery" CHEMICAL ENGINEERING SCIENCE. Febrero 2006 Vol. 61, Nº 3, páginas 1027-1040; apartados 2.1,2.4,3.4,4.1-5.	1-10
X	GB 2433589 A (UNIV. NEWCASTLE) 27.06.2007, página 4, líneas 21-37; página 17, líneas 27-37; página 18, líneas 4-37; página 30, líneas 20-38.	1-10
X	JONGHOON CHOI et al. "Cytotoxicity of the photoluminiscent silicon nanocrystals" Nanoengineering: Fabrication, Properties, Optics and Devices IV. Proc. of SPIE. Agosto 2007 Vol. 6645 66451Q-1; apartados 2.1,4.	1-10
A	S.K. SAHOO et al. "The present and future of nanotechnology in human health care" Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine 2007 Vol. 3, páginas 20-31.	1-10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
20.04.2009	V. Balmaseda Valencia	1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)

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

G01N, C12Q, A61K

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

OPINIÓN ESCRITA

Nº de solicitud: 200702623

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 20.04.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones		**SÍ**
	Reivindicaciones	1-10	**NO**
Actividad inventiva	Reivindicaciones		**SÍ**
(Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-10	**NO**

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

Base de la Opinión:

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

1. Documentos considerados:

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	CHEMICAL ENGINEERING SCIENCE Vol. 61, N3, páginas 1027-1040	Feb-2006
D02	GB 2433589 A	27-06-2007
D03	Proc. of SPIE. Vol. 6645 66451Q-1	Agost-2007

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

El objeto de la presente invención es un dispositivo intracelular (con base de silicio y tamaño nanométrico) y su uso como elemento sensor de actividad biológica.

El documento D01 describe el uso de partículas inorgánicas como vehículo celular. En concreto, partículas esféricas de sílice con tamaños comprendidos entre 5nm-100nm (apartados 2.1, 2.4) que se funcionalizan con moléculas orgánicas (aminosilanos, poli(L-lisina), etc.) favoreciendo así su endocitosis celular (apartados 3.4, 4.1 - 5).

El documento D02 describe la funcionalización de nanopartículas de sílice con tamaños del orden de 2nm para su uso en la detección simultánea de señales luminiscentes y Raman en el interior celular. En dicha funcionalización se utilizan moléculas biológicas tales como DNA, RNA, enzimas, anticuerpos, péptidos, etc. (página 4, líneas 21-37; página 17, líneas 27-37; página 18, líneas 4-37; página 30, líneas 20-38).

En el documento D03 se estudia la citotoxicidad de nanocristales de sílice fotoluminiscentes. Para ello se emplean nanopartículas de sílice con un tamaño medio de 5nm, comprobándose la ausencia de efectos tóxicos o inflamatorios tras su incubación con una línea celular de macrófagos murinos (RAW 264.7) (apartados 2.1 y 4).

Así por tanto se considera que las características técnicas recogidas en las reivindicaciones 1-10 derivan directamente y sin equívoco de los documentos D01-D03.

En consecuencia, se considera que el objeto de dichas reivindicaciones carece de novedad y no implica actividad inventiva (Artículos 6 y 8 de la L.P.).