

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 258**

51 Int. Cl.:

G01N 21/552 (2014.01)

G01N 21/55 (2014.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2012 E 12725020 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.08.2015 EP 2732265**

54 Título: **Dispositivo de sensor de SPR con nanoestructura**

30 Prioridad:

14.07.2011 EP 11174058

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.12.2015

73 Titular/es:

**THE EUROPEAN UNION, REPRESENTED BY THE
EUROPEAN COMMISSION (50.0%)**

**Rue de la Loi, 200
1049 Brussels, BE y
PLASMORE SRL (50.0%)**

72 Inventor/es:

**VALSESIA, ANDREA;
MARABELLI, FRANCO;
GIUDICATTI, SILVIA;
MARCHESINI, GERARDO;
ROSSI, FRANÇOIS y
COLPO, PASCAL**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 554 258 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Dispositivo de sensor de SPR con nanoestructura.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a sistemas de detección basados en resonancia de plasmones superficiales y más específicamente a un dispositivo de sensor de SPR con una nanoestructura adecuada para su utilización, entre otras cosas en, pruebas químicas, bioquímicas, biológicas, biomédicas, farmacéuticas y físicas.

10

Antecedentes de la invención

Existen muchos sensores conocidos que utilizan la excitación de plasmones superficiales, denominados sensores de resonancia de plasmones superficiales (SPR), para detectar cambios en el índice de refracción en una muestra adyacente a la superficie del sensor. Dichos sensores de SPR se utilizan, por ejemplo, para cuantificar concentraciones de sustancias en la investigación química, bioquímica, biológica, biomédica o farmacéutica, en diagnósticos clínicos o alimentarios o en mediciones medioambientales (por ejemplo detección de gas o aguas residuales), etc. Muchos sensores de SPR pueden realizar inspecciones rápidas, paralelas y masivas, lo que hace que estos sensores también sean convenientes para cuantificar interacciones moleculares, en particular para estudiar la afinidad y la cinética de reacción en tiempo real entre dos o más moléculas que interaccionan.

Los sensores de SPR se basan en el fenómeno ampliamente conocido de la SPR, que implica una o más ondas electromagnéticas asociadas a la superficie que se propagan por una superficie de contacto entre un material metálico (normalmente oro o plata) y un material dieléctrico. Cada onda electromagnética asociada a la superficie, que se debe a una oscilación colectiva de electrones libres por la superficie de contacto metal-dieléctrico, se propaga con su mayor intensidad en paralelo a esta superficie de contacto y decae exponencialmente a medida que se aleja de esta superficie de contacto.

Las técnicas usadas más comúnmente para la excitación de SPR aprovechan un prisma en la configuración de Kretschmann. En tal caso, el prisma se cubre con una capa de metal noble que soporta plasmones superficiales, y la SPR se excita ópticamente a través del prisma. Ciertamente, la luz puede excitar la resonancia de plasmones superficiales en una superficie de contacto metal-dieléctrico si una componente paralela a la superficie de contacto de la luz incidente y una onda electromagnética asociada a la superficie de la SPR presentan ambas frecuencias coincidentes y longitudes de onda coincidentes. En el estado de resonancia, la luz incidente se absorbe por la superficie de contacto metal-dieléctrico de manera que se acopla con la onda electromagnética asociada a la superficie. Es posible entonces observar esta absorción detectando, por ejemplo, una reducción en la intensidad de la luz que se transmite o refleja por la superficie de contacto metal-dieléctrico. Puesto que el estado de acoplamiento entre la luz y las ondas de plasmones superficiales es muy sensible a cambios en el índice de refracción del medio dieléctrico próximo a la superficie de contacto metal-dieléctrico, los sensores de SPR aprovechan esta sensibilidad en el estado de acoplamiento de la resonancia para detectar cambios en el índice de refracción de un medio dieléctrico midiendo la disminución de la intensidad de la luz reflejada desde la superficie de contacto metal-dieléctrico, mientras esta última se ilumina con un haz de luz de excitación de SPR.

La SPR encuentra aplicación particular en sistemas de biosensor que pueden detectar interacciones entre biomoléculas o moléculas bioquímicas, por ejemplo interacciones entre antígenos y anticuerpos, enzimas y sustancias fundamentales, glándulas endocrinas y receptores, ácidos nucleicos y ácidos nucleicos, etc. En particular, muchos sistemas de biosensor de SPR presentan biorreceptores unidos a su superficie del sensor de modo que detectan cambios en el estado de acoplamiento luz-SPR provocado por cambios en el índice de refracción en la superficie del sensor cuando moléculas bioquímicas o biomoléculas interaccionan con (se unen a) esos biorreceptores. Tales sistemas de biosensor son adecuados para medir, por ejemplo, concentraciones de biomoléculas o moléculas bioquímicas en disoluciones, etc.

Actualmente existen una variedad de equipos de laboratorio basados en detección por SPR. La solicitud de patente US n.º 2009/021.727 describe biosensores basados en la configuración de Kretschman.

Otro sistema de biosensor de SPR para detectar moléculas bioquímicas se conoce a partir del documento US 2008/316.490 y emplea una rejilla metálica en lugar de un prisma.

Más recientemente, el descubrimiento de fenómenos de resonancia de plasmones superficiales localizados (L-SPR) y transmisión mejorada a través de estructuras periódicas de sublongitud de onda de metal, han resultado muy prometedores para aumentar significativamente el tamaño del conjunto de detección, que soporta aplicaciones de alto rendimiento. Para aplicaciones de L-SPR, la tecnología más simple y versátil que se ha explorado en una amplia variedad de áreas tecnológicas es la denominada configuración de detección de conjunto de nanoorificios. En su enfoque clásico, el sensor de SPR comprende un sustrato dieléctrico cubierto con una capa de metal noble en la que está formada un conjunto periódico de nanoorificios, es decir, orificios que presentan dimensiones de sublongitud de onda.

Tales sensores basados en L-SPR con conjuntos de nanoorificios se describen por ejemplo en los documentos WO2008/039212, WO2010/130045 y por Parsons, J. *et al.* en "Localized surface-plasmon resonances in periodic non-diffracting metallic nanoparticle and nanohole arrays" (PHYSICAL REVIEW B 79, 073412 (2009)).

Giudicatti, S. *et al.* en "Plasmonic resonances in nanostructured gold/polymer surfaces by colloidal lithography", PHYSICA STATUS SOLIDI (A), vol. 297. Abril de 2010 (2010-04), páginas 935-942 describen un procedimiento de litografía coloidal para preparar una estructura de soporte de LSPR que consiste en una película de oro perforada por postes poliméricos dispuesta en una red hexagonal 2D.

La utilización de litografía coloidal en la preparación de sensores de SPR también se da a conocer en el documento EP 2 264 438; y en "Bioadhesive nanoareas in antifouling matrix for highly efficient affinity sensors" por Mannelli *et al.*, PROCEEDINGS OF THE SPIE - USA vol. 7035. 2008, páginas 70350Y-1-70350Y-10.

Objetivo de la invención

El objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo de sensor de tipo de conjunto de nanoorificios para detección por SPR que presente una sensibilidad mejorada.

Este objetivo se alcanza mediante un dispositivo de sensor según la reivindicación 1.

Sumario de la invención

Durante el trabajo en la presente invención, los presentes inventores han observado que mientras que las tecnologías actuales han permitido ajustar la geometría de los nanoorificios para adaptar su respuesta electromagnética, la geometría resultante, sin embargo, puede no ser óptima teniendo en cuenta el proceso de detección biológico. En particular los presentes inventores han observado que la posición de los receptores biomoleculares fijados al metal y en los orificios a menudo se establece de manera no apropiada para garantizar la detección más eficaz.

Teniendo en cuenta este problema, los presentes inventores han concebido un dispositivo de sensor plasmónico que presenta una estructura que permite garantizar que la unión de un ligando/analito a un receptor se produce dentro de una zona que presenta una densidad de campo eléctrico intensa.

Por consiguiente, un dispositivo de sensor, en particular un dispositivo sensor de SPR, según la presente invención comprende un sustrato dieléctrico y una capa metálica sobre dicho sustrato adaptada para soportar L-SPR. La capa metálica presenta por lo menos un conjunto de cavidades en la misma, presentando cada una de dichas cavidades una profundidad, una abertura y un fondo cerrado, y ensanchándose dichas cavidades desde la abertura hasta el fondo.

Se apreciará que se proporciona un lecho de material dieléctrico sobre el fondo de cada cavidad de modo que la cavidad ofrece una profundidad reducida (la profundidad aparente) con respecto a su abertura, estando funcionalizada la superficie de lecho para presentar una afinidad de unión a partes de receptor.

Un primer aspecto a tener en cuenta es la forma ensanchada de la cavidad que permite reforzar el campo eléctrico alrededor de la abertura de la cavidad. En segundo lugar, para acercar los receptores a esta zona, de modo que la unión se produzca en la zona de fuerte densidad, el fondo de la cavidad se rellena mediante material dieléctrico que forma un lecho, lo que reduce la profundidad aparente de la cavidad. Por tanto, la profundidad aparente corresponde a la profundidad residual disponible entre la parte superior/abertura de la cavidad y la superficie del lecho.

Además, la superficie funcionalizada del lecho permite fijar sobre la misma unas partes de receptor que, durante los ensayos y las pruebas, se unen con correspondientes analitos/ligandos que pueden estar presentes en la muestra sometida a prueba.

De este modo, la parte de receptor está cerca del campo eléctrico fuerte y la unión de analito al mismo será en realidad en esta zona de campo eléctrico fuerte.

Por tanto, el presente diseño permite diseñar las cavidades para cumplir con los detalles electromagnéticos deseados, mientras que al mismo tiempo se optimiza la posición de las partes de receptor y del complejo que se forma en uso, para una detección óptima.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "parte de receptor" designa cualquier tipo de sustancia que va a fijarse al sensor como sustancia sonda y que presenta una especificidad de unión definida a un analito que va a detectarse. La parte de receptor puede ser cualquier molécula, sustancia química, natural o biológica o parte de la misma; para bioensayos las partes de receptor pueden comprender concretamente: antígenos/anticuerpos, enzimas, proteínas, oligonucleótidos, etc. El término "analito" a su vez designa cualquier molécula, sustancia química,

5 biomolécula o elemento constituyente de interés que va a detectarse por medio del presente sensor como resultado de la especificidad de unión del analito con la parte de receptor fijado en el dispositivo de sensor. El analito puede ser cualquier tipo de ligando, molécula, sustancia biológica, por ejemplo proteínas, enzimas, péptidos, sustancias químicas orgánicas e inorgánicas, oligonucleótidos, anticuerpos, etc. en general cualquier tipo de molécula que puede reconocerse por una reacción bioquímica específica.

10 Con respecto a la forma de las nanocavidades, se prefieren formas trapezoidales o troncocónicas escalonadas o continuas. Sin embargo, los expertos en la materia pueden concebir cualquier forma apropiada, que se ensanche de arriba abajo, que dé como resultado un patrón de campo eléctrico fuerte alrededor de la abertura de cavidad.

15 Como se entenderá, la profundidad aparente de las cavidades está adaptada en función del tipo, y en particular dependiendo de la longitud, de la parte de receptor y el analito. El espesor del lecho de dieléctrico en la cavidad está diseñado por tanto ventajosamente de modo que tras la unión del analito a la parte de receptor, el analito está situado por lo menos parcialmente en la zona del campo eléctrico más fuerte. Esto implica que el extremo de unión de la parte de receptor es contigua a, o parcialmente penetra en, la zona de campo eléctrico más fuerte. En este contexto, puede observarse que el lecho presenta por tanto generalmente un espesor (o altura, es decir la distancia desde el fondo de la cavidad hasta la superficie superior del lecho) que es inferior a la profundidad de la cavidad (o altura).

20 Para aplicaciones biológicas, el espesor del lecho es preferentemente tal que la profundidad aparente se encuentra en el intervalo comprendido entre 10 y 30 nm con respecto a la abertura, más preferentemente entre 15 y 25 nm.

25 El lecho puede estar realizado a partir de cualquier material dieléctrico apropiado que pueda funcionalizarse con o para una parte de receptor adaptada para detectar un analito de interés. El lecho puede consistir por ejemplo en ppAA o nailon.

30 Se indicará además que el lecho puede estar realizado a partir de cualquier material individual, o comprender dos o más capas de material dieléctrico, contribuyendo el espesor de cada capa al espesor global del lecho y permitiendo por tanto ajustar la profundidad aparente de la cavidad. En tal caso es la capa superior la que deberá presentar la capacidad de funcionalización. Por ejemplo, puede formarse una primera capa de material dieléctrico tal como ppAA o nailon con un espesor t_1 ; y puede formarse una capa posterior, que presenta un orificio t_2 , de cualquier dieléctrico funcionalizado adecuado, por ejemplo dieléctrico poroso incluyendo hidrogeles, sobre la primera capa. El espesor global T del lecho es entonces $T=t_1+t_2$; y siendo la profundidad de la cavidad en la capa metálica d_C , la profundidad aparente d_A se calcula como $d_A = d_C - T$.

35 En este contexto puede observarse además que la capa funcionalizada puede incluir moléculas/partes que forman las partes de receptor, de modo que no es necesario ubicar las partes de receptor sobre el sustrato antes de su utilización.

40 En una forma de realización, la capa metálica presenta un espesor de por lo menos 100 nm, preferentemente por lo menos 120 nm. En la práctica, la capa metálica puede presentar un espesor en el intervalo comprendido entre 100 y 200 nm.

45 Las dimensiones de las cavidades se encuentran en el intervalo nanométrico y, como se conoce, para estimular los plasmones superficiales, las cavidades presentan dimensiones de sublongitud de onda, es decir por debajo de la longitud de onda de la luz incidente.

50 Las cavidades en la capa metálica son normalmente perforaciones pasantes, con lo que un fondo cerrado de la cavidad se forma por la superficie de sustrato. Las cavidades en la capa metálica presentan preferentemente una profundidad de por lo menos 100 nm, y más preferentemente en el intervalo comprendido entre 100 y 200 nm.

55 Además, para el funcionamiento en general con luz de sonda seleccionada del espectro UV-VIS-NIR, las cavidades pueden diseñarse para presentar un ancho de abertura (es decir, diámetro o diámetro equivalente) en el intervalo comprendido entre 50 y 250 nm, mientras que el ancho de fondo puede estar en el intervalo comprendido entre 100 y 450 nm.

En este contexto también, la periodicidad del conjunto de nanocavidades, es decir la distancia entre el centro de dos cavidades, puede estar en el intervalo comprendido entre 200 y 1000 nm.

60 Puede utilizarse cualquier metal adaptado para L-SPR para la capa metálica que soporta L-SPR. El metal puede seleccionarse concretamente del grupo que comprende: oro, plata, cobre, platino, aluminio o una aleación que comprende uno o más de los mismos.

65 Ventajosamente, la capa metálica está cubierta por una delgada capa antiincrustante que tiende a evitar la adhesión de proteínas. Como resultado, la fijación de las partes de receptor en la superficie del lecho de dieléctrico, con su superficie funcionalizada, se lleva a cabo más fácilmente. Además, durante las pruebas, menos proteínas y analitos

tenderán a adherirse al metal, lo que mejorará la relación señal a ruido.

En el contexto de la presente solicitud, el término “dieléctrico”, tal como se utiliza para el material del lecho y sustrato, pretende englobar materiales que no son “conductores” y que pueden polarizarse mediante el campo de plasmones y de manera correspondiente, y por tanto comprende materiales dieléctricos tales como zafiro, vidrio o polímeros, aunque también materiales semiconductores apropiados.

Para una facilidad de utilización, puede proporcionarse una capa microfluídica sobre la capa metálica, como es habitual en la técnica. Tal capa microfluídica comprende normalmente canales dispuestos para poner selectivamente las muestras de prueba en contacto con un respectivo conjunto de cavidades.

Normalmente, un conjunto de cavidades estará asociado con un tipo de receptores. Por tanto, la capa metálica puede comprender una pluralidad de conjuntos de cavidades, comprendiendo entonces cada uno de los conjuntos un tipo respectivo de parte de receptor.

El presente sensor puede utilizarse en un sistema de análisis por SPR con un sistema de análisis de luz e iluminación convencional, ya sea con una configuración de fotodetectores o con un sistema de formación de imágenes.

En este contexto, puede observarse que para la utilización en formación de imágenes/microscopía por SPR, la presente SPR presentará un rendimiento sustancialmente mejorado con respecto a los sensores de SPR y L-SPR convencionales. Se conoce que, con los sensores convencionales, la luz de sonda se selecciona como un compromiso entre resolución lateral y sensibilidad. Por el contrario, se apreciará que en el presente sensor de SPR, que utiliza conjuntos de nanocavidades, los plasmones están confinados en una zona estrecha, que lleva a una resolución lateral fina (normalmente entre 100 y 500 nm). Además, la presente estructura de cavidad, reduciendo el lecho la profundidad de la cavidad, permite colocar las partes diana en el campo eléctrico fuerte para una sensibilidad máxima. Como resultado, puede realizarse una formación de imágenes por SPR tanto con una alta resolución lateral como con una alta sensibilidad.

El presente dispositivo de sensor puede utilizarse en muchos análisis por SPR, dependiendo del tipo de partes de receptor fijadas en la superficie de lecho. Entre otros, el presente dispositivo sensor de SPR puede encontrar aplicación para la realización de pruebas en los campos químico, bioquímico, biológico, biomédico, farmacéutico y físico. Más particularmente, los presentes sensores de SPR pueden utilizarse por ejemplo para cuantificar concentraciones de sustancias en la investigación química, bioquímica, biológica, biomédica o farmacéutica, en diagnósticos clínicos o alimentarios o en mediciones medioambientales (por ejemplo detección de gas o aguas residuales), etc.

Se apreciará además que la estructura del presente dispositivo de sensor puede ser de interés en técnicas de detección molecular, química y/o bioquímica diferentes de los sistemas de detección basados en plasmones superficiales. En particular, el presente sensor puede utilizarse ventajosamente en técnicas de detección/análisis en las que la localización y la amplificación del campo electromagnético, tal como permite la presente invención, se refleja en una amplificación de la señal de detección, que puede ser óptica, térmica, eléctrica, etc. Ejemplos de tales técnicas son:

- a. Espectroscopía Raman amplificada por superficie (SERS). En la espectroscopía Raman convencional la luz monocromática procedente de un láser excita los modos de vibración de las moléculas. Estos modos pueden observarse en el espectro de la luz reflejada como picos positivos. La posición espectral de los picos (el espectro de Raman) es característica de la molécula (como una huella). La espectroscopía Raman es una manera única para determinar directamente la presencia y la cantidad de diferentes moléculas presentes en un compuesto. En la SERS convencional, una superficie de sensor nanoestructurada amplifica la señal de Raman (que normalmente es muy débil) haciendo posible la determinación de sustancias a menor concentración. El dispositivo de sensor según la presente invención puede utilizarse ventajosamente en SERS. En tal caso la amplificación de SERS se produce (como en la técnica de resonancia de plasmones superficiales) en la parte superior de la cavidad y puede establecerse ajustando el tamaño y la forma de las cavidades. Exactamente como en el caso del análisis por L-SPR, con el presente dispositivo de sensor es posible ubicar las moléculas que van a detectarse exactamente donde la amplificación de SERS es máxima y así mejorar la sensibilidad de señal.
- b. Espectroscopía de fluorescencia. En la espectroscopía de fluorescencia convencional se excita una molécula fluorescente (fluoróforo) mediante una luz láser y emite luz fluorescente a una longitud de onda diferente. Esta técnica se utiliza como procedimiento analítico cuantitativo para determinar la concentración de moléculas, proteínas, ADN, etc. Con la presente invención, cuando el fluoróforo (conjugado con el anticuerpo secundario o la secuencia de ADN que realiza el reconocimiento) se ubica en la zona en la que el campo eléctrico es máximo, la sensibilidad (es decir la intensidad de la luz fluorescente) puede amplificarse significativamente.

- c. En la ionización por desorción con láser asistida por matriz (MALDI) y en la ionización por desorción con láser asistida por superficie (SALDI) se utiliza un haz de láser de alta densidad para inducir la desorción de los analitos a partir de la superficie para crear iones que pueden analizarse mediante una espectrometría de masas. Se trata de una técnica analítica muy sensible y muy precisa para determinar directamente la concentración de cualquier molécula. Cuando se emplea el presente dispositivo de sensor en SALDI, las moléculas que van a analizarse se ubican donde la intensidad de la luz láser (que induce la desorción) es máxima, aumentando así la eficacia del análisis.

Puede observarse que en estas técnicas de análisis diferentes, los plasmones superficiales también se estimulan localmente mediante la luz incidente y por tanto el campo eléctrico amplificado se obtiene en la abertura de las cavidades, gracias a la forma particular de las cavidades, como en el análisis "sólo" por SPR.

Breve descripción de los dibujos

La presente invención se describirá a continuación, a modo de ejemplo, haciendo referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

la figura 1: es un dibujo básico de un sensor de SPR convencional con conjunto de nanoorificios;

la figura 2: es un boceto que ilustra el principio de diseño del presente dispositivo sensor de SPR;

la figura 3: es un boceto comparativo (no una forma de realización del presente sensor de SPR), que ilustra la ubicación de la parte de receptor en el fondo de la cavidad sin lecho de dieléctrico;

la figura 4: es una vista de diseño de la nanoestructura según una forma de realización del presente sensor de SPR;

la figura 5: es una vista que ilustra el patrón de intensidad de campo eléctrico dentro y alrededor de la nanoestructura;

la figura 6: es un diagrama básico de una forma de realización del sistema de detección por SPR.

Descripción detallada de una forma de realización preferida

a) Diseño de sensor de L-SPR convencional

Como conocen los expertos en la materia, los sensores basados en el efecto de SPR se basan en dos tipos de efecto resonante plasmónico:

- 1) Sensores basados en polaritones de plasmones superficiales (SPP) que son ondas en desplazamiento en la superficie de contacto entre un metal dieléctrico y un metal noble;
- 2) Sensores basados en Resonancias de plasmones superficiales localizados (L-SPR), que son ondas fijas localizadas dentro de nanocavidades de dieléctrico en un material de metal noble o, de manera equivalente, ondas fijas localizadas dentro de nanoestructuras de metal noble en o sobre un medio de dieléctrico.

Evidentemente, en ambos casos los sensores pueden detectar variaciones del índice de refracción en la superficie de contacto de metal.

Se observará que en biosensores de SPR la sensibilidad microscópica (o local) determina la sensibilidad global del sensor. La sensibilidad local se refiere a la longitud de extensión del campo eléctrico de la resonancia plasmónica en el dieléctrico que rodea el metal. Esta longitud se denomina profundidad de penetración.

Normalmente, la profundidad de penetración de L-SPR es del orden de magnitud de 10 nm. La simulación numérica permite la evaluación y el estudio del patrón de distribución de intensidad de campo eléctrico alrededor de las nanoestructuras plasmónicas.

En el diseño convencional de sensores basados en L-SPR con conjuntos de nanoorificios, como se muestra por ejemplo en la figura 1, se realizan orificios/cavidades cilíndricas 2 (por ejemplo mediante haz de iones) en la capa metálica que soporta resonancia de plasmones 4 situada sobre el sustrato dieléctrico 6. En este caso, el patrón de campo eléctrico en la cavidad 2 es máximo a lo largo de las paredes cilíndricas tal como se representa mediante los rectángulos gris oscuro verticales 8 en la figura 1. La distancia típica con respecto a la pared del campo eléctrico más fuerte es de aproximadamente 10 nm.

En aplicaciones de biosensor, las partes de receptor, por ejemplo proteínas, se inmovilizan normalmente en las cavidades, presentando estas partes una especificidad de unión para analitos que van a detectarse en la muestra.

Normalmente, las partes de receptor se fijan por tanto sobre las paredes de las cavidades en las que el campo eléctrico es máximo.

5 Sin embargo, las partes de receptor presentan dimensiones finitas; los anticuerpos presentan por ejemplo una longitud que oscila normalmente entre 10 y 20 nm.

Se entenderá por tanto que con un campo eléctrico de aproximadamente 10 nm, en realidad es la parte de receptor el que se ubica en la zona en la que el campo eléctrico de la resonancia plasmónica es máximo.

10 Cuando el analito alcanza la cavidad, se reconoce mediante la biosonda y se inmoviliza en el propio receptor de biosonda creando un complejo.

Sin embargo, el analito se situará en una zona de la cavidad 2, que está relativamente fuera de la intensidad máxima del campo eléctrico y así no se detectará con la sensibilidad óptima.

15 Esta situación se ilustra en la figura 1, en la que los anticuerpos indicados con 10, que forman las partes de receptor, se fijan sobre las paredes laterales de la cavidad 2. La extensión de los anticuerpos 10 puede compararse con el ancho de la zona del campo eléctrico fuerte 8. El número de referencia 12 indica un antígeno unido a un anticuerpo receptor 10. Este analito 12 presente en la muestra de prueba presenta una especificidad de unión única al anticuerpo 10 y por tanto se combina con el mismo para formar un complejo. Sin embargo, debido a la extensión reducida del campo eléctrico fuerte, esta unión se produce fuera del mismo.

b) Principio de funcionamiento del presente sensor

25 El presente concepto del diseño de sensor se ilustra en la figura 2. Para optimizar la sensibilidad del sensor de L-SPR, los presentes inventores han configurado la geometría de las cavidades para obtener un patrón de campo eléctrico fuerte/amplificado en una zona de la cavidad, y han encontrado medios para disponer las partes de receptor de manera contigua a, o con un solapamiento parcial con, esta zona de campo eléctrico fuerte de modo que los analitos que se unen a las partes de receptor se ubican en este campo eléctrico fuerte, por tanto en una zona de sensibilidad máxima/amplificada.

Haciendo referencia a la figura 2, el presente dispositivo sensor de SPR 50 comprende un sustrato dieléctrico 52 con una capa que soporta L-SPR que comprende una capa de metal noble 53 sobre el sustrato dieléctrico 52 con un conjunto de nanocavidades 54 en su interior (en este caso, por motivos de simplicidad, sólo se muestran un par de cavidades 54). Las dimensiones de las cavidades 54 se denominan normalmente "sublongitud de onda", es decir, son inferiores a la longitud de onda del haz de luz de sonda. Las cavidades 54 están diseñadas para ser asimétricas, es decir, su sección transversal no es constante por toda la profundidad de la cavidad para ser asimétricas por la dirección del haz de luz entrante. Sin embargo, más específicamente, las cavidades 54 presentan una forma que se ensancha desde su abertura 56 hacia su fondo 58, estando formada el fondo cerrado de la cavidad por la superficie del sustrato subyacente 52. La ampliación puede ser continua como en la figura 2, por ejemplo basándose en una forma piramidal o de cono truncado, o estar diseñada como perfil escalonado. La profundidad de la cavidad 54, indicada con d_c representa la distancia vertical de la abertura 56 con respecto al fondo 58. Cuando se ilumina un sensor de SPR de este tipo con la luz de sonda procedente del lado de sustrato, es decir de su lado más ancho, de fondo 58, con un ángulo y longitud de onda apropiados, se excita la resonancia de plasmones. La intensidad de campo de los polaritones de plasmones superficiales es fuerte, alcanzando niveles máximos, alrededor de la sección de abertura 56 de la cavidad, tal como se ilustra mediante el rectángulo 60 en la figura 2.

50 La capacidad para adaptar la respuesta magnética de los conjuntos de nanoorificios se conoce bien en la técnica (véase por ejemplo el artículo de Li, J. *et al.* "Studies of the plasmonic properties of two-dimensional metallic nanobottle arrays" en APPLIED PHYSICS LETTERS 92, 213106 (2008)). Ciertamente, la excitación y radiación de los polaritones de plasmones superficiales son altamente dependientes de la geometría; la resonancia depende del tamaño y la forma de la nanoestructura metálica. También se ha demostrado que la posición espectral de los polaritones de plasmones superficiales es principalmente dependiente del periodo del conjunto de las nanocavidades, mientras que la intensidad de campo y el patrón son fuertemente dependientes de la forma real de la cavidad dispuesta en la capa metálica.

Tal como se mencionó, la forma asimétrica de la cavidad 54 (ampliación desde la abertura hasta el fondo) lleva a una concentración del campo eléctrico más fuerte alrededor de la abertura de la cavidad 56. La geometría/las dimensiones de la cavidad 54 se eligen por tanto para obtener una respuesta electromagnética deseada.

60 Se apreciará que el presente dispositivo de sensor 50 incluye además un lecho 62 de material dieléctrico situado sobre el fondo 58 de la cavidad 54 que reduce la profundidad aparente de la cavidad 54. Por tanto, mientras que el orificio en la capa metálica 53 todavía presenta una profundidad d_c (correspondiente al espesor de la capa metálica - la cavidad es un orificio pasante), el fondo de la cavidad se rellena con material dieléctrico y por tanto parece presentar una profundidad d_A , que representa la distancia desde la parte superior de la abertura 56 hasta la superficie del lecho 62. Este lecho 62 forma una especie de estructura de soporte o pedestal, sobre cuya superficie

63 pueden fijarse unas partes de receptor 64 en la proximidad inmediata de la zona de campo eléctrico fuerte. Por tanto, cuando el analito correspondiente se une a una parte de receptor, se ubica en la zona de sensibilidad máxima. Dicho de otro modo, la cavidad 54 se rellena parcialmente con el material dieléctrico que constituye el lecho 62, de modo que está abierta desde la parte superior de la capa metálica y hueca por la profundidad correspondiente a la profundidad aparente d_A .

Esto se ilustra en la figura 2 en la que el anticuerpo anti-receptor 64 se fija a la superficie 63 del lecho 62 y tiene su extremo opuesto en contacto con la zona de patrón de campo eléctrico fuerte 60. Tras la unión con el anticuerpo 64, el antígeno 66 correspondiente se extenderá entonces en su zona de campo eléctrico máximo 60, por tanto en la zona de sensibilidad máxima.

Con fines comparativos, la figura 3 ilustra una estructura de sensor de SPR que está diseñada con una cavidad cónica similar 54' con respecto al sensor de la figura 2, sin embargo carece del lecho de dieléctrico. Como puede observarse, el anticuerpo 64' se ubicaría en la parte más inferior 58' de la cavidad e incluso tras la unión, el complejo formado estaría bastante alejado de la zona de campo eléctrico más fuerte 60'. Debe tenerse en cuenta que en tales nanoestructuras la profundidad del orificio d_C normalmente no es inferior a 100 nm, mientras que el tamaño típico de un anticuerpo es 15 nm.

Volviendo al presente sensor tal como se muestra en la figura 2, la fijación de las partes de receptor se consigue de manera conveniente a través de una superficie funcionalizada del material que forma el lecho 62. La funcionalización del material se realiza para que presente una unión selectiva a un tipo deseado de partes de receptor, seleccionándose estos últimos dependiendo del tipo de prueba que va a llevarse a cabo. Un material adecuado para el polímero funcionalizado es poli(ácido acrílico) o cualquier polímero dieléctrico con funcionalidades adecuadas para una fijación optimizada de las partes diana.

Aunque en las figuras 2 y 3 el lecho 62 se muestra como una capa individual, puede comprender dos o más capas de material dieléctrico. Por ejemplo una primera capa de material dieléctrico puede situarse sobre el fondo de la cavidad, y una segunda capa de dieléctrico está formada sobre la primera capa. En tal caso, la superficie superior de la segunda capa (o capa superior) forma la superficie del lecho, y el espesor del lecho es la suma de los espesores individuales de cada capa. El material dieléctrico de la segunda capa (o capa superior) presenta la funcionalización deseada para fijar las sondas (partes de receptor); pueden utilizarse dieléctricos porosos incluyendo hidrogeles para la segunda capa/capa superior.

Una forma de realización práctica del presente dispositivo de sensor se ilustra en la figura 4. Características similares se indican por los mismos números de referencia que en la figura 2, aumentados por 100. El dispositivo de sensor 150 está construido según el principio de diseño explicado anteriormente. El dispositivo de sensor 150 comprende un sustrato dieléctrico 152 realizado en vidrio. Una capa de metal noble, en este caso oro, se indica con 153 y se sitúa sobre el sustrato de vidrio 152. Esta capa comprende un conjunto de cavidades 154 formado en la capa de oro, aunque en este caso sólo se muestra una por motivos de simplicidad. La cavidad 154 en el metal presenta una profundidad indicada con d_C . Presenta una sección transversal de ensanchamiento escalonado que consiste en tres secciones: una sección de abertura con un radio R_1 , una sección intermedia con un radio máximo R_2 y una sección terminal con un radio máximo R_3 . Puede observarse que la abertura 156 de la cavidad está configurada como una sección de collar 170 que sobresale ligeramente por la superficie de la capa metálica 153.

La cavidad 154 está rellena parcialmente con material dieléctrico que forma un lecho 162 que reduce la profundidad aparente de la cavidad a una profundidad d_A . La superficie del lecho 162 está funcionalizada para permitir la fijación de partes de receptor sobre la misma, tal como se ilustra mediante los anticuerpos 164 representados en la figura 4.

Para ejemplificar, se realizarán comentarios sobre los materiales y dimensiones, pero no deberán interpretarse como limitativos. En lugar de un sustrato de vidrio 152 pueden utilizarse otros materiales dieléctricos transparentes, por ejemplo policarbonato o PMMA o poliestireno transparente; alternativamente, puede utilizarse un material semiconductor, preferentemente con dopaje bajo). También en lugar de oro, pueden utilizarse otros metales, por ejemplo metales nobles tales como Ag y Pt, o Al. El material dieléctrico del lecho 162 puede ser ppAA, o cualquier otro polímero funcionalizado apropiado. La capa de oro presenta un espesor en el orden de 120 nm alrededor de la abertura de cavidad; la profundidad de la cavidad d_C es por tanto de 120 nm. El espesor del lecho 162 es de 100 nm, con lo que la profundidad aparente d_A es de 20 nm. El radio en la abertura es $R_1 = 50$ nm mientras que en el fondo de la cavidad $R_3 = 200$ nm. De nuevo, estas dimensiones se proporcionan para ejemplificar y de ninguna manera se interpretarán como limitativas.

El patrón de campo eléctrico bajo resonancia plasmónica para la nanoestructura de la figura 4 se ha determinado mediante simulación numérica y la distribución del campo eléctrico se representa en la figura 5. Como puede observarse, teniendo en cuenta las suposiciones anteriores de formas y dimensiones, existe una zona de campo eléctrico fuerte alrededor de la sección de abertura 156 de la cavidad; debido a la altura del lecho, y por tanto a la posición de las partes de receptor, cualquier analito unido a una parte de receptor se ubicará en la zona de sensibilidad máxima.

Preferentemente, una capa delgada de material 172 antiincrustante está formada sobre la superficie metálica (por tanto no sobre la superficie de lecho 163). Como se conoce, el material antiincrustante actúa de una manera antiadhesiva para evitar o reducir interacciones no deseadas, tales como la absorción no específica de moléculas químicas o bioquímicas etc. Esto reduce las señales de ruido que podrían haberse causado por la interacción o la unión de moléculas químicas o bioquímicas no deseadas en la superficie de sensor.

c) Fabricación del sensor

El presente sensor puede fabricarse fácilmente utilizando técnicas litográficas. Una posible técnica de fabricación es la siguiente. Se deposita una capa de poli(ácido acrílico) (ppAA) sobre un sustrato de vidrio; y se depositan una capa posterior de perlas de poliestireno (PS) sobre el ppAA. Las capas de ppAA y PS se atacan químicamente con plasma de O₂ para formar una estructura de rejilla que comprende pilares distanciados uniformemente de ppAA separados por una distancia submicrométrica. Los pilares presentan una forma de sección decreciente desde su base hasta la parte superior. Después se deposita oro sobre los pilares para rellenar los huecos entre pilares contiguos, y se retira la parte de la máscara de PS, obteniéndose una nanorrejilla de oro periódica. Otros posibles materiales para los pilares dieléctricos son poliestireno o poli(metacrilato de metilo), etc.

Puede observarse que en esta fase las cavidades se rellenan completamente con el material dieléctrico de los pilares. Para formar las cavidades con un lecho para fijar y ubicar las partes de receptor, entonces es suficiente atacar químicamente de manera selectiva (con respecto al oro) la parte superior de los pilares hasta la profundidad d_A aparente deseada. Una ventaja de esta técnica es que el ataque químico de ppAA puede realizarse con una gran precisión, es decir, de aproximadamente ± 2 nm.

La capa delgada de material antiincrustante (por ejemplo hidrogel antiincrustante, concretamente polietilenglicol) puede depositarse entonces selectivamente sobre las superficies de oro expuestas.

d) Utilización en un sistema de detección por SPR

Volviendo ahora a la figura 6, se representa esquemáticamente un sistema de detección por SPR que comprende un dispositivo sensor de SPR como se describió anteriormente. En funcionamiento, el sensor se orienta de modo que la luz de sonda sea incidente desde el lado de sustrato 252 y por tanto ilumina las cavidades 254 desde el tamaño más ancho, de fondo, es decir, de manera opuesta a la abertura. Normalmente, el dispositivo de sensor comprende por lo menos un conjunto de cavidades 254 diseñado según el presente principio para soportar L-SPR y conseguir el patrón de campo eléctrico descrito anteriormente.

En dicha forma de realización práctica, la capa metálica 253 se cubre mediante un sistema 280 microfluídico que comprende canales que permiten poner selectivamente una muestra de prueba en contacto con un respectivo conjunto de cavidades 254. En tal caso, cada conjunto puede prepararse para contener diferentes partes de receptor para detectar diferentes sustancias. El sistema 280 microfluídico puede llevarse a cabo formando sobre la parte superior de la capa metálica 253 una capa elastomérica u otros materiales (por ejemplo PDMS, PMMA, vidrio, resina epoxídica, etc.) con canales 282 formados en su interior, como se conoce en la técnica.

En uso, el presente dispositivo sensor de SPR se ilumina por tanto desde el lado de sustrato mediante un haz 290 de luz de prueba (haz de sonda) que se origina desde un módulo óptico de entrada 292. El haz 290 de luz de prueba presenta una frecuencia y un ángulo incidente que se sabe que pueden excitar SPR en la superficie de sensor. Puede observarse que el haz 290 de luz de prueba que ilumina el conjunto de nanocavidades puede estar configurado de una manera en sí conocida para disponer de una polarización dada. Para excitar SPR, el haz 290 de luz de prueba presenta una o más frecuencias que coinciden con una o más frecuencias permitidas de las ondas electromagnéticas asociadas a la superficie en la nanoestructura de sensor. Preferentemente, el sensor está diseñado de modo que las frecuencias permitidas de SPR corresponden normalmente al espectro de luz visible/infrarrojo cercano. Dado que el haz de luz de prueba excita SPR, por lo menos parte del haz de luz de prueba se absorbe en la superficie de sensor, dependiendo la magnitud de absorción de la frecuencia de la luz incidente en la superficie de sensor. La luz del haz de luz de prueba que no se ha absorbido en la superficie de sensor se refleja e intercepta entonces en un módulo óptico de salida 294. Puede observarse que el funcionamiento en el modo de transmisión también es posible.

Entonces se detecta (mide) una propiedad de la luz del haz de luz de prueba reflejado, preferentemente su intensidad, en el módulo óptico de salida 294, y se determina un valor real de la propiedad medida de la luz, que es representativo del nivel de excitación de los plasmones superficiales y permite valorar una condición de resonancia o el desplazamiento de la condición de resonancia establecida con respecto a datos calibrados o previamente almacenados/adquiridos. Tal como se conoce, una condición de resonancia normalmente conduce a una disminución de la intensidad medida de la luz reflejada del haz de luz de prueba debido a la absorción de la luz en la superficie de sensor, y una modificación en el índice de refracción de la muestra adyacente a la superficie de sensor provoca un desplazamiento de la condición de resonancia.

Como entenderán los expertos en la materia, la detección/medición en el módulo óptico de salida puede llevarse a cabo por medio de un conjunto de formación de imágenes o fotodetector.

d) Utilización en otras técnicas de detección

5 Como se explicó anteriormente, el presente dispositivo de sensor puede utilizarse ventajosamente en otras técnicas de detección. Ciertamente, el efecto de L-SPR (oscilación de los electrones de la capa de metal noble ubicada justo alrededor de la nanocavidad) produce, en combinación con la forma de sección decreciente de las nanocavidades, un campo eléctrico amplificado alrededor de la abertura de cavidad, que puede ser beneficioso para otras técnicas de análisis, tales como Raman / SERS, espectroscopía de fluorescencia y SALDI.

De hecho, el campo eléctrico desempeña un papel en todas estas aplicaciones y puede observarse que:

- 15 - En espectroscopía Raman (SERS), el campo eléctrico determina la intensidad de la emisión Raman, por tanto la sensibilidad y señal de Raman
- 20 - En espectroscopía de fluorescencia, el campo eléctrico (a una longitud de onda especial) es el que excita las moléculas fluorescentes para emitir su luz. Por tanto, ubicar la molécula fluorescente sobre la cavidad, en la que el campo eléctrico es máximo, actúa como un aumento de la luz emitida y así de la sensibilidad.
- 25 - En SALDI las proteínas que van a analizarse mediante espectrometría de masas se inducen para su desorción utilizando un láser de alta energía, que aumenta localmente la temperatura. La energía del haz de láser (por tanto la potencia térmica que puede liberar a la superficie) es proporcional a la intensidad del campo eléctrico. Utilizando el presente sensor, es posible concentrar el campo eléctrico en el que se ubican las moléculas, y optimizar de este modo la desorción.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo de sensor, que comprende:
 - 5 un sustrato dieléctrico (52; 152; 252);

una capa metálica (53; 153; 253) sobre dicho sustrato (52; 152; 252) con por lo menos un conjunto de nanocavidades (54; 154; 254) en su interior y adaptada para soportar L-SPR, presentando cada una de dichas cavidades (54; 154; 254) en dicha capa metálica una profundidad, una abertura (56; 156), y

10 un fondo cerrado (58; 158) y que se ensancha desde la abertura hasta el fondo para formar un patrón de campo eléctrico fuerte alrededor de la abertura de cavidad;

caracterizado porque un lecho (62; 162) de material dieléctrico está previsto sobre el fondo (58; 158) de cada cavidad (54; 154) para formar una profundidad aparente (d_A) reducida, estando funcionalizada la superficie de lecho (63; 163) para unirse a unas partes de receptor (64; 164);

15 en el que el espesor de dicho lecho de dieléctrico está diseñado de modo que tras la unión de un analito a dichas partes de receptor, dicho analito esté por lo menos parcialmente situado en la zona de campo eléctrico fuerte.
 - 20 2. Dispositivo de sensor según la reivindicación 1, en el que dichas cavidades (54) presentan una forma trapezoidal o troncocónica desde la abertura hasta el fondo; y/o el ensanchamiento de dichas cavidades (154) es continuo o de una manera escalonada.
 - 25 3. Dispositivo de sensor según la reivindicación 1 o 2, en el que las cavidades están cerradas en su fondo por el sustrato dieléctrico.
 4. Dispositivo de sensor según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el espesor de dicho lecho es inferior a la profundidad de la cavidad; y preferentemente la altura de dicho lecho (62; 162) es tal que dicha profundidad aparente (d_A) está en el intervalo comprendido entre 10 y 30 nm con respecto a la abertura (56), preferentemente entre 15 y 25 nm.
 - 30 5. Dispositivo de sensor según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho lecho (62; 162) consiste en un polímero dieléctrico funcionalizado, por lo menos en superficie; o dicho lecho está realizado a partir de un polímero dieléctrico individual; o a partir de dos o más capas de material dieléctrico, comprendiendo la capa superior un polímero dieléctrico funcionalizado.
 - 35 6. Dispositivo de sensor según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha capa metálica (53; 153; 253) presenta un espesor de por lo menos 100 nm, preferentemente por lo menos 120 nm; y/o dicha capa metálica (53; 153) está realizada a partir de un metal seleccionado de entre el grupo que comprende: oro, plata, cobre, platino, aluminio o una aleación que comprende uno o más de los mismos.
 - 40 7. Dispositivo de sensor según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichas cavidades presentan un ancho de abertura en el intervalo comprendido entre 50 y 250 nm, un ancho de fondo en el intervalo comprendido entre 100 y 450 nm, y una profundidad de la cavidad en el intervalo comprendido entre 100 y 200 nm; y/o dicho por lo menos un conjunto de cavidades presenta una periodicidad en el intervalo comprendido entre 200 y 1000 nm.
 - 45 8. Dispositivo de sensor según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la capa metálica está recubierta con una capa de material (172) antiincrustante.
 - 50 9. Dispositivo de sensor según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende unas partes de receptor (64; 164) fijadas a la superficie de lecho.
 10. Dispositivo de sensor según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una capa microfluídica (280) por encima de dicha capa metálica (253), comprendiendo dicha capa microfluídica unos canales (282) dispuestos para poner selectivamente muestras de prueba en contacto con un respectivo conjunto de cavidades (254).
 - 55 11. Dispositivo de sensor según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho sustrato comprende un material dieléctrico y/o un material semiconductor.
 - 60 12. Sistema de detección por SPR, que comprende:
 - un dispositivo de sensor según cualquiera de las reivindicaciones anteriores;
 - 65 un módulo óptico de entrada (292) que emite por lo menos un haz (290) de luz de prueba para iluminar la capa

metálica que soporta L-SPR de dicho dispositivo de sensor en condiciones seleccionadas para excitar SPR;

5 un módulo óptico de salida (294) para medir una propiedad de luz de dicho por lo menos un haz de luz de prueba según se transmite o según se refleja por el dispositivo de sensor para monitorizar una condición de resonancia en la superficie de sensor.

13. Sistema de detección por SPR según la reivindicación 12, en el que dicho dispositivo de sensor se ilumina con dicho por lo menos un haz de luz de prueba desde el lado de sustrato dieléctrico (252).

10 14. Utilización un dispositivo de sensor según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en un procedimiento de detección basándose en uno o más de entre: SPR, SERS, fluorescencia y SALDI.

15 15. Sistema de detección que comprende un dispositivo de sensor según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho sistema de detección está configurado para realizar una detección química, molecular, bioquímica o biomolecular basándose en SPR, SERS, fluorescencia y/o SALDI.

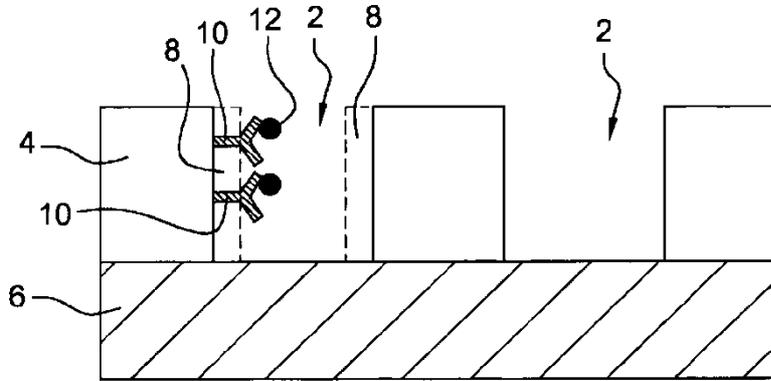


Fig. 1
Técnica anterior

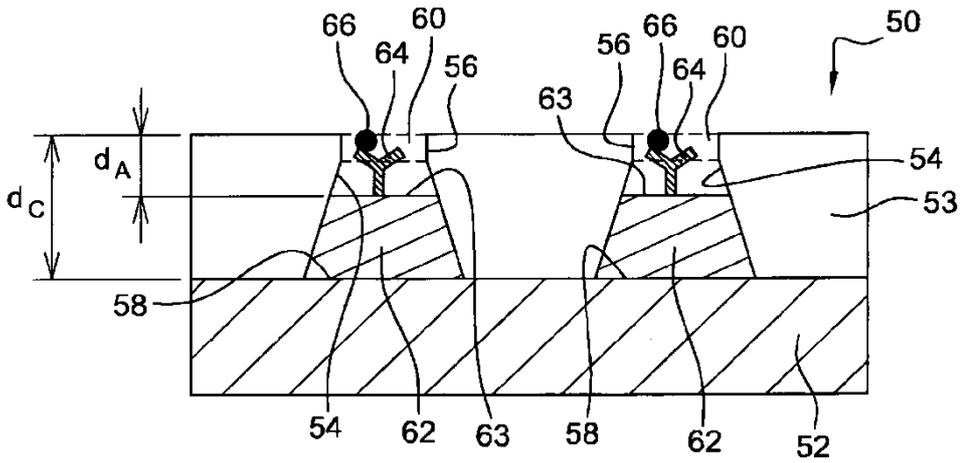


Fig. 2

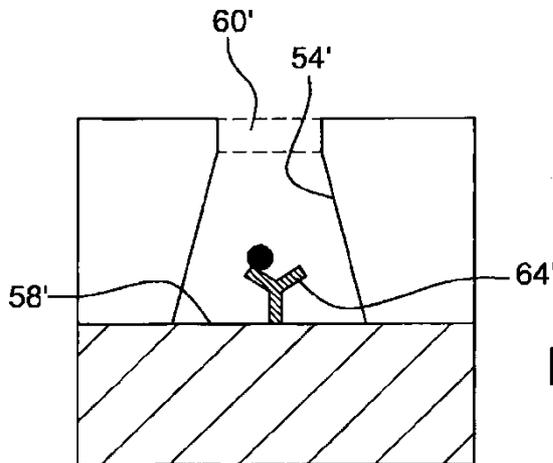


Fig. 3

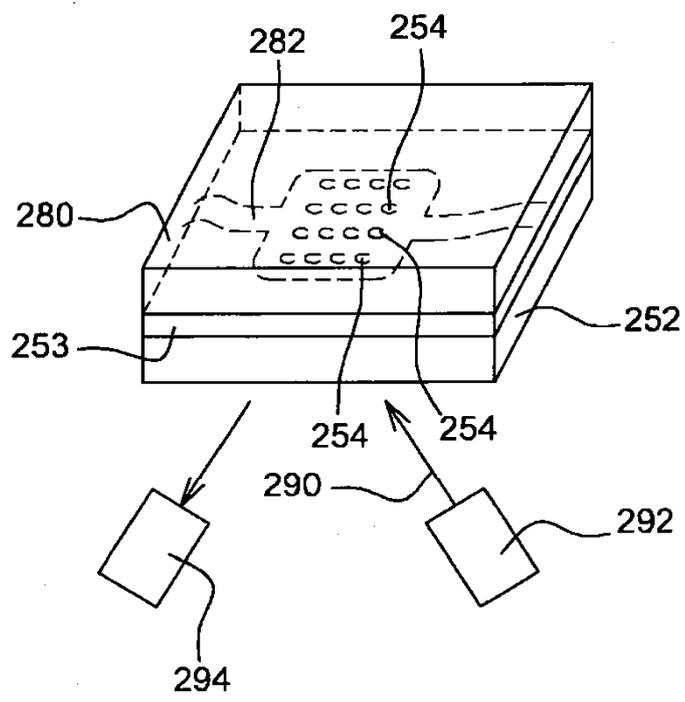


Fig. 6