

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 138**

51 Int. Cl.:

G01N 21/45 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 21/05 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2009** **E 09811139 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016** **EP 2327955**

54 Título: **Sistema de detección óptica para ensayos biológicos de alta sensibilidad sin marcado**

30 Prioridad:

05.09.2008 ES 200802565

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

15.06.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
(100.0%)**

**Calle Ramiro de Maeztu 7 Vicerrectorado de
Investigación Universidad Politécnica de Madrid
28040 Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**HOLGADO BOLAÑOS, MIGUEL;
CASQUEL DEL CAMPO, RAFAEL;
MOLPECERES ÁLVAREZ, CARLOS;
OCAÑA MORENO, JOSÉ LUIS;
LAGUNAS HERAS, MARÍA FÉ y
MORALES FURIO, MIGUEL**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 574 138 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

Sistema de detección óptica para ensayos biológicos de alta sensibilidad sin marcado

El objeto de la invención está basado en el diseño y desarrollo holístico del sistema de bio-detección al conjuntar las ventajas interferométricas y resonantes de estructuras fotónicas novedosas con técnicas de interrogación óptica como espectrometría, elipsometría así como reflectancia y/o transmitancia resuelta en ángulo de forma simultánea en micro/sub-microdominios, haciendo que el sistema en su conjunto ofrezca máxima sensibilidad y robustez, eliminando ambigüedades en el proceso de interrogación óptica. Dichas cavidades son compatibles y están adaptadas a los requerimientos fluidicos necesarios para llevar a cabo ensayos biológicos sin marcado. Además, el resultado de la medida se obtendrá en un corto intervalo de tiempo, en pocos segundos. El campo de aplicación de la presente invención se enmarca dentro de la ingeniería y la física, y en concreto, dentro del área de bio-fotónica, materiales, óptica y micro-nanotecnología.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Sectores como el biomédico y el clínico están demandando continuamente mejores y más eficaces técnicas y herramientas de análisis para la identificación de enfermedades, desarrollo de nuevos medicamentos y mejoras en la eficiencia del diagnóstico. Para lograr este objetivo, los sistemas de detección compuestos por materiales ópticos y componentes fotónicos, como base para el desarrollo de sistemas de bio-detección óptica, se están posicionando como una alternativa significativa de gran potencial (*Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review, Anal. Chim. Acta 620, pp. 8-26, 2008. doi:10.1016/j.aca.2008.05.022.*). Además del alto grado de sensibilidad que estos sistemas pueden llegar a alcanzar, ofrecen otras ventajas como: no son invasivos, ausencia de riesgo de descargas eléctricas o explosiones y su inmunidad a interferencias electromagnéticas. Un aspecto clave para el desarrollo de estos sistemas se sustenta en el grado de desarrollo de la tecnología de miniaturización a micro y nano escala, capaz de integrar componentes mecánicos, fluidicos y fotónicos para desarrollar eficientes bio-sistemas de detección.

El proceso de averiguar si determinados patógenos o proteínas se encuentran en un determinado analito en los sistemas ópticos de bio-detección es realizado mediante la inmovilización de bioreceptores sobre áreas específicas del sensor. Una vez realizado el proceso de inmovilización es cuando se introducen los analitos de prueba en dichas áreas, los cuales reaccionarán si tienen contenidos determinados patógenos o proteínas que sean captados por los ya comentados receptores moleculares inmovilizados, en un proceso que se denomina reconocimiento molecular (RM). Este proceso de reconocimiento es monitorizado la mayoría de las veces mediante técnicas que requieren para su transducción elementos de marcado tales como colorantes fluorescentes, isótopos radioactivos o partículas magnéticas, entre otros. Sin embargo, la química asociada al proceso de marcaje implica mayor tiempo y coste económico. Por el contrario, los bio-sensores ópticos refractométricos no requieren este tipo marcaje para la detección, lo que se denomina sistemas de bio-detección sin marcado (*label-free biosensing*). Se espera que los sistemas de bio-detección sin marcado crezcan más en importancia en sectores como el clínico, biofarmacéutico, medioambiental, seguridad, entre otros debido a su sensibilidad y capacidad para el modo de realización de análisis en tiempo real, ahorro de reactivos y analitos y, en definitiva, menor coste por análisis.

La tecnología de miniaturización e integración a micro-nano escala está logrando resultados prometedores para el desarrollo de nuevos sensores para bio-detección sin marcado. Se han desarrollado dispositivos nano-mecánicos como por ejemplo microvoladizos resonantes (*resonant microcantilevers*), y resonadores acústicos basados en MEMS (*Sistemas microelectromecánicos, Micro Electro Mechanical Systems*). Sin embargo, la sensibilidad que ofrecen es considerablemente menor que los dispositivos fotónicos integrados. Los dispositivos fotónicos integrados para su aplicación como biosensores refractométricos son especialmente relevantes cuando son fabricados utilizando técnicas convencionales de tecnología planar de micro-nano-fabricación, lo que permite la miniaturización, reducción de coste, fabricación a gran escala, estabilidad mecánica y posibilidad de fabricar componentes ópticos, fluidicos, eléctricos y fotónicos necesarios para conseguir dispositivos monolíticos y compactos de alta sensibilidad, y con capacidad para medir diferentes analitos de forma simultánea. Los sistemas de detección óptica refractométricos utilizan como transducción el efecto que provoca tanto la inmovilización de biomoléculas como el reconocimiento molecular en variaciones de índice de refracción. En la actualidad se han desarrollado y demostrado bio-sensores ópticos refractométricos en tecnología planar de micro/nano fabricación que suelen emplear el campo evanescente de un modo de luz guiado por una guía de onda de alto índice de refracción y están basados en estructuras fotónicas tales como el plasmón de resonancia superficial (SPR), interferómetros, resonadores, redes de difracción y cristales fotónicos. Sin embargo, este tipo de dispositivos fotónicos suele necesitar de técnicas complejas de acoplamiento, por ejemplo, entre la guía de onda y la fibra óptica (p.e. guías de estrechamiento invertido y acopladores basados en redes de difracción) para obtener la información, lo cual dificulta el encapsulado y empaquetamiento de los mismos y repercute drásticamente en el coste del dispositivo.

Algunos de estos sensores, que se describen a continuación, han sido ya comercializados, otros están en fase de comercialización, y algunos todavía no han sido comercializados:

1. Biosensores refractométricos basados en la resonancia del plasmón superficial, en ingles "Surface plasmon resonance" (SPR)

Desde su descubrimiento en 1983, es una de las técnicas ópticas más exitosas para biosensores sin marcado, está aceptada comercialmente y es distribuida por ejemplo por las firmas comerciales Biacore (www.biacore.com) e Ibis Technologies (www.ibis-spr.nl) entre otras. La técnica SPR es utilizada ampliamente para la determinación de muchos tipos de interacciones biológicas y cientos de publicaciones aparecen en la literatura cada año. También existe un elevado número de patentes, a modo de ejemplo se referencian algunas de ellas: US5492840, US2008193965, US2064090630, WO2008101348, WO2008054282, al igual que referencias científicas (*Analysis of the performance of interferometry and surface plasmon resonance and luminescent biosensors and chemosensors, Review. Anal. Chim. Acta* 569 (1-2), pp. 1-20, 2006. doi:10.1016/j.aca.2006.03.058.) y (*Surface plasmon resonance sensors: review, Sensors and Actuators B: Chemical* 54 (1-2), pp. 3-15, 1999. doi:10.1016/S0925-4005 (98) 00321-9.). La desventaja de este sistema con el que se propone en la presente invención se funda en que estos sistemas son más lentos, no se pueden miniaturizar de modo que alcancen una alta integración en dispositivos, no son de alta cadencia de medida, y por tanto son de mayor coste económico por análisis.

2. Biosensores refractométricos basados en interferómetros

Existen varios tipos de biosensores refractométricos basados en interferometría, de los cuales se destacan: Interferómetro de Young, los basados en redes de difracción y los interferómetros Mach-Zehnder:

2.1. *Interferómetro de Young (I-Y)*: Comercializado por la empresa Farfield Group (www.farfield-scientific.com) ofrece alta sensibilidad. Consiste en cuatro láminas dieléctricas, dos de ellas son el área sensible y las otras dos como referencia. La interferometría entre las dos señales permite determinar la detección (US 7050176B1) y (*A new quantitative optical biosensor for protein characterisation, Biosensors and Bioelectronics* 19 (4), pp. 383-390, 2003. doi: 10.1016/S0956-5663 (03) 00203-3). También puede utilizar la polimerización para la excitación. Sin embargo, es una técnica en la que la posibilidad de integrar múltiples chips es más complejo en comparación con otras técnicas, siendo por tanto la capacidad de integración y la cadencia de medida inferior y el coste por análisis mayor en comparación con el sistema de bio-detección que se propone en la presente invención.

2.2. *Basados en redes de difracción*: Por ejemplo los *Acopladores de guías de onda basados en redes de difracción (Waveguide grating couplers) (WGC)*: que se han utilizado para comercializar varios sistemas de bio-detección sin marcado. Hay varias firmas comerciales que han comercializado este sistema (p.e. Microvacuum: www.microvacuum.com, entre otras). En estos sistemas se utilizan guías de onda como elemento básico de sus estructuras para la propagación de la luz y están basados también en el campo evanescente para la detección. Dentro de este grupo destaca el sistema de alta cadencia de medida comercializado recientemente por Corning (<http://www.corning.com/>) basado en acopladores de redes de difracción. Este sistema es capaz de hacer una medida cada pocos segundos en pozos estándar de capacidad del orden de micro-litros por pozo. A continuación se referencia algunas patentes existentes relativas a biosensores basados en acopladores y redes de difracción: US2008219892, EP1892518, GB2227089, así como alguna referencia científica (*Optical grating coupler biosensors, Biomaterials* 23 (17), pp. 3699-3710, 2002. doi:10.1016/S0142-9612 (02) 00103-5), (*Wavelength-Interrogated optical sensor for biomedical applications, Opt. Lett.* 25 (7), pp. 463-465, 2000. doi:10.1364/OL.25.000463). Este sistema ofrece una solución de alta cadencia pero en comparación con la presente invención, es menos robusto, sensible y los pozos de medida son de mayor volumen que los que se pueden lograr con la presente invención, pudiéndose llegar a medir volúmenes del orden de femtolitros.

2.3. *Interferómetros Mach-Zehnder (M-Z)*: Ofrecen potencialmente una alta sensibilidad como biosensores sin marcado al disponer de una referencia interna para compensar las fluctuaciones del índice de refracción debidas a adsorción inespecífica. Los sensores interferométricos proporcionan un amplio rango dinámico en comparación con otros sensores integrados. Sin embargo, la mayoría de la investigación realizada parece todavía estar confinada a nivel de laboratorio y hasta donde llega nuestro conocimiento no han sido explotados comercialmente. Estos dispositivos tienen la desventaja de su costoso encapsulado y empaquetado al requerir un acoplamiento de guía de onda-fibra óptica. Como referencias científicas se pueden consultar: *J. Lightwave Technol.* 16 (4), pp. 583-592, 1998), *Sensors and actuators B: Chemical* 92, pp.151-158, 2003. doi:10.1016/S092514005 (03) 00257-0 y *Journal of Nanotechnology* 14, pp. 907-912, 2003. doi: 10.1088/0957-4484/14/8/312. Un caso particular son los *Interferómetros Mach-Zehnder (M-Z) basados en Guías ARROW (guías de onda ópticas de reflexión antirresonantes, Anti resonant reflecting optical waveguides) (GA)*: En este caso el campo eléctrico es confinado en una guía de onda y el campo evanescente interacciona con las biomoléculas (*Sensors and actuators B: Chemical* 92, pp.151-158, 2003. doi:10.1016/S0925-4005 (03) 00257-0). Guías huecas ARROW han sido demostradas, con alta sensibilidad. Hasta la fecha no han sido desarrolladas para aplicación comercial hasta donde llega el conocimiento de los autores de la presente invención.

3. Biosensores refractométricos basados en resonadores ópticos

El fenómeno de la resonancia es un concepto que se puede explotar para la bio-detección sin marcado. En este tipo de dispositivos, la sensibilidad viene determinada por el factor de calidad de las cavidades resonantes y de su respuesta ante las reacciones de afinidad y reconocimiento molecular que se provocan en las mismas. Entre ellos destaca como técnica emergente los dispositivos integrados basados en resonadores de micro-anillo y micro-disco (p.e. US2004023396) en los que el factor de calidad reportado en la bibliografía es muy elevado. (p.e. *Integrated optics ring-resonator sensors for protein detection, Opt. Lett.* 30 (24), pp. 3344-3346, 2005. doi:10.1364/OL.303344).

Otras configuraciones pueden utilizar micro-esferas resonantes u otro tipo de cavidades, y recientemente se han demostrado guías de nano-canal en donde las biomoléculas son ancladas en su interior para mejorar su repuesta (*Label-free optical biosensing with slot-waveguides. Opt. Lett. 33, (7), pp. 708-710, 2008. doi:10.1364/OL.33.000708*). Hasta donde llega el conocimiento de los autores no existen firmas comerciales que exploten esta tecnología comercialmente. La principal desventaja de estos dispositivos con respecto a la presente invención es que están desarrollados sobre tecnología planar, lo cual requiere costosos sistemas de acoplamiento, encapsulado y empaquetamiento para obtener la información. Además requieren de técnicas de micro-fabricación muy bien desarrolladas ya que las cavidades resonantes son muy sensibles a defectos de fabricación, se pueden integrar muchos menos dispositivos que con la tecnología alternativa que se propone en la presente invención y la capacidad para crear dispositivos con alta cadencia de medida es muy compleja.

4. Biosensores refractométricos basados cristales fotónicos

Se destacan las *microcavidades basadas en cristales fotónicos (PCW)*. Estos biosensores utilizan las propiedades de los cristales fotónicos donde existen un amplio número de patentes (p.e. US2008252890, US2008219615) y aplicaciones para crear dispositivos interferométricos o cavidades resonantes de alto factor de calidad mediante la inclusión de defectos en la estructura fotónica (p.e. *Ultracompact biochemical sensor built with two dimensional photonic crystal microcavity, Opt. Lett. 29, (10), pp.1093-1095, 2004. doi:10.1364/OL.29.001093*). Se reportan valores de sensibilidad elevados, aunque los requerimientos de fabricación necesarios para su aplicación comercial parecen ser demasiado exigentes, además de influir negativamente otros aspectos como integración, encapsulado, empaquetamiento para conseguir reducción de coste y alta cadencia de medida.

Finalmente se ha de remarcar que la actividad investigadora en el campo de la detección sin marcado como método para el reconocimiento molecular es muy intensa dado que el evitar el marcado mediante fluorescencia, radioactividad o magnetismo mejorará drásticamente el coste por análisis, la calidad de la detección y la capacidad para el desarrollo de nuevos medicamentos y la identificación de enfermedades con el impacto que ello significará en el futuro. Se están proponiendo de forma continua estructuras fotónicas innovadoras como por ejemplo cavidades resonantes de alto factor de calidad incluso para la detección de una sola biomolécula (*Label-Free, Single-Molecule Detection with Optical Microcavities, Science Volumen 317, página 783, año 2007*).

La presente invención es novedosa y mejora el estado de la ciencia y tecnología en el mercado actual en el campo los biosensores ópticos integrados con respecto a los últimos avances por su enfoque de integración de tecnología para conseguir que la bio-detección sin marcado se pueda explotar tanto a nivel de bio-chips desechables como a nivel de detección de alta cadencia de medida en sustratos de gran tamaño, para ofrecer unas métricas de sensibilidad y robustez que ningún sistema actual es capaz de proporcionar, debido al hecho de combinar avanzadas técnicas ópticas de interrogación vertical y estructuras bio-fotónicas novedosas como se explicará más adelante.

Dado que el sistema de medida no solo está basado en el diseño de estructuras bio-fotónicas de alta sensibilidad, sino también en técnicas de interrogación óptica avanzada, es conveniente destacar que, en la actualidad, existen firmas comerciales que parcialmente ofrecen técnicas de interrogación óptica complementarias utilizadas tanto en el campo de la investigación o en la fabricación de dispositivos en el sector de la micro-nano electrónica, pero ninguno de ellos es un sistema integrado para el análisis de bio-chips y estructuras fotónicas para ensayos biológicos sin marcado. Entre ellas, se puede destacar la espectrometría, que se puede realizar a nivel de microdominios, bien mediante espectrómetros dispersivos donde existen numerosos fabricantes que ofrecen esta técnica (p.e. *HORIBA Jobin Yvon www.jobinyvon.com*), o por transformada de Fourier donde también existen suministradores que ofrecen equipos de gran calidad (p.e. *Bruker-Optics, www.brukeroptics.com*), o incluso micro-espectrómetros, aunque éstos suelen ofrecer muy poca resolución para ser utilizados para bio-detección. Es de destacar también el número de fabricantes que ofrece sistemas ópticos basados en tecnología confocal como, por ejemplo, Olympus, Leica, Zeiss, Nikon, Perkin-Elmer, Nanofocus AG, etc. que permiten observar micro y sub-microdominios de muestras para su análisis. En cuanto a la existencia de equipos que integren más de una tecnología óptica para aplicaciones de alta cadencia cabe destacar los proveedores en el sector de la microelectrónica, por ejemplo *KLA-Tencor (http://www.kla-tencor.com/)* que comercializa una gran variedad de sistemas para la caracterización óptica en línea en la fabricación de dispositivos en el sector de la microelectrónica y semiconductores. Tecnologías ópticas como elipsometría, espectrometría y reflectometría en función del ángulo de incidencia son muy útiles y han sido adaptadas para conseguir una alta cadencia y evaluar cientos de dispositivos y estructuras dentro de microdominios en obleas normalmente de silicio, pudiéndose evaluar sustratos de gran tamaño como por ejemplo obleas de silicio de 300 mm de diámetro. A continuación se referencia alguna de estas patentes como: "*Method and apparatus for evaluating the thickness of thin films (EP0549166)*", "*High resolution ellipsometric apparatus (EP0396409)*" y "*Self-calibrating beam profile ellipsometer (US2004233436)*". Las patentes existentes en este ámbito están enmarcadas únicamente en el sector de la microelectrónica, solo para caracterizar propiedades físicas de estructuras electrónicas por reflexión fabricadas normalmente con materiales dieléctricos y en tecnología de Si en general, y sobre sustratos de obleas de Si (no contemplan transmisión como en la presente invención), y nunca se ha contemplado ni se han diseñado técnicas avanzadas de medida de evaluación vertical para bio-detección basadas en el análisis de respuesta de bio-chips formados por estructuras resonantes interferométricas y bio-fotónicas.

En conclusión, ni existe ni está reportado ningún sistema de bio-detección basado en el concepto descrito en la

presente invención hasta donde los autores han podido investigar, y ningún fabricante en la actualidad ofrece un sistema de detección óptico integrado para el análisis de micro y sub-microdominios que integre soluciones en transmisión y reflexión para análisis mediante elipsometría, espectrometría y transmitancia/reflectancia resuelta en ángulo, y mucho menos para el análisis de celdas interferométricas resonantes y/o bio-fotónicas como sistema óptico de detección para bio-ensayos sin marcado. Además, en la presente invención se propone utilizar un sistema de detección matricial tipo CCD que permitirá analizar espacialmente todo el perfil de reflexión y transmisión para obtener una información más precisa y con más resolución de la diferencia de fase de las ondas polarizadas, respuesta espectral y reflectancia/transmitancia resuelta en ángulo. El análisis óptico del perfil de reflexión y transmisión de las micro-celdas bio-fotónicas, nunca antes contemplado, supondrán un avance significativo en el desarrollo y eficacia de bio-detección sin marcado. Dicho sistema de bio-detección óptico no está ni ideado ni mucho menos desarrollado en la actualidad por ningún fabricante.

El artículo "Resonant Cavity Imaging: A Means Toward High-Throughput Label-Free Protein Detection; Bergstein D A; IEEE JOURNAL OF SELECTED TOPICS IN QUANTUM ELECTRONICS, VOL. 14 NR. 1, páginas 131 – 139; 20080101" da a conocer (figs. 1, 4, 7) un biosensor de imagen de cavidad resonante (RCIB) que utiliza una técnica óptica para la detección de interacciones de enlazamiento molecular sin marcado en múltiples posiciones en paralelo que emplea una cavidad óptica resonante para alta sensibilidad. Según esta técnica, luz en el infrarrojo cercano pasa de modo resonante a través de una cavidad de Fabry-Perot compuesta de reflectores dieléctricos superior e inferior, fabricados de capas alternadas de Si/SiO₂ y la longitud de onda es barrida, por lo que un desplazamiento en longitud de onda en la respuesta resonante local de la cavidad óptica indica enlazamiento. La intensidad transmitida en miles (p. e., 16384) de posiciones de pixel puede ser registrada así simultáneamente.

La fig. 1 da a conocer cómo se pueden realizar medidas simultáneas independientes utilizando un dispositivo que comprende dos superficies parcialmente reflectoras situadas enfrentadas entre sí para formar una cavidad de Fabry-Perot. Los agentes de captura se estampan sobre una de las superficies reflectoras. Un haz de luz colimado se hace incidir sobre la cavidad a través de uno de los reflectores, y la longitud de onda se barre a la vez. Una cámara recoge las imágenes de intensidad transmitida, mapeando la característica de resonancia de cada posición a lo largo de la superficie de la cavidad plana respecto a un pixel en la cámara. Moléculas dianas ligadas a sus correspondientes agentes de captura fijados a la superficie del reflector desplazan la condición resonante local de la cavidad. El número de puntos evaluados simultáneamente está limitado esencialmente por el número de pixeles disponibles en la cámara, y así, se puede escalar fácilmente para conseguir un rendimiento muy alto. Los reflectores de la cavidad resonante consisten en capas alternantes de Si y SiO₂. La fig. 7 muestra imágenes de reacciones de enlazamiento en tres canales de flujo (#1, #2, #3) que indican distintas intensidades de señal cuando se ven orientadas hacia la superficie del sustrato.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención consiste en un novedoso sistema de detección óptico para ensayos biológicos sin marcado de alta sensibilidad, como se define según las reivindicaciones adjuntas. Dicho sistema está basado en celdas bio-fotónicas de interrogación óptica vertical fabricadas con tecnología de micro-nano-fabricación que pueden ser integradas en sustratos de gran tamaño (por ejemplo, obleas de silicio, vidrio, etc.) para aplicaciones de alta cadencia de medida, o individualmente para el modo de realización de chips desechables. Dichas celdas ofrecen una respuesta de alta sensibilidad a minúsculos cambios del índice de refracción de las biomoléculas adosadas en las cavidades de sus estructuras. La interrogación se realiza analizando el perfil de reflexión y/o transmisión del haz de luz de las celdas bio-fotónicas verticalmente mediante técnicas de elipsometría, espectrometría, y de transmitancia o reflectancia en función del ángulo de incidencia de forma simultánea, evitándose el elevado coste que supone el encapsulado de los chips fotónicos convencionales al evitarse el acoplamiento guía de onda-fibra óptica.

Más concretamente, la presente invención describe el desarrollo de un sistema biosensor óptico de alta sensibilidad que evita la necesidad de marcado (p.e. fluorescencia, radioactividad o magnetismo) y que además ofrece alta cadencia de medida para el reconocimiento molecular, como por ejemplo la detección de patógenos o proteínas mediante reacciones de afinidad anticuerpo-antígeno. Los beneficios y características claves de la presente invención subyacen en un nuevo concepto de sistema biosensor que combina, por un lado, el uso de técnicas avanzadas de caracterización óptica que permiten la interrogación vertical en dominios micro y sub-micrométricos y, por otra parte, el desarrollo estructuras resonantes bio-fotónicas y/o interferométricas altamente sensibles para aumentar la capacidad de detección de minúsculas variaciones del índice de refracción. Además, los materiales que se pueden utilizar para el modo de realización de las celdas bio-fotónicas sensibles son compatibles con los procesos de micro-nano fabricación a gran escala como óxido de silicio, nitruro de silicio, polidimetil siloxano (PDMS), resina SU8, óxido de titanio, o cualquier otro dieléctrico, así como laminas delgadas de metales como aluminio, cobre, etc.

Mediante la observación del perfil de reflexión o transmisión de varias técnicas complementarias de interrogación óptica de forma simultánea (p.e. elipsometría, espectrometría y reflectancia o transmitancia resuelta en ángulo) y la aplicación para ensayos biológicos sin marcado de estructuras bio-fotónicas será posible determinar con mayor fiabilidad y sensibilidad la interacción molecular con los receptores moleculares inmovilizados en las áreas sensibles de las celdas bio-fotónicas. El hecho de que la interrogación sea realizada verticalmente por varias técnicas de

detección óptica de alta sensibilidad de forma simultánea elimina las incertidumbres y ambigüedades de medida normalmente presentes en los sistemas de detección óptica.

5 El sistema biosensor propuesto funciona como un sistema ultra sensible a mínimas variaciones del índice de refracción durante el proceso de reconocimiento molecular, y por lo tanto tiene claras aplicaciones potenciales en aquellos campos en los cuales un bio-ensayo pueda ser desarrollado, como por ejemplo los sectores biomédico, bioquímico, farmacéutico, clínico, medioambiental y seguridad, ya que las variaciones del índice de refracción de las interacciones moleculares están en el rango de índices de refracción que pueden ser fácilmente detectados con este sistema.

10 El sistema óptico biosensor propuesto también soluciona un problema inherente a los chips fotónicos convencionales micro-nano fabricados en tecnología planar, al ofrecer una solución de bajo coste para la integración, encapsulado y empaquetamiento de los chips. Esto es así porque la interrogación de las celdas sensibles biofotónicas es vertical, bien sea en reflexión o en transmisión, evitándose la necesidad de utilizar costosos sistemas de acoplamiento guía de onda-fibra óptica (p.e. guías de estrechamiento invertido y acopladores basados en redes de difracción) para obtener la información. Para ello se utilizará una o varias fuentes de excitación dentro del rango visible e infrarrojo, coherentes o no, como por ejemplo un haz de luz láser.

15 Así, la interrogación de las celdas bio-sensibles se realizará mediante luz altamente focalizada a través de un objetivo óptico de alta apertura numérica, permitiendo el análisis en micro y sub-microdominios. El tamaño del dominio de análisis viene determinado por el límite de difracción, lo cual implica que para longitudes de onda más larga los dominios serán de mayor tamaño que para longitudes de onda más corta (p.ej. para una longitud de onda de 633 nm y un objetivo de microscopio estándar de apertura numérica 0,8 será posible analizar dominios de unos 0,8 micrómetros). Se debe destacar que los objetivos de alta apertura numérica permitirán la observación del perfil de reflexión o transmisión directamente a través de un detector matricial tipo CCD, lo cual también implicará la obtención de la transmitancia o reflectancia resuelta en ángulo de forma simultánea. A su vez, si la luz de excitación es polarizada, se podrá obtener del mismo perfil información sobre el estado de polarización de la luz reflejada y transmitida, obteniéndose así información elipsométrica de forma simultánea a la transmitancia y reflectancia resuelta en ángulo. Finalmente para la obtención de la respuesta espectral será necesario contar con una fuente de luz multi-longitud de onda y contar, por ejemplo, con un elemento dispersivo tipo red de difracción para la detección de la respuesta de la reflectancia/transmitancia resuelta en longitud de onda.

20 Los dominios donde se integran las celdas bio-sensibles se podrán fabricar directamente en chips desechables, o en sustratos de gran tamaño como puedan ser por ejemplo obleas de silicio, vidrio o cualquier otro material. A su vez, el sistema podrá llevar un sub-sistema de reconocimiento de imágenes y geometrías que permitirá que el cabezal de medida se posicione en las áreas bio-sensibles con la resolución y precisión suficiente, haciendo posible no solamente que el número de celdas por unidad de superficie se pueda aumentar, es decir la integración de celdas bio-sensibles se pueda incrementar, sino también que la cadencia y acceso a las celdas sensibles bio-fotónicas puedan ser automáticos. Es de destacar que para aumentar la robustez del sistema, la respuesta óptica tanto en reflexión y/o transmisión de las celdas bio-fotónicas se podrá utilizar también como información de control y herramienta para determinar el correcto posicionamiento, ya que el perfil de simetría de la intensidad óptica tanto en transmisión como en reflexión puede ser diseñado a partir de la geometría de las estructuras bio-fotónicas. Por ejemplo, en el caso de celdas bio-fotónicas formadas por redes periódicas de micropilares, pozos cilíndricos u otro tipo de simetría, el perfil de reflexión/transmisión será también simétrico cuando el cabezal óptico está bien posicionado.

30 En definitiva, mediante el modo de realización de este sistema, será posible lograr que la rutina de medida y análisis de analitos sea más eficiente desde un punto de vista de coste y adaptada a realizar cientos de medidas sobre un único o varios analitos. Por tanto, el sistema ofrece la capacidad única de múltiples medidas de un único analito o bien de varios analitos. Además, el uso simultáneo de varias técnicas de interrogación óptica en pocos segundos hace que el sistema sea muy robusto permitiendo al sistema ser capaz de ofrecer una alta cadencia de medida y productividad en comparación con otras técnicas de análisis alternativas para bio-detección.

35 El sistema será capaz de medir tanto bio-chips desechables para aplicaciones donde la demanda del análisis requiera la cercanía al punto de cuidado (p.e. un centro de salud), o al punto de interés en general (p.e. el análisis de contaminantes de un río), o en sustratos de gran tamaño para aplicaciones de alta cadencia de medida para por ejemplo, el desarrollo de nuevos medicamentos y receptores farmacológicos para el desarrollo de dianas terapéuticas.

40 El sistema óptico de detección de ensayos biológicos sin marcado propuesto en la presente invención ofrece un sistema de detección sin precedentes al ser una solución holística que incorpora todas las cualidades que ofrecen por un lado las celdas bio-fotónicas y por otro las técnicas avanzadas de interrogación óptica propuestas:

45 - **Celdas bio-fotónicas:** Las estructuras fotónicas diseñadas que conforman las celdas bio-fotónicas de interrogación óptica vertical ofrecerán las ventajas de los fenómenos físicos ya mencionados como la resonancia, interferometría. Además pueden ofrecer la capacidad de confinamiento y concentración del campo eléctrico en aquellas zonas sensibles donde se inmovilizaran las biomoléculas para mejorar la sensibilidad. En la presente invención, las celdas

bio-fotónicas formadas por una distribución periódica de micropilares resonantes concentrará el campo eléctrico evanescente en la superficie de dichos pilares donde serán inmovilizadas las biomoléculas, haciendo por tanto, que la respuesta de los micropilares resonantes incremente ostensiblemente la sensibilidad de las celdas bio-fotónicas.

5 - Técnicas ópticas de interrogación vertical: La eficacia de las técnicas ópticas de alta resolución, capacidad de caracterización y detección como las que se proponen para la interrogación vertical de las celdas bio-fotónicas ofrecerán una solución única y avanzada porque a la alta sensibilidad de respuesta de las celdas bio-fotónicas se unen las técnicas de análisis óptico más sensibles a variaciones de índice de refracción. La respuesta óptica resonante y/o interferométrica ante a las reacciones de afinidad y reconocimiento molecular de las correspondientes celdas bio-fotónicas se verá amplificada cuando son interrogadas haciendo uso del cambio de la polarización de la luz (elipsometría), la respuesta de reflectancia y/o transmitancia resuelta en: longitud de onda (espectrometría) y en ángulo de incidencia. Además, las técnicas propuestas permitirán: el análisis en micro y sub-microdominios, la localización de dichos dominios mediante reconocimiento de imágenes y geometrías, y por tanto, la capacidad de integrar múltiples celdas sensibles por unidad de área. Se unen a estas ventajas el tiempo de análisis en pocos segundos y la robustez de analizar cada celda bio-fotónica con técnicas ópticas de alta sensibilidad de forma simultánea, haciendo más fiable el proceso de interrogación óptica.

En definitiva, el concepto único propuesto en la presente invención permitirá desarrollar sistemas de bio-detección sin mercado competitivos en términos de comercialización industrial, sensibilidad, cadencia de medida, robustez y costo.

En la presente invención, las cavidades de interrogación vertical que se proponen ofrecen las siguientes ventajas:

20 1º. Alta sensibilidad, ya que hacen uso de los fenómenos interferométricos y resonantes de las estructuras fotónicas propuestas cuando son evaluados por técnicas de medida de alta sensibilidad (p.e. elipsometría)

2º. Robustez, ya que las estructuras fotónicas son analizadas simultáneamente con varias técnicas de medida, lo cual reduce la incertidumbre y ambigüedad de la medida en el proceso de interrogación.

25 3º. Sistema de acoplamiento sencillo, la evaluación vertical en micro y sub-microdominios es fácilmente realizable utilizando un objetivo de microscopio de alta apertura numérica, lo cual permite acceder a las estructuras de forma sencilla, donde un simple sistema óptico de reconocimiento de imágenes puede ser implementado para la localización de las áreas de medida.

30 4º. Reducción de coste, ya que aprovecha todas las ventajas de la tecnología de micro-nano fabricación y permite la integración de múltiples dispositivos para análisis simultaneo de varios analitos. Además, el coste por análisis se reduce ya que las celdas de detección pueden ser altamente integradas, por ejemplo es viable integrar 100 celdas sensible por 1 cm², lo que indicaría un coste por análisis de 10 céntimos de euro, que es despreciable frente al coste de reactivos y material biológico. Además, el hecho de no tener que utilizar técnicas de marcado (por ejemplo, fluorescencia o radioactividad) en la preparación de las muestras reduce también el coste. Finalmente, este sistema de detección óptica en micro y sub-microdominios permite analizar volúmenes de analitos extremadamente pequeños (muy por debajo de los nano-litros) en comparación con los sistemas actuales (del orden de micro-litros) reduciéndose también la cantidad de reactivos para llevar a cabo los análisis.

5º. Alta cadencia de medida, la duración de una medida óptica se realiza en un corto intervalo de tiempo, en pocos segundos, y el desarrollo de la tecnología actual permite que el movimiento para el posicionamiento de la sonda óptica pueda ir dispositivo por dispositivo para su evaluación de forma muy precisa y en poco tiempo.

40 6º. Aplicaciones: el número de aplicaciones es múltiple desde un punto de vista de bio-detección, ya que depende de las aplicaciones biológicas correspondientes que continuamente se están desarrollando. El sistema de detección se podrá aplicar por tanto para todas aquellas aplicaciones en las que se pueda desarrollar un bioensayo, y por lo tanto como cualquier sistema de bio-detección será relevante en sectores de alto impacto como el clínico, biomédico, medioambiental, farmacéutico, seguridad, etc. Es reseñable que el sistema de la presente invención será capaz de medir tanto en sustratos de gran tamaño para aplicaciones donde la cadencia de medida es esencial para aumentar la eficiencia, reducir el coste y el tiempo en el desarrollo, por ejemplo de nuevos medicamentos, así como para aplicaciones en las que el punto de análisis requiere de un acceso complicado (p.e. para aplicaciones medioambientales) o para reducir el tiempo y coste al poderse realizar el análisis cerca del punto de cuidado como pueda ser un centro de salud. Esta paliación se podrá realizar mediante bio-chips desechables de bajo coste.

50 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

A continuación se pasa a describir de manera muy breve una serie de dibujos que ayudan a comprender mejor la invención y que se relacionan expresamente con un modo de realización de dicha invención que se presenta como un ejemplo no limitativo de ésta.

55 - FIGURA 1. Representación esquemática del sistema bio-detección óptica sin marcado a escala de sustratos de gran tamaño como pueden ser obleas de silicio o vidrio transparente.

- FIGURA 2. Representación esquemática del sistema bio-detección óptica a escala de chips desechables.
- FIGURA 3. Vista de un ejemplo de celda fotónica bio-sensible basada en una cavidad resonante tipo *Fabry -Perot* de interrogación vertical por reflexión.
- 5 - FIGURA 4. Vista de un ejemplo de celda fotónica bio-sensible basada en una cavidad resonante tipo *Fabry-Perot* de interrogación vertical por transmisión.
- FIGURA 5. Vista de un ejemplo de celda fotónica bio-sensible basada en micropilares resonantes de interrogación vertical por reflexión, según la invención.
- FIGURA 6. Ejemplo de celda fotónica bio-sensible basada en una red de micropilares resonantes de interrogación vertical por transmisión, según la invención.
- 10 - FIGURA 7. Ejemplo de sistema óptico de interrogación de celdas bio-fotónicas basado en el análisis de reflexión de luz incidente.
- FIGURA 8. Ejemplo de sistema óptico de interrogación de celdas bio-fotónicas basado en el análisis de transmisión.
- 15 - FIGURA 9. Bio-detección mediante la respuesta de reflectancia resuelta en ángulo para una celda bio-fotónica tipo cavidad resonante Fabry-Perot. Se representa la respuesta del resonador para dos situaciones: sin ningún anclaje biomolecular (respuesta fotónica de la celda) y para un cierto reconocimiento molecular equivalente a 0, 01 unidades de índice de refracción (R.I.U.)
- 20 - FIGURA 10. Bio-detección mediante la respuesta de espectrometría para una celda bio-fotónica tipo cavidad resonante Fabry-Perot. Se representa el movimiento del pico de resonancia en función de la longitud de onda para dos situaciones: sin ningún anclaje biomolecular (respuesta fotónica de la celda) y para un cierto reconocimiento molecular equivalente a 0,01 R.I.U.
- FIGURA 11. Bio-detección mediante la respuesta elipsométrica de una celda bio-fotónica tipo cavidad resonante tipo Fabry-Perot. Se representa la diferencia de fase entre los estados de polarización vertical y horizontal en función del reconocimiento molecular provocado por el incremento de índice de refracción.
- 25 - FIGURA 12. Ejemplo de un proceso de micro-fabricación de una celda bio-fotónica de evaluación vertical.
- FIGURA 13. Representación esquemática de un ejemplo de integración completa de interrogación óptica vertical de una celda biofotónica.

MODO DE REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

30 Como se ha indicado anteriormente, constituye el objeto de la presente invención el desarrollo de un sistema de bio-detección óptica de alta sensibilidad y capacidad para ensayos biológicos sin marcado. Los beneficios y características claves de la presente invención subyacen en un nuevo concepto de sistema biosensor que combina por un lado el uso de técnicas avanzadas de caracterización óptica que permiten la interrogación vertical en dominios micro y sub-micrométricos, y por otra parte el desarrollo celdas bio-fotónicas (tal y como se observa en las figuras 5 y 6) que serán extremadamente sensibles a mínimas variaciones del índice de refracción que se produzcan por el anclaje de biomoléculas en las superficies sensibles de las cavidades de dichas celdas bio-fotónicas, haciendo posible el reconocimiento molecular y detectando, por ejemplo, reacciones de afinidad anticuerpo-antígeno de forma considerablemente sensible. Las celdas bio-fotónicas podrán ser fabricadas en materiales compatibles con los procesos de micro-nano fabricación a gran escala como óxido de silicio, nitruro de silicio, polidimetil siloxano (PDMS), SU8, o cualquier dieléctrico, así como láminas delgadas de metales como aluminio, oro, etc.

45 Mediante la observación espacial de la intensidad de luz reflejada (figura 7) o transmitida (figura 8) de por ejemplo tres técnicas complementarias de interrogación óptica de forma simultánea (elipsometría, espectrometría y reflectancia o transmitancia resuelta en ángulo) y la amplificación para ensayos biológicos sin marcado de las estructuras resonantes o interferométricas bio-fotónicas de interrogación vertical integradas en celdas opto-fluídicas, será posible determinar con mayor fiabilidad y sensibilidad la interacción molecular con los receptores moleculares inmovilizados en las áreas sensibles, eliminando todas las incertidumbres y ambigüedades de análisis normalmente presentes en los sistemas de detección óptica.

50 El sistema óptico biosensor propuesto funciona como un sistema ultra sensible a mínimas variaciones del índice de refracción provocada por la interacción biomolecular del ensayo correspondiente, y por lo tanto tiene claras aplicaciones potenciales en aquellos campos en los cuales un bio-ensayo pueda ser desarrollado, como por ejemplo los sectores biomédico, bioquímico, farmacéutico, clínico, medioambiental y seguridad, ya que las variaciones del índice de refracción de las interacciones moleculares están en el rango de índices de refracción que pueden ser fácilmente detectados con este sistema.

El sistema de bio-detección óptica propuesto también soluciona un problema inherente a los chips fotónicos convencionales fabricados en tecnología planar al ofrecer un solución más eficiente y de bajo coste para la integración, encapsulado y empaquetamiento de los bio-chips al ser la interrogación de las celdas sensibles bio-fotónicas vertical, bien en transmisión (figuras 4 y 6) o en reflexión (figuras 3 y 5) evitándose los costosos sistemas de acoplamiento guía de onda-fibra óptica necesarios en los bio-chips fotónicos implementados en tecnología planar (p.e. guías de estrechamiento invertido y acopladores basados en redes de difracción) para obtener la información. Para ello (figuras 7 y 8) se utilizará un haz de luz láser u otra fuente de luz coherente o no, altamente focalizado mediante un objetivo de apertura numérica alta, permitiendo el análisis en micro y sub-microdominios tanto en chips desechables (figura 2), o en sustratos de gran tamaño (figura 1) como puedan ser obleas de silicio. El sistema puede llevar un sistema de reconocimiento de imágenes incorporado en el sistema de detección para localizar y posicionar el cabezal de medida en las áreas de detección, haciendo así posible que la cadencia y acceso a las celdas sensibles bio-fotónicas sea automático. Los perfiles recogidos de intensidad de luz reflejada (ver 78 en figura 7) y transmitida (ver 88 en figura 8) pueden ser utilizados también como herramienta de ajuste para determinar el correcto posicionamiento debido a la simetría espacial del perfil de intensidad óptica (figura 7 y 8). Esto puede ser así debido a que las celdas bio-fotónicas pueden ser diseñadas para que la respuesta óptica tanto de transmisión o reflexión sea simétrica, como por ejemplo redes periódicas de micropilares (figura 5 y 6) de la celda bio-fotónica. Estas técnicas permitirán que se pueda incrementar la densidad de celdas sensibles para proporcionar un sistema óptico de bio-detección capaz de hacer que la rutina y secuencia de medida de analitos se pueda adaptar a realizar cientos de medidas sobre un único o varios analitos. El uso simultáneo de varias técnicas de interrogación óptica en pocos segundos permitirá al sistema ser capaz de ofrecer una alta cadencia de medida y productividad en comparación con otras técnicas de análisis alternativas, haciendo el proceso más eficiente.

El sistema será capaz de medir tanto bio-chips desechables para aplicaciones en las que sea necesario acercar el análisis al punto de demanda, por ejemplo: el punto de cuidado (aplicación clínica), el punto de detección medioambiental (p.e. detección de pureza de agua, pesticidas, etc.), y en sustratos de gran tamaño para aplicaciones donde la alta cadencia de medida pueda ser crucial, como por ejemplo en el desarrollo de nuevos fármacos. Así, de una forma más concreta, el sistema de detección óptica para ensayos biológicos de alta sensibilidad sin marcado, objeto de la presente patente de invención comprende:

- (i) un sistema óptico de medida que comprende al menos una fuente de excitación (101) y un cabezal óptico (103, 103a, 103b), y medios ópticos para la detección (102) de una señal procedente del cabezal óptico (103, 103a, 103b),
- (ii) un elemento para la interrogación de un fluido que tiene múltiples analitos que comprende una pluralidad de celdas fotónicas biosensibles (201), en el que cada una de las células biosensibles (201) está formada por un patrón periódico de micropilares resonantes y cada celda biosensible comprende:
 - o un sustrato (55),
 - o una pluralidad de cavidades resonantes (53), estando cada cavidad definida por uno de dichos micropilares con su base apoyando sobre el sustrato de tal modo que el espacio entre micropilares reciba el fluido,
 - o una pluralidad de reflectores de Bragg, al menos dos por cavidad resonante (53) situados respectivamente en cada extremo del micropilar, y
 - o una pluralidad de receptores moleculares (54), unidos a las superficies laterales de los micropilares de modo que estén en contacto con el fluido,

en el que dicho cabezal óptico está configurado para analizar cada una de dichas celdas biosensibles y los analitos contenidos en ellas.

El cabezal óptico (103) está configurado de tal modo que permita el análisis de cada una de dichas celdas biosensibles (201) y los analitos contenidos en ellas.

En la figura 1 dicho elemento para la integración de múltiples analitos (200) es un elemento de gran tamaño, mientras que en la figura 2 dicho elemento (200) es un bio-chip (20) conteniendo igualmente los elementos propios del elemento (200) en un espacio reducido.

En la figura 3 se puede observar un ejemplo de celda biosensible (201) basada, en este ejemplo, en una cavidad resonante tipo "*Fabry-Perot*" de interrogación mediante la obtención del perfil de reflexión del cual se obtiene la información de reflectancia resuelta en ángulo y en longitud de onda, y donde la información elipsométrica se obtiene mediante el análisis del mismo perfil de reflexión para la obtención de la diferencia de fase de los estados de polarización horizontal y vertical. La información de reflectancia resuelta en ángulo y elipsométrica es obtenida de forma simultánea, mientras que la espectrométrica es obtenida de forma continuada. Dicha celda bio-sensible (201) comprende, al menos:

- (a) una pluralidad de reflectores de Bragg (32);

(b) una cavidad resonante (33);

(c) una pluralidad de receptores biomoleculares (34), preferentemente proteínas (p.e. anticuerpos/antígenos) inmovilizados en la cavidad. El analito entra por una entrada de fluidos (35) y sale por una salida de fluidos (36); el reconocimiento molecular se produce y se detecta cuando el analito se introduce y distribuye por la cavidad (33); estando, además, dichos elementos (32, 33, 34) integrados sobre el sustrato (37).

En la figura 4 sobre la misma celda biosensible (201) de la figura 3 se observa cómo la interrogación se produce por transmisión, donde se obtiene la información de transmitancia resuelta en ángulo y en longitud de onda, y donde la información elipsométrica se obtiene mediante el análisis del mismo perfil de transmisión para la obtención de la diferencia de fase de los estados de polarización horizontal y vertical. La información de transmitancia resuelta en ángulo y elipsométrica es obtenida de forma simultánea, mientras que la espectrométrica es obtenida de forma continuada. En esta configuración, el haz óptico emitido por un cabezal óptico transmisor (103a) conectado a la fuente de excitación (101) es recibido por un cabezal óptico receptor (103b).

En la figura 5 se muestra un modo de realización de la celda bio-sensible (201) basado en una red periódica de micropilares resonantes y de interrogación vertical por reflexión, donde se obtiene la información de reflectancia resuelta en ángulo y en longitud de onda, y donde la información elipsométrica se obtiene mediante el análisis del mismo perfil de reflexión para la obtención de la diferencia de fase de los estados de polarización horizontal y vertical. La información de reflectancia resuelta en ángulo y elipsométrica es obtenida de forma simultánea, mientras que la espectrométrica es obtenida de forma continuada. Dicha celda (201) comprende, al menos:

(a) una pluralidad de cavidades resonantes (53);

(b) una pluralidad de bio-receptores moleculares (p.e. anticuerpos/antígenos) (54) adheridos a la superficie de las cavidades resonantes (53), el reconocimiento molecular se produce y se detecta cuando el analito se introduce y distribuye en la red periódica de micropilares resonantes de la celda bio-fotónica (201);

(c) una pluralidad de reflectores de Bragg (52), al menos dos por cavidad resonante (53); estando además dichos elementos (52, 53, 54) depositados sobre el sustrato (55).

En la figura 6 sobre la misma celda fotónica biosensible (201) de la figura 5 se observa cómo la interrogación se produce por transmisión, donde se obtiene la información de transmitancia resuelta en ángulo y en longitud de onda, y donde la información elipsométrica se obtiene mediante el análisis del mismo perfil de transmisión para la obtención de la diferencia de fase de los estados de polarización horizontal y vertical. La información de transmitancia resuelta en ángulo y elipsométrica es obtenida de forma simultánea, mientras que la espectrométrica es obtenida de forma continuada. En esta configuración, el haz óptico emitido por un cabezal óptico transmisor (103a) conectado a la fuente de excitación (101) es recibido por un cabezal óptico receptor (103b).

En la figura 7 se muestra un ejemplo para hacer un sistema óptico de interrogación vertical por reflexión de celdas bio-fotónicas, valido tanto para sustratos grandes o bio-chips. El haz de luz (73) que proveniente del sistema de excitación (101) es reflejado por un partidor de haz (75) y se enfoca en la celda biofotónica (201) mediante un cabezal óptico (103) compuesto por un objetivo de alta apertura numérica (74) capaz de enfocar en dominios micro y sub-micrométricos. Debido a la alta apertura numérica del objetivo (74), la luz reflejada se puede analizar para varios ángulos de incidencia, el rango de ángulos de incidencia viene determinado por la propia apertura del objetivo, siendo factible analizar un rango de ángulos de incidencia de $\pm 64^\circ$ con un objetivo de apertura numérica 0,9 fácilmente disponible en el mercado. La luz reflejada que proviene de la celda bio-fotónica se hace pasar por una lente (76) que se enfoca en un agujero micrométrico (77) que ejerce las funciones de filtro espacial. Los diferentes ángulos de incidencia se recogen a través de un detector matricial tipo CCD (78) de forma simultánea y que conforman el perfil de reflexión de respuesta de la celda bio-fotónica. Si la luz incidente es linealmente polarizada a 45° se pueden obtener las dos componentes correspondientes al estado de polarización vertical (s) y horizontal (p). Esto, por ejemplo, se puede conseguir haciendo que la luz de excitación sea linealmente polarizada y utilizando un retardador y un analizador para la detección. De este perfil de reflexión se puede obtener de forma simultánea la reflectancia resuelta en ángulo y en función del estado de polarización, y por ende la respuesta elipsométrica.

La figura 8 muestra un ejemplo práctico para hacer de un sistema óptico de interrogación horizontal por transmisión de celdas bio-fotónicas, valido tanto para sustratos grandes o bio-chips. El haz de luz (83) que proveniente del sistema de excitación (101) se enfoca en la celda biofotónica (201) que está alojada en un sustrato (200) transparente mediante un cabezal óptico (103) compuesto por un objetivo de alta apertura numérica (84, 85) capaz de enfocar en dominios micro y sub-micrométricos. Debido a la alta apertura numérica del objetivo (84), la luz incidente se puede analizar para varios ángulos de incidencia, el rango de ángulos de incidencia viene determinado por la propia apertura del objetivo, siendo factible analizar por ejemplo un rango de ángulos de incidencia de $\pm 64^\circ$ con un objetivo de apertura numérica 0,9 fácilmente disponible en el mercado. La luz transmitida que proviene de la celda bio-fotónica se hace pasar por una lente (86) que se enfoca en un agujero micrométrico (87) que ejerce las funciones de filtro espacial. Los diferentes ángulos transmitidos se recogen a través de un detector matricial tipo CCD (88) de forma simultánea y que conforman el perfil de transmisión de respuesta de la celda bio-fotónica. Si la luz incidente es linealmente polarizada a 45° se pueden obtener las dos componentes correspondientes al estado de

polarización vertical (s) y horizontal (p). Esto se conseguirá mediante un simple polarizador a la salida de la fuente de luz. De este perfil de transmisión se puede obtener de forma simultánea la reflectancia resuelta en ángulo y en función del estado de polarización mediante la utilización por ejemplo de un retardador y un analizador para la detección, y por ende la respuesta elipsométrica.

- 5 En cuanto al posicionamiento, las celdas bio-fotónicas con bio-cavidades Fabry-Perot (figuras 3 y 4) el posicionamiento del cabezal óptico será menos crítico al ser las dimensiones en el plano de mayor tamaño. Se pueden realizar marcas de alineamiento para que un sistema de reconocimiento de imágenes pueda determinar el lugar de medida, usadas convencionalmente en micro-fabricación para localizar determinadas estructuras. Esto se realiza mediante la inclusión de determinados motivos y patrones en la cara superior de los chips. Para las celdas basadas en redes periódicas de micropilares (figuras 5 y 6) las dimensiones de enfoque son más críticas, pero este tipo de celdas permite ayudarse para posicionar el cabezal óptico de detección mediante el análisis de simetría de la intensidad del perfil de reflexión.

15 La figura 9 representa la respuesta teórica de detección mediante el análisis del perfil de reflexión por reflectancia resuelta en ángulo de una celda bio-fotónica (figura 3). La celda biofotónica de la figura 3 está formada en su conjunto por reflectores de Bragg y una cavidad por donde se introducirán los diferentes analitos. Dicha celda se comporta ópticamente como un resonador tipo Fabry-Perot de detección bioquímica. Se puede observar que la respuesta de reflectancia resuelta en ángulo donde aparecen dos mínimos de reflexión (95) debidos a la respuesta resonante de la celda bio-fotónica, siendo la respuesta muy similar para los dos estados de polarización: vertical (91) y horizontal (92). La posición angular de dichos mínimos depende fuertemente del índice de refracción dentro de la bio-cavidad, este índice variará en función de la interacción molecular dentro de la cavidad. La curva (93, 96) representa la respuesta fotónica de la cavidad resonante para polarización vertical, mientras que la curva (94, 97) representa la respuesta de la celda bio-fotónica para un porcentaje de biomoléculas reconocidas equivalentes a 0,01 unidades de índice de refracción (R.I.U.).

25 La figura 10 representa la respuesta teórica de detección mediante el análisis del perfil de reflexión por reflectancia resuelta en longitud de onda (espectrometría) para una celda biofotónica (figura 3). Para espectrometría aparece un mínimo de resonancia (300) de gran pendiente en torno a 810 nm, separado en más de 50 nm del siguiente mínimo. Este mínimo se moverá a mayores o menores longitudes de onda al variar el índice efectivo de la bio-cavidad debido a la interacción biomolecular dentro de la misma. La posición angular de dicho mínimo depende fuertemente del índice de refracción dentro de la bio-cavidad, y por ende del reconocimiento molecular dentro de la cavidad. La curva 1001 representa la respuesta fotónica de la cavidad resonante, mientras que la curva 1002 representa la respuesta de la celda bio-fotónica para un porcentaje de biomoléculas reconocidas equivalentes a 0,01 unidades de índice de refracción (R.I.U.).

35 La figura 11 representa la respuesta teórica de detección mediante el análisis del perfil de reflexión por elipsometría. La figura muestra la diferencia de fase (1101) teórica entre las polarizaciones vertical (s) y horizontal (p) y el modulo (1102) para diferentes índices de refracción de la cavidad, los cuales se corresponden con la concentración de biomoléculas reconocidas. Estas curvas son una estimación teórica de la respuesta y rango dinámico de la celda biofotónica. En torno a $n = 1,33$, dicha fase varía muy rápidamente en función del índice de la bio-cavidad.

40 Para esta celda, las estimaciones calculadas demuestran que para estas estructuras el límite de detección que se puede lograr es de 10^{-7} unidades de índice de refracción (R.I.U.). En el caso de la celda bio-fotónica basada en micropilares resonantes (figuras 5 y 6), los resultados obtenidos teóricamente son semejantes, aunque este tipo de estructuras permite concentrar el campo evanescente en las superficies donde se anclarán las biomoléculas. También, otras celdas bio-fotónicas pueden ser objeto de la invención, como por ejemplo membranas de sub-micro agujeros que permitirán la concentración del campo evanescente y flujo continuo.

45 La figura 12 representa un ejemplo para fabricar una celda bio-fotónica basado en una cavidad resonante tipo Fabry-Perot (figura 3 y 4) en cinco pasos de fabricación (P1, P2, P3, P4, P5), aunque otras celdas bio-fotónicas (figuras 5, 6) pueden ser fabricadas utilizando métodos semejantes de micro-fabricación. Para la fabricación de esta estructura tomada como ejemplo se pueden seguir los siguientes pasos (figura 12):

- Proceso de fabricación P1: Fabricación de los reflectores de Bragg (32) inferiores: Los reflectores de Bragg se pueden realizar en pares de óxido (SiO_2 de bajo índice de refracción) y nitruro de silicio (Si_3N_4 de alto índice de refracción) sobre un sustrato (128) para mejorar la respuesta. El depósito de los reflectores tiene que asegurar la uniformidad de las capas depositadas. Para este proceso se puede utilizar técnicas ampliamente utilizadas como LPCVD (*Deposición química en fase vapor a baja presión*, o PECVD (*Deposición química en fase vapor asistida por plasma*) de uso común en tecnología de micro-fabricación. Una capa intermedia de silicio amorfo (126) se deposita después de la fabricación de los reflectores mediante PECVD, que será utilizada para la fabricación de la bio-cavidad utilizando técnicas de fotolitografía convencional.
- Proceso de fabricación P2: Capa de sacrificio (129). Una vez definida el tamaño de la cavidad, se puede depositar una capa de SiO_2 de sacrificio para posteriormente poder ser eliminada y crear una cavidad hueca. Se puede utilizar también PECVD.

- Proceso de fabricación P3: Definición de la cavidad. Utilizando técnicas de fotolitografía convencionales y técnicas de ataque convencionales como por ejemplo ataque seco por plasma (*dry etching*) una lámina delgada de SiO₂ puede ser definida solo en la cavidad. Esta capa de SiO₂ será eliminada posteriormente para crear una cavidad hueca.
- 5
- Proceso de fabricación P4: Fabricación de los reflectores de Bragg superiores (1210). Los reflectores de Bragg superiores se puede fabricar mediante depósitos alternativos de óxido y nitruro por las mismas técnicas anteriormente descritas.
 - Proceso de fabricación P5: Creación de la cavidad hueca. Para la eliminación de la capa de sacrificio de SiO₂ que define la cavidad se puede utilizar ataque húmedo utilizado convencionalmente.
- 10
- Los accesos fluídicos de las diferentes a las celdas bio-fotónicas se pueden realizar de forma simultánea utilizando técnicas de micro-fabricación estándar y siguiendo procesos similares. Por ejemplo para crear los canales en la parte inferior de la oblea se puede utilizar técnicas de ataque seco profundo tipo DRIE (*Deep Reactive Ion Etching*) o ataque húmedo por ejemplo utilizando ácido fluorhídrico (HF) o hidróxido de potasio (KOH). Otras posibilidades pasan por utilizar sustratos transparentes, como obleas de vidrio, utilización y depósito de láminas delgadas de polímeros y resinas como por ejemplo PDMS (Polidimetil Siloxano) o SU-8 mediante técnicas de recubrimientos giratorios de precisión tipo "*spin coating*" o utilizando técnicas de procesado adecuadas en función del material. Los canales fluídicos a nivel de oblea también pueden ser procesados por ablación láser por litografía directa, por ejemplo procesos de ablación mediante láser de excímero con ancho de pulso de pico y nano-segundos, láseres de femtosegundos, por fotolitografía láser o por foto-polimerización, etc. Otras técnicas de micro fabricación como
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- En la figura 13 se muestra una solución esquemática tecnológicamente viable basada en las técnicas de micro-fabricación estándar como las que se han descrito anteriormente. En este caso se puede utilizar una capa transparente de PDMS (131), donde existe un canal fluídico de acceso (132) sobre un soporte (133) en PMMA (Poli-metil-metacrilato) donde reposa el sustrato (202) donde se alojan las celdas sensibles bio-fotónicas, en este caso formadas por una pluralidad de reflectores de Bragg (32), superiores (134) e inferiores (136) y una cavidad fluídica resonante (135) por donde se introduce el analito correspondiente. El acceso para obtener la información de la respuesta al reconocimiento molecular de la cavidad se realiza mediante un cabezal óptico (103).
- Finalmente la aplicación biológica de detección estará supeditada al desarrollo de bio-ensayo concreto para la detección de patógenos, determinadas proteínas o fragmento de ADN para detección de virus. Una ventaja de este sistema de bio-detección es que podrá utilizarse con la mayoría de ensayos biológicos comerciales existentes u otros por desarrollar, ya que permiten el flujo continuo y la posibilidad de introducir secuencialmente los reactivos necesarios para desarrollar la aplicación biológica correspondiente, por tanto puede ser también utilizando como herramienta para el desarrollo de nuevos ensayos biológicos. Para poder llevar a cabo dicha aplicación biológica existen ya desarrolladas técnicas de funcionalización de superficies donde inmovilizar y adherir los bio-receptores moleculares ((*Label-free optical biosensing with slot-waveguides. Opt. Lett. 33, (7), pp. 708-710, 2008. doi:10.1364/OL.33.000708*) que serán responsables de la selectividad del biosensor. Una vez realizado este proceso el sistema biosensor estará preparado para la detección final. Los analitos objetivo se introducirán por el/los canales fluídicos correspondientes y la respuesta de interacción molecular o reconocimiento molecular será monitorizada óptimamente por el sistema óptico de detección. Esta respuesta se amplificará debido a la respuesta fotónica de las celdas bio-sensoras (figuras 9, 10 y 11). El uso simultáneo de las técnicas ópticas propuestas (figuras 7 y 8) reducirá drásticamente la incertidumbre y hará el sistema mucho más fiable. Sistemas cognitivos orientados a usuarios y profesionales del sector correspondiente podrán ser desarrollados mediante aplicaciones software que hagan que el sistema sea muy fácil de utilizar.

REIVINDICACIONES

1. Sistema de detección óptica para ensayos biológicos de alta sensibilidad sin marcado que comprende el uso de técnicas de caracterización óptica que permiten la interrogación vertical resonante o interferométrica de dominios micrométricos y sub-micrométricos de celdas bio-fotónicas que comprende:

- 5 (i) un sistema óptico de medida que comprende al menos una fuente de excitación (101) y un cabezal óptico (103, 103a, 103b), y medios ópticos para la detección (102) de una señal procedente del cabezal óptico (103, 103a, 103b),
- (ii) un elemento para la interrogación de un fluido que tiene múltiples analitos que comprende una pluralidad de celdas biosensibles (201), en el que cada una de las celdas biosensibles (201) está formada por un patrón periódico de micropilares resonantes y cada célula biosensible comprende:
 - 10 o un sustrato (55),
 - o una pluralidad de cavidades resonantes (53), estando cada cavidad definida por uno de dichos micropilares con su base apoyando sobre el sustrato de tal modo que el espacio entre micropilares reciba el fluido,
 - 15 o una pluralidad de reflectores de Bragg, al menos dos por cavidad resonante (53) situados respectivamente en cada extremo del micropilar, y
 - o una pluralidad de receptores moleculares (54), unidos a las superficies laterales de los micropilares de modo que estén en contacto con el fluido,

20 y donde dicho cabezal óptico está configurado para analizar cada una de dichas celdas bio-sensibles y los analitos contenidos en ellas.

2. Sistema según la reivindicación 1 en el que el elemento para la integración de múltiples analitos comprende una pluralidad de conexiones fluídicas conectadas a las celdas.

3. Sistema según la reivindicación 1 caracterizado porque dichas fuentes de excitación son fuentes de tipo láser u otras fuentes coherentes o no en longitudes de onda visibles e infrarrojas.

25 4. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 caracterizado porque el elemento de integración de múltiples analitos es un sustrato de gran tamaño tipo oblea de silicio, vidrio transparente o similar.

5. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 caracterizado porque el elemento de integración de múltiples analitos es un bio-chip desechable.

30 6. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 caracterizado porque la interrogación es por transmisión, el cabezal óptico (103) es un cabezal óptico transmisor (103a) conectado a la fuente de excitación (101) cuyo haz es recibido por un cabezal óptico receptor (103b), conectado a los medios de detección óptica (102).

7. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 caracterizado porque la interrogación es por reflexión, el cabezal óptico (103) es un cabezal óptico transmisor-receptor conectado a la fuente de excitación (101) cuyo haz es recibido por reflexión por el cabezal óptico (103), conectado a los medios de detección óptica (102).

35

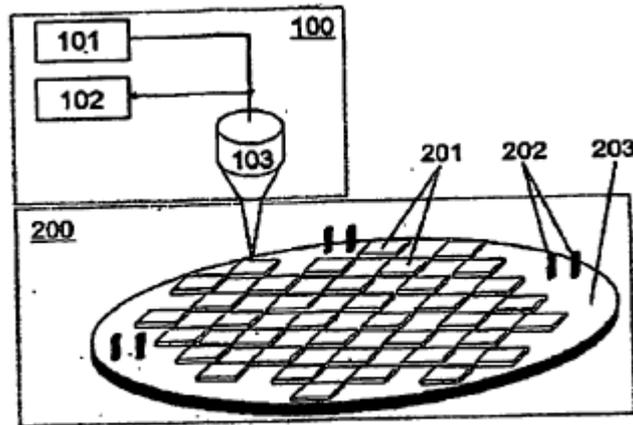


FIG 1

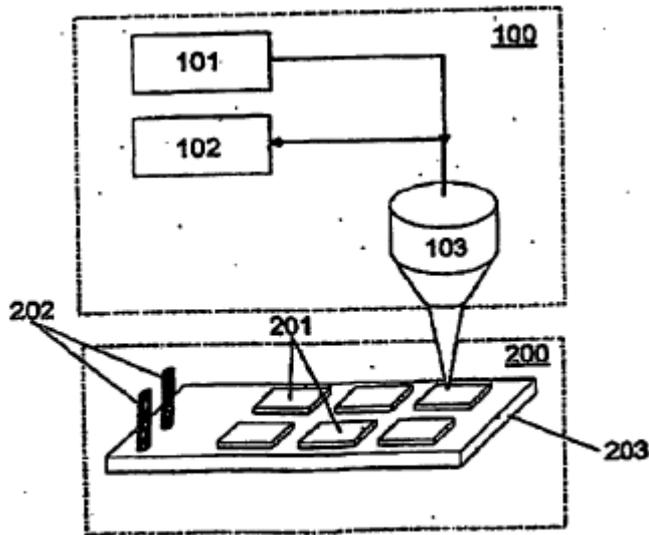
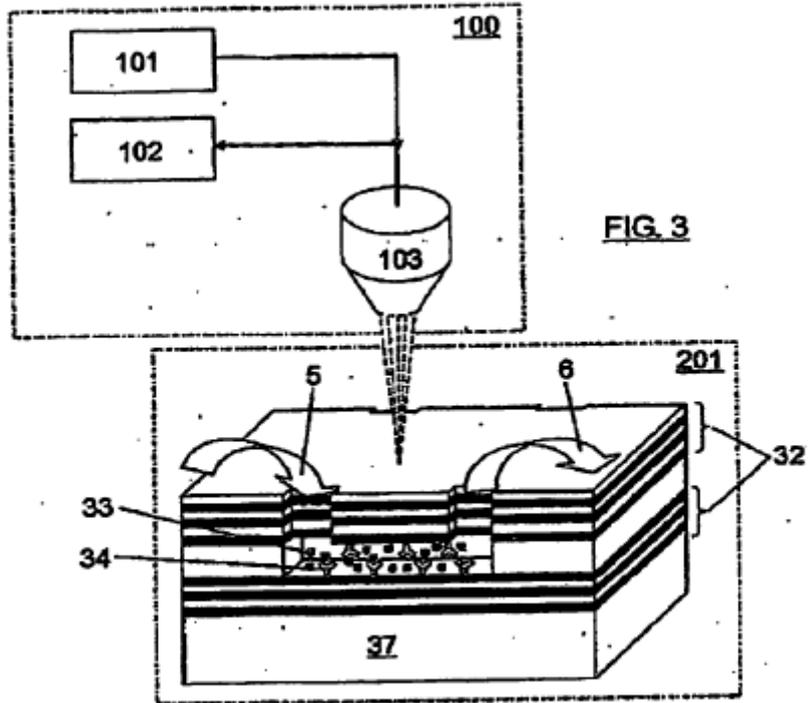


FIG 2



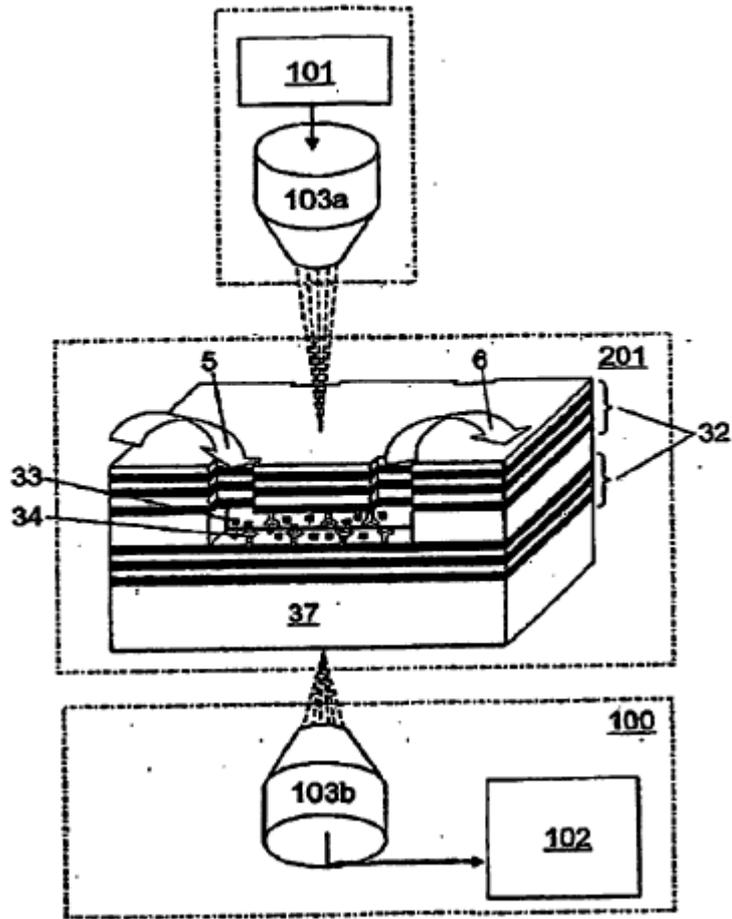


FIG. 4

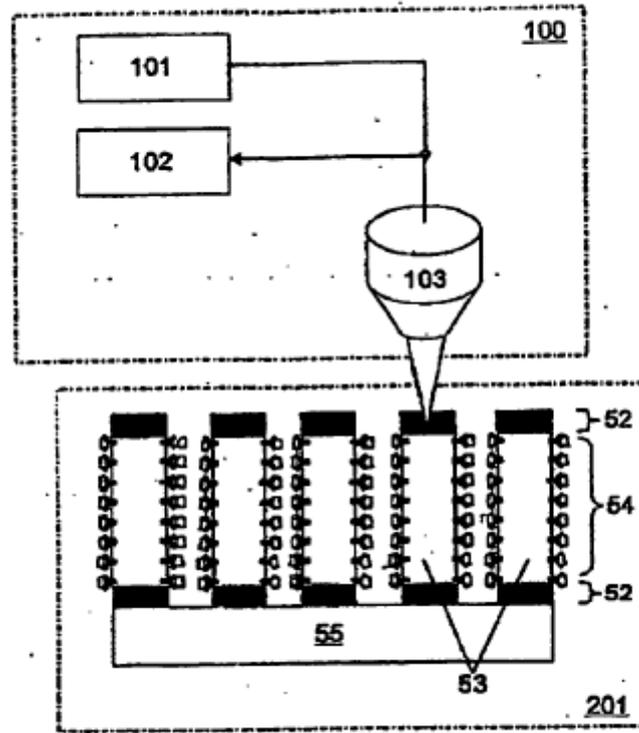


FIG. 5

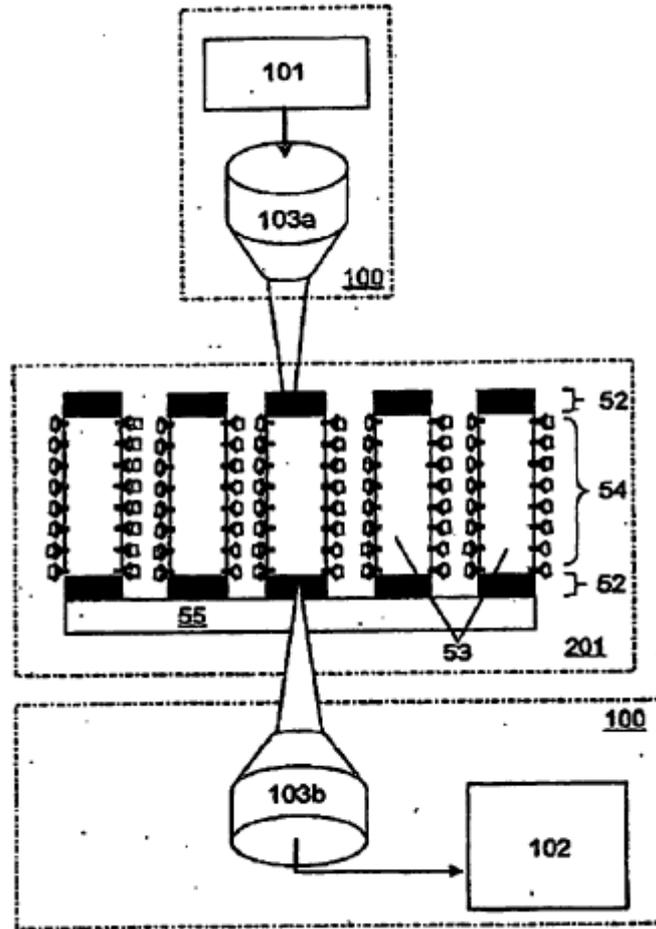
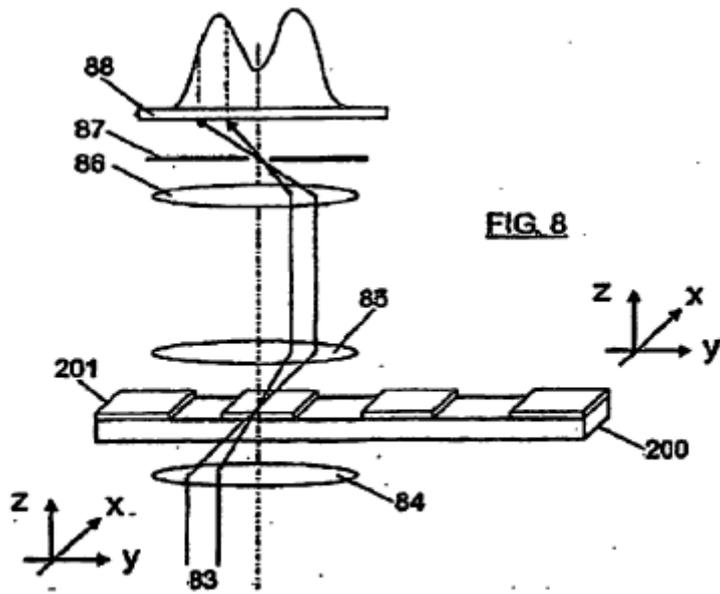
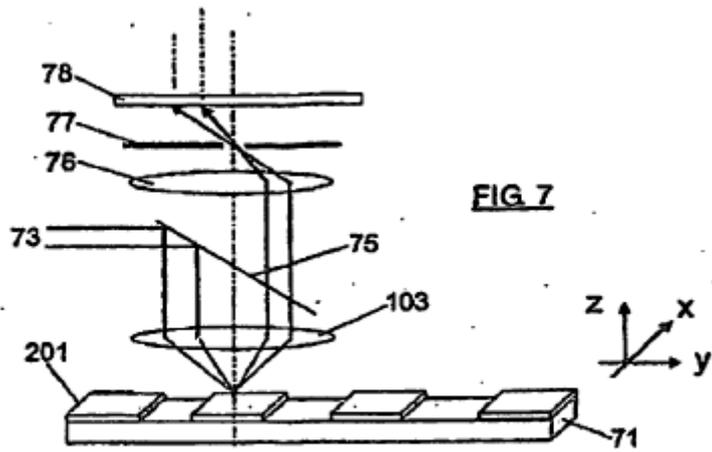


FIG. 6



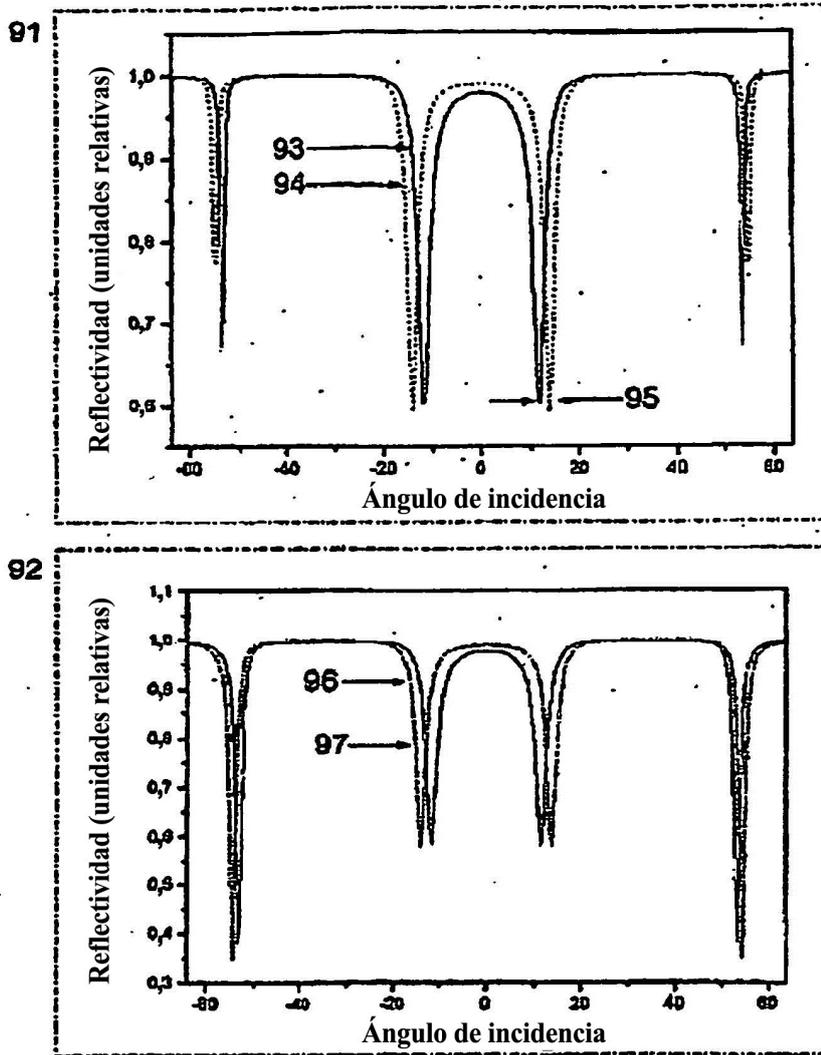


FIG 9

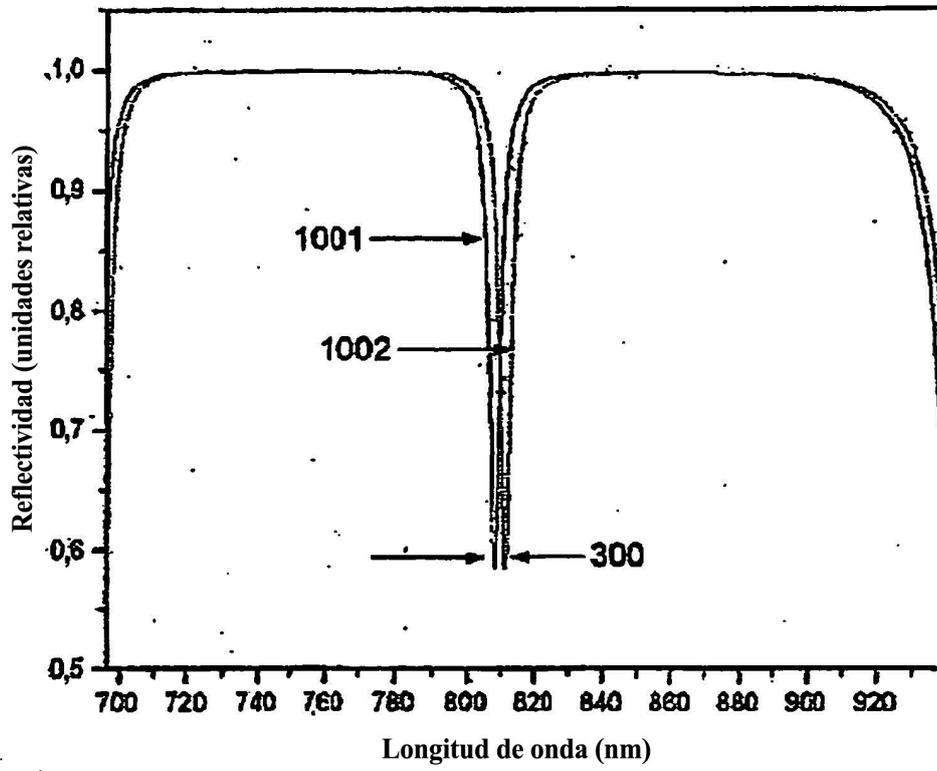


FIG. 10

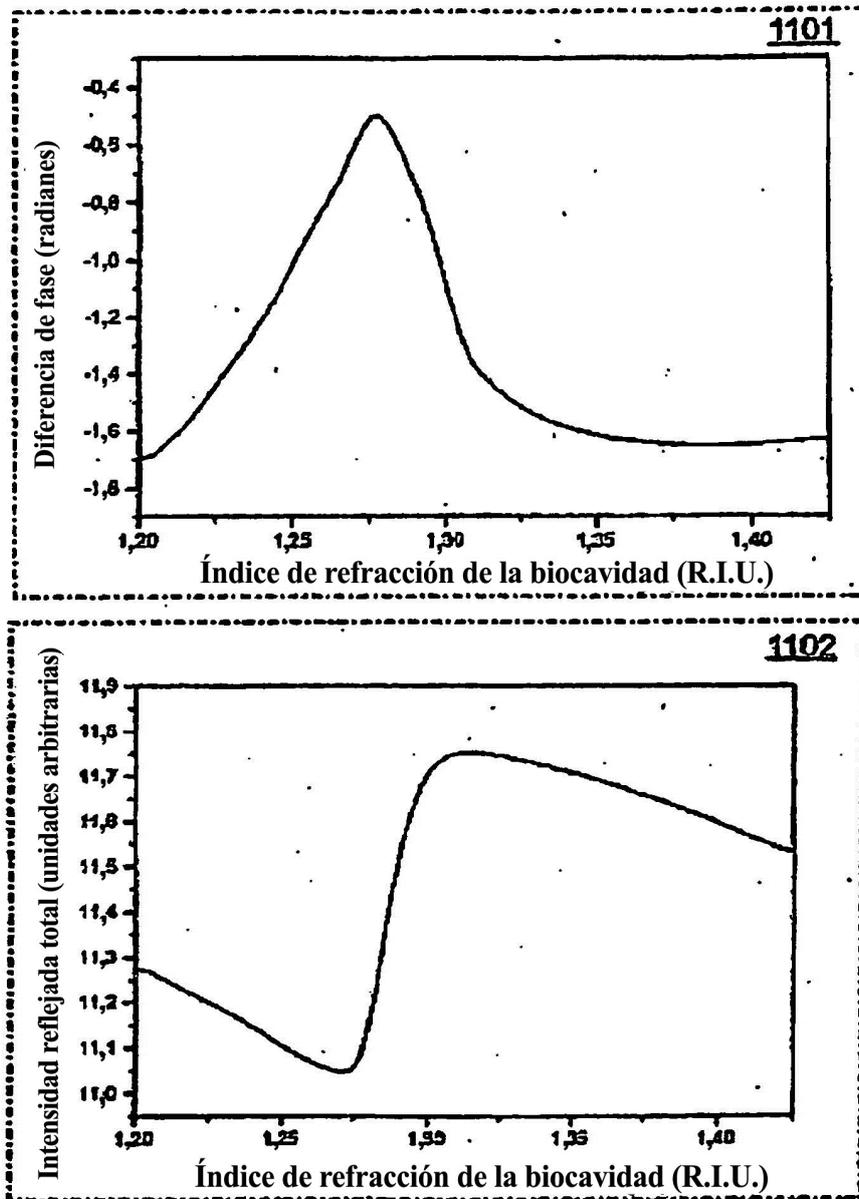


FIG. 11

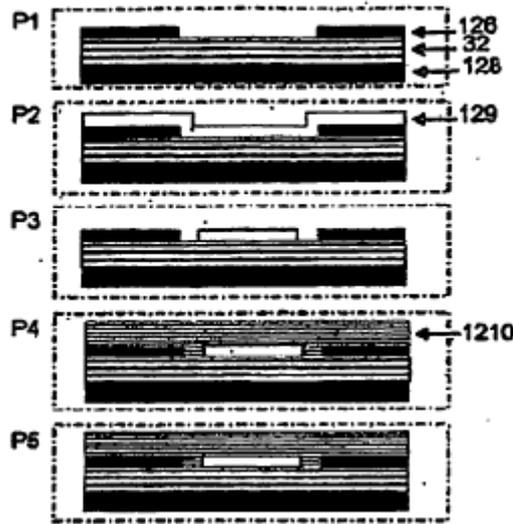


FIG. 12

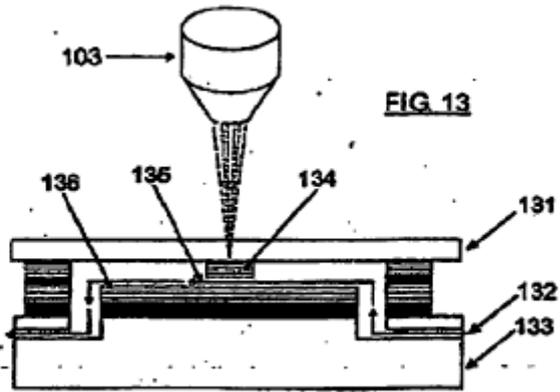


FIG. 13