

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

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
9 de Abril de 2009 (09.04.2009)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2009/043962 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
G01N 33/50 (2006.01) A61K 49/00 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)

Biológicas (CIB-CSIC), Ramiro de Maeztu 9, E-28040 Madrid (ES). **NOGUÉS SANMIQUEL, Maria del Carne** [ES/ES]; UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA, Edificio A, Campus de la Universidad Autonoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2008/070185

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Angel**; Glorieta Ruben Dario 4, E-MADRID 28010 (ES).

(22) Fecha de presentación internacional:
3 de Octubre de 2008 (03.10.2008)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P 200702623 5 de Octubre de 2007 (05.10.2007) ES

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

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US): **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS** [ES/ES]; C/ Serrano 117, E-28010 Madrid (ES). **UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA** [ES/ES]; Edificio A, Campus de la Universidad Autonoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra (ES).

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

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **ESTEVE I TINTÓ, Jaume** [ES/ES]; CENTRO NACIONAL DE MICROELECTRONICA (IMB-CNM-CSIC), Campus Universidad Autónoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra (ES). **PLAZA PLAZA, Jose Antonio** [ES/ES]; CENTRO NACIONAL DE MICROELECTRONICA (IMB-CNM-CSIC), Campus Universidad Autónoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra (ES). **SUAREZ GONZALEZ, Teresa** [ES/ES]; Centro de Investigaciones

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones

(54) Title: INTRACELLULAR DEVICE WHICH CAN BE USED AS A BIOLOGICAL ACTIVITY SENSOR ELEMENT OR ACTUATOR

(54) Título: DISPOSITIVO INTRACELULAR ÚTIL COMO ACTUADOR O ELEMENTO SENSOR DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

(57) Abstract: The invention relates to an intracellular device which can be used as a biological activity sensor element or actuator, formed by or based on silicon (monocrystalline silicon with crystallographic orientation (100), polysilicon or silicon oxide), having lateral physical dimensions of between 50 nanometres and 5 micrometres and a thickness of between 20 nanometres and 2 micrometres. The surface(s) of the device can be functionalised by coating same with chemical compounds, fluorescent molecules, proteins, antibodies, receptors, therapeutic agents, cell death protectors and, in general, any substance having biological activity which enables the biological functionalisation of same. The production of the device is based on current microelectronic techniques.

(57) Resumen: La invención describe un dispositivo intracelular útil como actuador o elemento sensor de actividad biológica constituido o de base de silicio (silicio monocristalino de orientación cristalográfica (100), polisilicio u óxido de silicio) con unas dimensiones físicas laterales comprendidas entre los 50 nanómetros y las 5 micras, y un espesor entre los 20 nanómetros y las 2 micras). Este dispositivo puede ser funcionalizado en la(s) superficie(s) mediante recubrimiento de compuestos químicos, moléculas fluorescentes, proteínas, anticuerpos, receptores, agentes terapéuticos, protectores de muerte celular y en general, cualquier sustancia con actividad biológica, que permite la funcionalización biológica del mismo. Las técnicas de fabricación empleadas se han tomado de la microelectrónica actual.



WO 2009/043962 A1

DISPOSITIVO INTRACELULAR ÚTIL COMO ACTUADOR O ELEMENTO SENSOR DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

5 SECTOR DE LA TÉCNICA

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

15 ESTADO DE LA TÉCNICA

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

superficies sensibles funcionalizadas químicamente, y dispositivos eléctricos como resistores y transistores.

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

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

Dado que los procesos celulares se suceden de manera dinámica, la mayor parte de los métodos actuales de determinación de los parámetros celulares se realizan en células manipuladas de una forma que compromete su viabilidad de forma irreversible. La necesidad de determinar parámetros celulares en células vivas bajo condiciones fisiológicas o patológicas, ha impulsado el desarrollo de métodos basados en la introducción de sustancias fluorescentes libres o acopladas a proteínas como también el desarrollo de técnicas del tipo FRET (acrónimo

inglés de Fluorescence Resonance Energy Transfer), y, FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching), etc. [8].

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

Otra línea de investigación ya firmemente establecida es la utilización de diversos tipos de micronanopartículas para alterar la célula desde su interior. Ejemplo de ello es la vehiculización de fármacos. Inicialmente se trataba de un método para proteger el fármaco frente a la acción del metabolismo de degradación, pero con posterioridad se ha desarrollado la tecnología necesaria para dirigir esos fármacos hacia las células diana elegidas utilizando marcadores celulares apropiados que distinguen receptores o proteínas específicos en las células diana. Si bien estas construcciones aún no han llegado a formas comerciales, se está trabajando intensamente en ellas y en su aplicación en el campo de la

terapia del cáncer [21,22]. En esta misma línea de investigación, se están empleando dendrímeros para generar nano transportadores multifuncionales que permitan dirigir los agentes terapéuticos a la localización exacta [23].

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

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

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

En esta misma línea de progreso, varios de los autores de esta

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

BIBLIOGRAFÍA

- 10 [1] Leduc, P et Al. Towards an in vivo biologically inspired nanofactory. Nature Nanotechnology Vol 2 Commentary 3-7, 2007.
- [2] Tudos A, Besselink G, Schassfoort R. Trends in miniaturized total analysis systems for point-of-care testing un clinical chemistry. Lap on Chip, 1:83-95, 2001.
- 15 [3] Reyes D, Iossifidis D, Aurooux P, Manz A. Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology, Anal Chem, 74:2623-2636, 2002.
- [4] Bharat Bhushan. Nanotribology and nanomechanics of MEMS/NEMS and BioMEMS/BioNEMS materials and devices
20 Microelectronic Engineering, Volume 84, Issue 3, March 2007, Pages 387-412 Nature Nanotechnology 2, 3 - 7 (01 Jan 2007) Commentary.
- [5] Andersson H, van den Berg A. Microtechnologies and nanotechnologies for single-cell analysis. Curr Opin Biotechnol, 15:44-49,
25 2004.
- [6] Slavki, J. Fluorescent Probes in Cellular and Molecular Biology, CRC press:Boca Ratón, Fl, 1994.
- [7] Nuccitelli, R. In Methods in Cell Biology, vol (40) : 368, 1994
- [8] Day RN, Schaufele F. Imaging molecular interactions in living cells.
30 Mol. Endocrinol. 2005, 19:1675-86.
- [9] Elke et al, Journal of Controlled Release 76 (2001):149-168.

- [10] Benoit Dubertret, et al, In Vivo Imaging of Quantum Dots Encapsulated in Phospholipid Micelles, Science 29 November 2002 298: 1759-1762 [DOI: 10.1126/science.1077194] (in Reports).
- [11] R. G. Denkewalter et al., U.S. patent 4,289,872 (1981), N. Malik et al., U.S. patent 7,005,124 , 2006.
- [12] "Nanobiotechnology", Niemeyer, CM, Mirkin, CA Eds. Wiley-VCH, Weinheim 2004.
- [13] Perrin-Cocon, L. A.; Marche, P. N.; Villiers, C. L. Biochem. J. 1999, 338, 123-130.
- [14] Koenig, S. H.; Kellar, K. E. Acad. Radiol. 1996, 3, 273.
- [15] Kohler, N.; Sun, C.; Wang, J.; Zhang, M. Langmuir 2005, 21, 8858-8864.
- [16] Roger, J.; Pons, J. N.; Massart, R.; Halbreich, A.; Bacri, J. C. Eur. Phys.J.: Appl. Phys. 1999, 5, 321-325.
- [17] Moroz, P.; Jones, S. K.; Gray, B. N. Int. J. Hyperthermia 2002, 18, 267- 284
- [18] Q.A. Pankhurst. et a., Applications of Magnetic Nanoparticles in Biomedicine, J. Phys D. Appli. Phys, 36,(2003):177-181.
- [19] Bertorelle, F. Wilhelm, C., Roger, J., Gazeau, F., Ménager, C. and Cabul, V. Langmuir 2006, 22, 5385-5391.
- [20] Burns, A., Ow. H., and Wiesner, U., Chem. Soc. Rev. 2006, 35, 1028-1042
- [21] M. Ferrari, U.S. patent 6,107,102 (2000).
- [22] Ferrari, M., Cancer NanoTechnology: Oportunities and Challenges, Nature Reviews Vol 5, 2005.
- [23] Torchilin, VP 2006 Multifunctional nanocarriers. Advance Drug Delivery Reviews, 58:1532-1555.
- [24] Park EJ, Brasuel M, Behrend C, Philbert MA, Kopelman R. Ratiometric optical PEBBLE nanosensors for real-time magnesium ion concentrations inside viable cells. Anal Chem. 2003, 75:3784-91.

- [25] Macrez N, Mironneau J. Local Ca²⁺ signals in cellular signalling. Curr Mol Med. 2004, 4:263-75.
- [26] . Duch, J. Esteve, R. Gómez, J.A. Plaza, L. Barrios, E. Ibáñez, E. Fernández, C. Nogués, Micro-Nano Devices for Single Living Cell Studies, Presentación en la Conferencia de Dispositivos Electrónicos (CDE-2007), 31 enero al 2 febrero, Madrid, España, 2007.
- [27] E. Fernández, E. Ibañez, L. Barrios, JA. Plaza, J. Esteve, M. Duch, R. Gómez, C. Nogués, Macrophages capability to phagocyte silicon microparticles analysed by confocal laser scanning microscope, Focus On Microscopy Conference, April 10-13, Valencia, Spain, 2007.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

15 Descripción Breve

Un aspecto de la invención lo constituye un dispositivo intracelular útil como actuador o elemento sensor de actividad biológica, en adelante dispositivo de la invención, constituido o de base de silicio con unas dimensiones físicas laterales comprendidas entre los 50 nanómetros y las 20 5 micras, y un espesor entre los 20 nanómetros y las 2 micras).

Un aspecto particular de la invención es el dispositivo de la invención en el que el material pertenece al siguiente grupo: silicio monocristalino, polisilicio y óxido de silicio.

Otro aspecto particular de la invención es el dispositivo de la 25 invención en el que la(s) superficie(s) del dispositivo está(n) recubierta(s) por compuestos químicos, moléculas fluorescentes, proteínas, anticuerpos, receptores, agentes terapéuticos, protectores de muerte celular y en general, cualquier sustancia con actividad biológica, que permite la funcionalización química o biológica del mismo.

Otro aspecto de la invención es el uso de un dispositivo de base de silicio para la elaboración de un (micronano) dispositivo intracelular útil como actuador o elemento sensor de actividad biológica.

5 Descripción Detallada

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

La presente invención se basa en que los inventores han observado que dispositivos de base de silicio de dimensiones micro o nano (dimensiones físicas laterales comprendidas entre los 50 nanómetros y las 5 micras, y un espesor entre los 20 nanómetros y las 2 micras), pueden utilizarse como dispositivos intracelulares actuadores o sensores de actividad biológica sin afectar a la viabilidad celular (Ejemplo 2), permitiendo, a su vez, el estudio *in vivo* de parámetros en diferentes procesos dentro de las células y los tejidos, por ejemplo como biosensor de actividad enzimática o cambios de funcionalidad celular (Ejemplo 3). Se ha comprobado que estos dispositivos de silicio pueden internalizarse en células tanto de forma espontánea como artificial. Así inicialmente, se evaluó la internalización del dispositivo de la invención en diferentes tipos de células y tejidos: macrófagos humanos, células HeLa y de *Dictyostelium discoideum*, retina de embriones de pollo y embriones de ratón,, observándose que incluso en los casos de embriones, células altamente sensibles, eran claramente biocompatible (Ejemplo 2, figura 12).

Estos dispositivos de base de silicio son bien conocidos para el desarrollo de aplicaciones electrónicas, pueden ser impresos o marcados con determinados rasgos trazados de forma selectiva y controlada en las superficies que pueden conllevar múltiples operatividades y fabricados combinando técnicas fotolitográficas, microelectrónica de silicio y de

nanofabricación (ver Ejemplo 1). Esta técnica combinada está esencialmente basada en la combinación de un dispositivo en lámina y una lámina de guía que recubre una oblea de silicio. Las dimensiones verticales del dispositivo de la invención se pueden fijar con una precisión nanométrica del espesor del dispositivo (silicio o polisilicio), mientras que las técnicas fotolitográficas definen las dimensiones laterales con una precisión micrométrica o submicrométrica. De forma resumida, el dispositivo es obtenido por un ataque vertical de la capa estructural, seguido por su liberación de la oblea soporte mediante el ataque de la capa de sacrificio. Al final, los dispositivos son suspendidos en etanol y recogidos mediante ultrasonidos. Esta aproximación proporciona más de 150 millones de dispositivos al procesar una oblea de 4 pulgadas, cada uno de los cuales presenta una forma y tamaño perfectamente reproducible y controlado (Ejemplo 1). Tras estudiar distintas formas y dimensiones (Fig. 14a-d), los dispositivos con dimensiones laterales o diámetro de 1.5-3 μm y con un espesor de 0.5 μm (polisilicio) o de 1.5 μm (silicio) se seleccionaron para los estudios presentados en la presente invención. Un dispositivo de 3 μm puede ser introducido en una célula, y ser visible mediante microscopía de luz convencional (Figura 11.a-d).

Se trata ahora de mencionar las variables celulares observables mediante estos dispositivos inventados. Si se emplean como un sensor, se dirá entonces que se mide alguno de los llamados, de forma general, "Parámetros intracelulares físicos". Se trata en este caso de magnitudes físicas observables en el interior de las células como puedan ser, la viscosidad, temperatura y presión. Del mismo modo se hablará de los "Parámetros intracelulares químicos", que serán todas aquellas magnitudes químicas medibles, como, por ejemplo, el pH o el potencial redox. Aun más, tal y como se utiliza en la presente invención el término "Parámetro intracelular biológico", se refiere así, de igual manera, a cualquier magnitud que ponga en evidencia la presencia de determinados compuestos biológicos, o bien su acción dentro del medio. Para una mayor

comprensión se citarán en este caso, la concentración de iones, la actividad enzimática o la presencia de proteínas y ligandos, etc.

En este sentido, al ser esta tecnología muy versátil y basada en tecnologías convencionales de las industrias semiconductor/MEMS/NEMS, incrementa las posibilidades de generar dispositivos más complejos, combinando materiales o en 3D en un futuro, por ejemplo, para producir una nanobobina en un dispositivo mediante la técnica Focused Ion Beam (Figura 20a-b). Dispositivos compuestos de diferentes materiales pueden abrir nuevas posibilidades para nuevas aplicaciones ²². Por ejemplo, dispositivos han sido fabricados de polisilicio y oro, con una alta definición de formas y tamaños (Figura 14e). Las sustancias que recubren los diferentes materiales poseen diferentes utilidades. Estas sustancias pueden detectar diferentes parámetros intracelulares, o unas se pueden utilizar para detectar y las otras para mover el micronano dispositivos intracelular a la zona precisa en la célula, donde se han de detectar los parámetros intracelulares o unas pueden servir para detectar y las otras para visualizar la partícula.

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

A su vez, un distintivo de esta invención, pueden contener una o más funciones lógicas diferentes, en un mismo dispositivo. Entendiendo cómo se ha dicho líneas arriba, por función lógica operativa interna cualquier depósito particularizado por su naturaleza y su forma, que permite realizar una determinada medida u observación de un parámetro o actividad en el interior de la célula residente. Así, estos dispositivos intracelulares pueden comprender uno o varios elementos sensibles, o aptos, para determinar parámetros químicos y/o físicos intracelulares e,

igualmente, con capacidad de registro y/o emisión de una señal que sea observable y medible por los experimentadores e incluso como un actuador, por ejemplo para la vehiculización de sustancias como medicamentos o para la eliminación de la célula mediante una acción como la hipertermia o por un tóxico (Figura 21). La manera de llevar a cabo un buen número de determinaciones y actuaciones, todas ellas casi en un mismo tiempo, se puede lograr mediante la definición e implementación de una llamada "lógica interna operativa". Se define esta lógica interna como la colocación en la superficie del dispositivo de una serie de trazos o motivos (logrados mediante aplicación de técnicas conocidas como la litografía y otras varias mencionadas más adelante). Esos trazos o motivos son necesarios para que el dispositivo pueda efectuar todas y cada una de las funciones o tareas, bio-físico-químicas, para las cuales se ha diseñado. Cada trazo o motivo de una lógica corresponde a una funcionalidad bien determinada. La fabricación de dispositivos micronano electrónicos con una lógica interna, fijada en función de unas previsiones experimentales, es la principal aportación de esta invención, ya que no aparecía descrita anteriormente en las referencias [26, 27]. La gran ventaja industrial de estos dispositivos reside en el hecho de que se pueden fabricar con una bien experimentada tecnología microelectrónica y de nanofabricación, ambas caracterizadas por lograr dimensiones reducidas (en el rango antes mencionado), y que a su vez que se pueden producir en grandes cantidades, bajo formas y dimensiones distintas, y todas bien elegidas por el diseñador, como se logra en la fabricación microelectrónica.

La forma, dimensiones físicas y composición de los dispositivos presentados en esta invención dependen de la función a desarrollar aunque su uso intracelular justifica que se realicen predominantemente de forma y bordes redondeados. Por tanto, no presentan, únicamente, una forma esférica y sí pueden tener dimensiones elegidas bajo un criterio técnico. En la figura 1.A se muestra una vista en perspectiva de una

posible geometría con forma de paralelepípedo con anchura A y longitud L. Donde (1) representa el material que hace de sustrato, y (2) la superficie de la estructura sobre la cual se podrá funcionalizar o realizar un micronanodispositivo MEMS (Microelectromechanical System) o NEMS (Nanoelectromechanical System), según el trabajo a realizar. En la Figura 1.B se muestra una sección del dispositivo con espesor E.

Finalmente, el dispositivo de la invención puede actuar como sustrato de reacciones químicas o enzimáticas y, por ejemplo mediante evaporación en ultra alto vacío, se puede depositar sobre el cualquier sustancia con actividad biológica suficiente para permitir la funcionalización del dispositivo con varios objetivos: detectar alguna sustancia química presente, localizarlo, poder dirigirlo a una determinada región de la célula o tejido. En particular el dispositivo de la invención va a tener una o varias de sus superficies cubiertas, durante el proceso de fabricación, por materiales con una reactividad química superficial diferenciada. Estos materiales pueden ser óxido o nitruro de silicio, oro, platino, cobre u otros metales, óxidos metálicos de carácter ácido o alcalino como el de titanio, hierro, tantalio, boro, o silicatos o siliciuros de metales compatibles como el de tantalio, hierro, aluminio, etc., que a su vez pueden ser recubiertos por moléculas fluorescentes, proteínas, anticuerpos, sustratos, drogas antitumorales, protectores de muerte celular (Figura 3).

La fabricación de los dispositivos de la presente invención se realiza con técnicas de microfabricación y nanofabricación tomadas de la industria microelectrónica y de la fabricación de MEMS y NEMS. Las técnicas de litografía se emplean durante el proceso de fabricación para definir la lógica interna y las áreas en dónde colocar los materiales funcionales dentro de los dispositivos. Dichas técnicas a aplicar en virtud de la funcionalidad que se le quiera dar al dispositivo, se escogerán entre las disponibles, como son: la fotolitografía óptica, la litografía de rayos-X, la litografía mediante cañón de haz de electrones, fotolitografía con

microscopios de AFM (*Atomic Force Microscope*) y fotolitografía por nano-impresión. La resolución de la técnica litográfica determina las dimensiones del rasgo a definir. De hecho, actualmente, la fotolitografía óptica basada en láseres excímeros de ArF, emisión de luz de longitud de onda 193 nm puede llegar a realizar dimensiones cercanas a los 50 nm utilizando técnicas de optimización de la resolución. Para dimensiones menores, se utilizan técnicas de nanolitografía que emplean ondas de menor longitud como son, la litografía de ultravioleta extremo (longitudes de onda de 11-13 nm) o la litografía por haz de electrones (longitud de onda de 0.01 nm).

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

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

intracelular de la invención (9) hasta llegar a la capa de sacrificio (5),
Figura 4.D. Este ataque se realiza con técnicas de grabado químico
utilizando mezclas ácidas o básicas, técnicas de grabado físico como
ataques secos de iones reactivos, o, finalmente, un ataque por bombardeo
5 de iones de galio. Seguidamente se elimina (10) la resina que se utilizó
como máscara por un medio conveniente, plasma de oxígeno, decapantes
de resina, acetona u otros disolventes, (Figura 4.E). Finaliza el proceso de
fabricación del dispositivo con un ataque (11), principalmente en atacantes
en fase líquida o vapor, de la capa de sacrificio (5) y los dispositivos
10 intracelulares (12) quedan liberados, Figura 4.F. Entre los distintos pasos y
procesos de fabricación se llevan a cabo tratamientos químicos regulares
con el fin de limpiar el sustrato de posibles restos anteriores.

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

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

Hasta aquí se ha descrito, por simplicidad, un proceso para la
30 fabricación de micronano dispositivos de un único material para medir una
sola variable biológica, una única funcionalidad. En el caso de que el

técnico o ingeniero precise la medida de varios parámetros biológicos intracelulares deberá repetir los pasos o añadir otros.

Las Figura 7.A y 7.B muestran una vista en perspectiva y un vista de una sección de un dispositivos con forma de paralelepípedo, con dos materiales (1) y (14) con dimensiones laterales, L y A, preferentemente
5 materiales (1) y (14) con dimensiones laterales, L y A, preferentemente entre 50 nm y 5 μm y espesores, E1 y E2, entre 20 nm y 2 μm . Estos dispositivos tienen la superficie de uno de los materiales (13) cubierta por una sustancia bioquímica y tienen la superficie del otro material (2) cubierta por otra sustancia bioquímica.

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

laterales de cada material preferentemente entre 50 nm y 5 μ m y espesores de cada capa entre 20 nm y 2 μ m. A modo de ejemplo, en la Figura 9 se muestra una fotografía mediante microscopio de rastreo por electrones de un dispositivo fabricado en el cual se tienen dos materiales separados y bien diferenciados, oro y polisilicio.

Por el mismo procedimiento se pueden preparar dispositivos intracelulares formados por varios materiales diseñados, mediante la técnica de fotolitografía, de manera tal que forman un código de barras, la única condición que han de guardar entre sí, es que sean biocompatibles.

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

Esta invención proporciona micronano dispositivos que permiten la medida de parámetros intracelulares físicos, químicos o biológicos o la actuación sobre elementos de la misma y la posibilidad de monitorizar la

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

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

Así, un aspecto de la invención lo constituye un dispositivo
25 intracelular útil como actuador o elemento sensor de actividad biológica, en adelante dispositivo de la invención, constituido o de base de silicio con unas dimensiones físicas laterales comprendidas entre los 50 nanómetros y las 5 micras, y un espesor entre los 20 nanómetros y las 2 micras).

Un aspecto particular de la invención es el dispositivo de la
30 invención en el que el material pertenece al siguiente grupo: silicio (silicio

monocristalino de orientación cristalográfica (100)), polisilicio y óxido de silicio.

Otro aspecto particular de la invención es el dispositivo de la invención en el que la(s) superficie(s) del dispositivo está(n) recubierta(s) por compuestos químicos, moléculas fluorescentes, proteínas, anticuerpos, receptores, agentes terapéuticos, protectores de muerte celular y en general, cualquier sustancia con actividad biológica, que permite la funcionalización química o biológica del mismo.

Otro aspecto de la invención es el uso de un dispositivo de base de silicio para la elaboración de un (micronano)dispositivo intracelular útil como actuador o elemento sensor de actividad biológica.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1.- Representación de un dispositivo intracelular con forma de paralelepípedo de acuerdo con la invención. 1.A vista perspectiva y 1.B vista de una sección de una geometría con forma de paralelepípedo con anchura A, longitud L y espesor E, donde (1) representa el material que hace de substrato y (2) la superficie del dispositivo. Las Figuras 1.A y 2.A muestran en detalle dispositivos con forma de paralelepípedo y disco, respectivamente, con dimensiones laterales, L, A y D, preferentemente entre 50 nm y 5 μ m y espesores, E, entre 20 nm y 2 μ m. Estos dispositivos se fabricaron con un substrato de silicio monocristalino de orientación cristalográfica (100) (1), u otro cualquiera, a conveniencia.

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

Figura 3.- Representación de una vista de una sección de un dispositivo intracelular con las superficies cubiertas por una sustancia con actividad biológica. Sección recta de un dispositivo

intracelular, como el de las Figuras 1 y 2, en el cual se ha cubierto la superficie (2) con algunas sustancias diseñadas para su funcionalización (3).

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

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

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

Figura 7.- Representación de un dispositivo intracelular con forma de paralelepípedo con dos materiales. 7.A vista perspectiva y 7.B vista de una sección de un dispositivo con forma de paralelepípedo con dos
25 materiales (1) y (14) apilados de espesores E1 y E2 y dimensiones laterales, L y A con dos superficies (2) y (13) de dos materiales diferentes.

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

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

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

Figura 11.- Internalización del dispositivo de la invención en células. Microscopia óptica de luz (a-d), confocal (e-h) e imágenes SEM (i-p) de células con el dispositivo de la invención. a, e *D. discoideum*, b, f, i-k, m-o macrófagos, c, g, l, p células HeLa, d embrión unicelular de ratón y h neuroretina. Las flechas amarillas indican la posición del dispositivo de la invención, los núcleos son vistos en azul, el citoplasma en verde y la membrana plasmática en rojo. Aunque el dispositivo de la invención puede ser claramente visible durante el proceso de fagocitosis (i, detalle j), su localización dentro de las células (k, l) requiere un análisis XPS para confirmar que las protrusiones (k) corresponden a la internalización de los dispositivos basados en silicio (m, n). La internalización fue además demostrado con una estación de trabajo de FIB-SEM (las figuras o, p se corresponden con las células de k y l, respectivamente). Barra = 10 µm, excepto que se indique lo contrario.

Figura 12.- Viabilidad de las células conteniendo el dispositivo de la invención. Las células HeLa con dispositivos internalizados después de 3 (a) y 7 días (b) en cultivo se evaluaron mediante CLSM. El citoplasma verde se corresponde con células viables que hidrolizan el diacetato fluoresceína emitiendo luz fluorescente y los puntos blancos se corresponden con el dispositivo de la invención. c) El gráfico muestra el porcentaje de supervivencia de macrófagos con dispositivos fagocitados durante un seguimiento individual de 10 días. Barra = 10 µm. d) el gráfico muestra el porcentaje de embriones que se desarrollan con o sin

dispositivos microinyectados. Las imágenes se corresponden con embriones con un dispositivo inyectado a diferentes estadios preimplantación. Barra = 30 μm . en todos los gráficos la barra error representa la desviación estándar y no existen diferencias significantes
5 entre células o embriones con o sin dispositivos. Las flechas amarillas indican la localización de los dispositivos.

Figura 13.- Utilidad del dispositivo de la invención funcionalizado con FDA como sensor de actividad citoplasmática esterasa. El dispositivo funcionalizado con FDA emite fluorescencia verde al interactuar con la
10 esterasa citoplasmática de células *D. discoideum* (a) y HeLa (b). Las células fueron evaluadas con microscopía confocal con escáner láser (confocal laser scanning microscopy, CLSM). Barra = 10 μm .

Figura 14.- Imágenes intracelulares SEM del dispositivo de la invención. La tecnología de fabricación basada en técnicas fotolitográficas
15 comúnmente usadas en la industria de semiconductores permite dispositivos de forma que se puede controlar a nivel micrométrico o incluso submicrométrico. Imágenes SEM de un dispositivo de silicio de 1.5 μm de espesor de forma cilíndrica (a), peine (b) o barra (c). Además, esta tecnología permite dispositivos de distintos materiales y combinaciones
20 para ser fabricados de forma muy precisa. (d) Imagen SEM de un dispositivo de polisilicio de 0.5 μm de espesor y (e) de un dispositivo compuesto de dos materiales no alienados, una plataforma cuadrada (flecha roja) parcialmente cubierta de una plataforma de oro (flecha azul).

Figura 15.- Imagen de una microinyección del dispositivo de la invención en el citoplasma de un embrión unicelular de ratón.
25

Figura 16.- Dispositivo fagocitado por un macrófago. Imágenes confocales de un macrófago con un dispositivo de la invención. (a) secciones (z-stacks) de planos focales consecutivos (0.2 μm cada uno) en el que el dispositivo puede ser visto desde el plano focal 25 al 35 (flechas amarillas). (b) imágenes en proyección máxima. (c) proyecciones ortogonales de las reconstrucciones z-stack. El dispositivo claramente se
30

localiza próximo a la membrana plasmática (rojo).

Figura 17.- Dispositivos internalizados mediante fagocitosis y lipofección. Galería representativa de imágenes z-stack no consecutivas tomadas con un microscopio confocal cada 0.5 μm . Ameba *D. discoideum* expresando GFP con un dispositivo fagocitado (**a**). Células HeLa lipofectadas con el dispositivo de la invención, cargadas con la tinción vital CFDA (**b**), y neuroretina de embrión de pollo lipofectada con el dispositivo (**c**). Las flechas amarillas indican la posición del dispositivo mientras que el núcleo es visto en azul y el citoplasma en verde.

10 **Figura 18.- Nanomecanización de un macrófago con un dispositivo internalizado.** Se muestra la internalización del dispositivo de la invención mediante la sección del macrófago con equipo de FIB-SEM.

Figure 19.- Seguimiento individual de macrófagos con un dispositivo fagocitado. Porta reticulado (**a**) que muestra el seguimiento del mismo macrófago con un dispositivo de la invención fagocitado durante diez consecutivos (**b**). La línea blanca indica el desplazamiento del macrófago y los números se corresponden con el día en que la imagen fue tomada.

15 **Figure 20.- Imagen 3D de un dispositivo nanoestructurado.** Imágenes SEM de 3 μm x 3 μm x 0.5 μm de un dispositivo de polisilicio antes (**a**) y después (**b**) nanobobina mediante Focused Ion Beam (FIB). Las imágenes muestran la fabricación helicoidal para demostrar que dispositivo de la invención nanoestructurado en 3 dimensiones (3D) pueden ser obtenidos.

20 **Figure 21.- Esquema de un potencial dispositivo integrante de distintas funciones.** Representación esquemática de un potencial dispositivo que comprende vehiculizadores y liberadores de fármacos, moléculas sensoras, elementos electrónicos, transductores emisores o receptores.

EJEMPLO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCIÓN

Ejemplo 1.- Visualización de dispositivos intracelulares cubiertos de un colorante vital en células HeLa, una línea inmortalizada de células derivada del carcinoma de cérvix.

5 El objetivo de este ejemplo es demostrar que el dispositivo de la invención fabricados puede ser introducidos en las células, no es tóxico y funciona como un sensor de la viabilidad celular.

1.1.- Fabricación y empleo de los dispositivos intracelulares de la invención

10 Para eliminar la posibilidad de daño celular es preferible diseñar el dispositivo con esquinas redondeadas para lo cual se ha elegido la geometría con forma de disco con diámetro D y espesor E, como se muestra en perspectiva en la Figura 2.A y una sección del mismo en la Figura 2.B.

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

Cómo se ha expuesto en los párrafos de la Descripción Detallada se realiza ahora el proceso fotolitográfico, esto es, la definición de los dispositivos, con la ayuda de una fotorresina positiva. Esto se lleva a cabo a irradiando dicha fotorresina con luz monocromática (longitud de onda
30 435 nm) un retículo de vidrio sobre el cual hay grabados, en cromo, las geometrías de los dispositivos. En este caso concreto, se dispusieron de

formas geométricas circulares de 3 μm de diámetro. Tras irradiar la fotorresina HiPR 6512 entre 5 a 8.5 segundos, se reveló ésta en una disolución de revelador ODP 462 de Fujifilm. Aquella sólo queda presente sobre las zonas de la capa de silicio policristalino que definen los dispositivos intracelulares. Se pasa al proceso siguiente. Consistió en un ataque vertical a toda la superficie de silicio policristalino en un equipo del proceso DRIE (Deep Reactive Ion Etching). Este ataque seco de plasma finaliza al alcanzar la capa de óxido de silicio. Después de este paso del proceso, los dispositivos están ya bien definidos pero todavía unidos al substrato por la capa de óxido. Seguidamente, se quitó la fotorresina que se utilizó como máscara hasta dejar la oblea totalmente limpia de compuestos orgánicos. Los dispositivos intracelulares, con geometría circular obtenidos en este ejemplo tienen un espesor de 0.5 μm dado por la capa de silicio policristalino depositado y un diámetro de 3 μm .

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

Se pasó acto seguido a los pasos del proceso de activado y recubrimiento de los dispositivos intracelulares. Una fracción de ellos (1 mililitro puede contener algo más de un millón), fabricados por el sistema anterior se lavaron y activaron mediante la aplicación sucesiva de

tratamientos en alcohol etílico, agua desionizada ultrapura, una mezcla de ácido nítrico y alcohol metílico (1:3), agua desionizada ultrapura y etanol. Después de cada etapa se separaron los dispositivos por centrifugación a 15000 rpm y se extrajo el líquido sobrenadante. A continuación se trataron con un agente heterobifuncional selectivo para superficies de óxido de silicio y que deja libre un grupo funcional reactivo adecuado para la siguiente etapa. En este ejemplo, para la amidación de la superficie se trataron los dispositivos con 3-aminopropiltriethoxisilano al 2% en alcohol etílico durante 1 hora, y se eliminó el exceso del reactivo mediante sucesivos lavados con alcohol etílico (de nuevo en cada etapa se separan los dispositivos por centrifugación).

La siguiente etapa consistió en la introducción en el dispositivo del compuesto que actúa como sensor químico selectivo que en este caso concreto es el diacetato de fluoresceína, capaz de emitir fluorescencia como respuesta a la actividad biológica enzimas (esterasas en este caso). Más concretamente, los dispositivos se trataron con (5,6)-isotiocianato del diacetato de fluoresceína disuelta en dimetilformamida seca (al 0.05%) durante 12 horas en un sistema aislado de la humedad exterior. El exceso de reactivo se eliminó mediante lavados con dimetilformamida y con tert-butil-metileter. La preparación final se mantuvo dispersa en 1 ml de este último disolvente. Los solventes fueron filtrados con filtros de 0.45 μm y las centrifugaciones se llevaron a cabo durante 10 min a 1,500 g (10°C).

En el caso de las partículas recubiertas con diacetato de clometilfluoresceína, el solvente es terbutilmetil éter, que es un disolvente aprótico poco polar y bastante volátil, y mantiene la integridad de la funcionalización. Para su introducción en los diferentes tipos celulares se requerirá un medio acuoso compatible con la viabilidad celular como, por ejemplo, un tampón fosfato salino 15 mM pH 7,5. Dichos dispositivos se mantuvieron en el solvente original a 4°C hasta el momento de su utilización. Así, las partículas se deben re-suspender en un volumen

adecuado para tener una concentración de partículas suficientes para cada ensayo.

1.2.- Internalización del dispositivo de la invención en células

5 Para llevar a cabo este experimento y siguientes se tomó una parte alícuota de dicha suspensión homogeneizada de los micronano dispositivos y se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 minutos, para eliminar el líquido sobrenadante (o bien se deja evaporar el solvente en su totalidad). Posteriormente, se añadieron 100 microlitros de tampón fosfato
10 pH 7.5 y se volvió a centrifugar. Se repitió el proceso una vez más y se resuspendieron las partículas en 5 ml del mismo tampón, hasta una densidad de partículas comprendidas entre 1.000 y 50.000 unidades/microlitro.

Las células *D. discoideum* y los macrófagos humanos se incubaron
15 con el dispositivo de la invención de silicio o polisilicio en una proporción 0.5-1 dispositivo/célula. Esta proporción se ajustó para alcanzar el número máximo de células con un único dispositivo fagocitado. Hay que destacar que en estos casos no fue necesario modificar la superficie del dispositivo para lograr la internalización. De forma alternativa, en células no
20 fagocitarias como las HeLa y el tejido neuroretina, se utilizó la lipofección (consiste en la encapsulación de materiales en una vesícula lipídica llamada liposoma) para internalizar el dispositivo de la invención. Se utilizaron distintas metodologías para liberar el dispositivo según el tipo de célula (ver Tabla 1).

25

30

Tabla 1.- Metodologías de la internalización del dispositivo de la invención utilizados

Cell type	<i>Dictyostelium discoideum</i>	Human macrophages	HeLa	Mouse one-cell embryos	Neuroretina from chicken embryos
Cell diameter	5-10 μm	10 -20 μm	10-20 μm	80-90 μm	-
Delivering method	Phagocytosis	Phagocytosis	Lipofection	Microinjection	Lipofection
Microscope techniques	<ul style="list-style-type: none"> • DIC • CLSM 	<ul style="list-style-type: none"> • DIC • CLSM • SEM/XPS • SEM/FIB 	<ul style="list-style-type: none"> • DIC • CLSM • SEM/FIB 	<ul style="list-style-type: none"> • DIC 	<ul style="list-style-type: none"> • DIC • CLSM

DIC = Differential Interference Contrast; CLSM = Confocal Laser Scanning Microscope; SEM = Scanning Electronic Microscope; XPS = X-Ray Photoelectron Spectrometer; FIB = Focused Ion Beam.

5 Células *D. discoideum* que expresaban constitutivamente la proteína fluorescente verde (GFP) o células con el fenotipo silvestre se mantuvieron en medio KK2 (2 horas a 25°C). Las células se cultivaron en placas de 24 pocillos (65,000 células/pocillo) y se incubaron en presencia de los dispositivos de silicio y polisilicio de la invención (2 horas /RT; 0.5-1

10 dispositivo/célula). La línea celular de monocitos humanos THP-1 (ECACC No.88081201) se mantuvo en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino 20% (FBS) bajo condiciones estándares. La diferenciación a macrófagos de las células THP-1 se estimuló cultivando las células en una placa de 24 pocillos (20,000 células/pocillo) en portas reticulados de cristal

15 en presencia de 16 μM phorbol 12-miristato 13-acetate (PMA, Sigma) durante 3 días. Los dispositivos de silicio monocristalino y polisilicio se añadieron en una proporción de 0.5 dispositivos/pocillo. La viabilidad celular se analizó mediante la incubación de las células con el Kit Cell Tracker Green CFDA (Molecular Probes) durante 15 minutos a 37°C. Las

20 neuroretinas aisladas se obtuvieron de embriones de pollo de cinco días y mantenidos en medio DMEM/F2+N2. Las retinas fueron cultivadas durante 5 horas con una mezcla de Lipofectamina 2000 y los dispositivos de silicio y polisilicio de la invención (50,000-100,000 dispositivos/retina). Las retinas con un espesor medio alrededor de 80 μm fueron colocados en una

membrana de nitrocelulosa. Los embriones de ratón fueron recogidos en estadio de una célula de hembras fértiles (B6CBAF1) y se mantuvieron en cultivo a 37°C en una atmósfera 5% CO₂ en medio KSOM conteniendo tanto aminoácidos esenciales como no esenciales y con 1 mg/ml de suero bovino con albúmina. Se inyectó un único dispositivo de la invención de silicio o polisilicio por embrión utilizando un sistema micromanipulador piezo-asistido (PiezoDrill, Burleigh Instruments Inc., NY; TransferMan NK2, Eppendorf, Hamburg, Germany). Después de la inyección, los embriones fueron transferidos y mantenidos en condiciones estándares de crecimiento hasta el estadio de blastocito. Su desarrollo fue valorado cada 24 horas. Un grupo control de embriones no inyectados (control de desarrollo) y embriones inyectados con una pequeña cantidad de medio H-KSOM+PVP (control de la inyección) se cultivaron en paralelo a los anteriores embriones inyectados con los dispositivos de la invención.

La internalización de los dispositivos de la invención se visualizó mediante microscopía de luz óptica (Fig. 11a-d), y se utilizó microscopía confocal con escáner láser (CLSM) para su localización específica en el citoplasma de *D. discoideum*, macrófagos y células HeLa (Fig. 11e-g; 16 y 17). CLSM fue además capaz de localizar los dispositivos en la capa interna del tejido neuroretiniano, a 40 µm en el tejido (Fig. 11h; 17). Los dispositivos de la invención fueron claramente identificados mediante un escáner de microscopía electrónica (Scanning Electron Microscope, SEM) durante el proceso de fagocitosis en macrófagos (Fig. 11i-j). Sin embargo, la localización del dispositivo de la invención dentro de la célula no pudo ser confirmada por esta técnica, aún cuando se observaron las protrusiones en la superficie de las células fueron observadas (Fig. 11k-l). Los dispositivos localizados en estas protrusiones (Fig. 11m) se verificaron mediante microscopía de rayos X de fotoelectrones (XPS, Fig. 11n). Por otro lado, la internalización de los dispositivos en el citoplasma de los macrófagos y de las células HeLa se confirmó mediante la combinación de la técnica Strata 235 Dual Beam Focused Ion Beam (FIB) y SEM work

station (FEI) (Salem, A. K., Searson, P. C. & Leong, K. W. Multifunctional nanorods for gene delivery. *Nature Mater.* **2**, 668-671 (2003); Milani, M. et al. High resolution microscopy techniques for the analysis of biological samples: a comparison. *Eur. Phys. J.- Appl. Phys.* **26**, 123-131 (2004))
5 (Fig. 11o, p; Figura 17). En su conjunto, estos resultados demuestran que los dispositivos de la invención pueden ser internalizados en una gran variedad de células utilizando distintos procedimiento (fagocitosis, lipofección y microinyección).

10 **1.3.- Determinación de la viabilidad celular y del uso intracelular como biosensor del dispositivo de la invención. ESTO NO SE PARECE AL EJEMPLO 1.1**

Recientemente, se ha descrito que el silicio mesoporoso es biocompatible y biodegradable cuando se utiliza como un sistema externo
15 de liberación (Tasciotti, E. et al. Mesoporous silicon particles as a multistage delivery system for imaging and therapeutic applications. *Nature Nanotechn.* **3**, 151-157 (2008). Aquí, lo que se pretende es ir un paso más allá y evaluar los efectos de los dispositivos de la invención sobre la viabilidad celular. Los experimentos con microdispositivos de la invención
20 se llevaron a cabo en células vivas (línea de células HeLa y en *D. discoideum*) para estudiar su funcionalidad y la viabilidad celular y toxicidad de los mismos en experimentos a largo plazo.

En este ejemplo y el anterior, las células Hela se mantuvieron creciendo en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
25 (High glucosa) de GIBCO suplementado con 2 mM glutamina, 1% de Penicilina /Estreptomicina y un 10% de suero bovino fetal (a este medio le denominamos medio completo), en una atmósfera de 5% CO₂ a 37°C, hasta el momento del experimento. Para introducir los microdispositivos de 3 micras de silicio policristalino se empleó la lipofección mientras que las
30 células *D. discoideum* los fagocitan. Los liposomas conteniendo el dispositivo de la invención de silicio monocristalino o polisilicio se

incubaron con las células HeLa (0.5-1 dispositivo/célula) o se depositaron en la lámina ganglionar de la neuroretina embrionaria de pollo (50,000-100,000 dispositivos/retina). Además, se valoró la internalización del dispositivo en embriones de ratón mediante microinyección de un único dispositivo en el citoplasma de un embrión en estadio de una célula (Figura 15).

La viabilidad celular se analizó cargando las células HeLa con una tinción vital (Cell Tracker Green 5-cloromethyl fluorescein diacetate, CFDA) y después de 3 y 7 días fueron evidentes células vivas sanas conteniendo los dispositivos de la invención (Fig. 12a-b). Los macrófagos humanos con dispositivos de la invención fagocitados fueron estudiados individualmente mediante un microscopio invertido durante 10 días usando un porta reticulado para seguir las células individuales (Figura 19). No se observaron diferencias significativas en la supervivencia celular entre células con o sin dispositivos fagocitados tras 10 días en cultivo (Fig. 12c). Además, se testó si la presencia de un dispositivo internalizado afectaba el desarrollo *in vitro* de un embrión de ratón hasta la etapa de blastocito, no encontrándose diferencias en el desarrollo entre los embriones inyectados y los controles (Fig. 12d). Esto demuestra que los dispositivos de la invención no comprometen la viabilidad embrionaria, lo cual es muy significativo porque los embriones son muy sensibles y cualquier alteración provoca su parada y muerte. En resumen, estos datos muestran que la internalización de los dispositivos de la invención son biocompatibles y no interfieren con la viabilidad de las células testadas.

Por otro lado, el uso de dispositivos intracelulares inteligentes, por ejemplo como biosensores en células vivas es un reto a resolver. Para demostrar que los dispositivos de la invención pueden ser sensores de actividad celular, se funcionalizaron los dispositivos con diacetato fluoresceína (FDA) y se introdujeron en células *D. discoideum* y HeLa. Más concretamente, en el caso de las células HeLa se realizó como sigue. En una placa de 24 pocillos con un soporte de cristal (cubreobjetos de 12 mm

de diámetro) en el interior de cada pocillo, se depositaron 50.000 células vivas. Al día siguiente, se aspiró el medio, se lavaron las células dos veces con medio Opti-MEM (GIBCO, Invitrogen) (el que se usará para la lipofección), y se mantuvieron con 500 microlitros de este medio durante al
5 menos 1 hora. La mezcla utilizada para la lipofección se realizó con dicho medio Opti-MEM y con Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Para ello, por cada pocillo se preparó una mezcla con 50 ml de medio Opti-MEM y 1.25 microlitros de Lipofectamina 2000 (Invitrogen), que se dejó 5 minutos a temperatura ambiente. Por otro lado se preparó la mezcla con los
10 micronanodispositivos en 5 microlitros de PBS (por cada 50.000 partículas) y 50 microlitros de Opti-MEM. Transcurridos los 5 minutos, se mezclaron ambas soluciones y se dejaron de 20 a 25 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se cubren las células con esta mezcla y se incuban a 37°C de 3 a 5 horas, para hacer que los dispositivos de la
15 invención entren en el interior de las células. Posteriormente, se eliminó el medio que contenía las partículas y se añadió un mililitro de medio completo. Dichas células se cultivaron de nuevo en una placa de 24 pocillos con una densidad inicial de 25.000 células por mililitro y se cultivaron en condiciones estándares durante 10 días. Al cabo de
20 diferentes periodos de tiempo, 1, 3 y 7 días, las células se fijaron con una disolución de paraformaldehído (PFA) al 4% durante 45 minutos, para ser observadas al microscopio. Transcurrido este tiempo, se lavaron las células dos veces con PBS. Para identificar el núcleo se empleó la tinción con 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) durante 10 minutos. El soporte
25 con las células se colocó sobre un portaobjetos con medio de montaje Fluoromount-G (SouthernBiotech) para su observación al microscopio.

La identificación de los dispositivos cubiertos con diacetato de clometil fluoresceína en el interior de estas células, se llevó a cabo mediante la visualización con microscopía confocal. Los dispositivos de
30 silicio policristalino son visibles por reflexión del láser y los sucesivos cortes en el eje z al microscopio demuestran que están en el interior de las

células. La observación de las células después de 3 y 7 días de cultivo, permitió comprobar que los micronanodispositivos de la invención se mantenían en el interior de las células, mientras estas se dividen activamente. Las células con los micronanodispositivos se mantuvieron
5 vivas durante varios días mostrando enteramente la no toxicidad del proceso seguido.

Los micronanodispositivos de la invención recubiertos con diacetato de clorometil fluoresceína presentes en el interior de las células además de ser detectados por reflexión del láser, mostraron fluorescencia de color
10 verde, debido a que las esterasas (enzimas presentes en el citoplasma celular) activas de las células vivas hidrolizan el diacetato de fluoresceína y éste emite color verde, ya fueran células Hela o de *D. discoideum* (Figura 13a) o en células HeLa (Figura 13b).

Todos los micronanodispositivos que se localizaron por microscopía
15 confocal en el interior de las células emitían fluorescencia, no así los que permanecen en el exterior, demostrando que no son tóxicos, ya que las células siguen vivas y fueron capaces de crecer formando una monocapa confluyente, y, por lo tanto, su capacidad como sensores de la viabilidad celular.

20

Material y métodos de imagen

El desarrollo embrionario y la viabilidad de los macrófagos se siguió y se fotografió con un microscopio invertido IX71 (Olympus, Hamburg, Alemania) usando contraste interferente diferencial. Para localizar los
25 dispositivos de la invención se utilizó un microscopio láser scanner confocal TCS SP2 AOBS (CLSM) con ópticos 63x (Leica. Heidelberg, Alemania). La membrana plasmática de los macrófagos fue marcada *in vivo* con aglutinina de trigo (WGA) conjugada con Texas Red (Molecular Probes) de acuerdo a las normas del fabricante. Los patrones de
30 excitación y emisión utilizados fueron 561 nm y 580-700 nm, respectivamente. Las células de *D. discoideum* y las células HeLa

lipofectadas se fijaron con 4% paraformaldehido durante 45 min y la neuroretina se fijaron durante toda la noche. Los núcleos se tiñeron con DAPI durante 10 min (4',6'-diamino-2-fenil-lindole; Molecular Probes) y las células y tejido se fijaron con Fluoromont-G (Southern Biotech). Células *D. discoideum* que constitutivamente expresan la proteína GFP y células HeLa tratadas con CFDA se monitorizaron con una posición de excitación y emisión de 488 nm y 505-550 nm, respectivamente. Una línea láser 351 nm se utilizó para dibujar los núcleos y la emisión de fluorescencia se midió a 415-460 nm. Los dispositivos de silicio monocristalino y polisilicio se iluminaron con una línea láser 488 nm y se detectaron mediante una luz reflejada a 480-495 nm, excepto cuando se funcionalizaron. El procesamiento y reconstrucciones 3D se realizaron con el software LCS Lite (Leica). Antes del examen SEM, los macrófagos y las células HeLa se fijaron con una solución de Karnovsky (2% paraformaldehido y 2.5% glutaraldehido) a temperatura ambiente (RT), se deshidrataron con etanol varias veces, un secado de punto crítico usando CO₂ (K850 critical point drier Emitech), montado, cubierto con oro y observado con un S-570 SEM (Hitachi. Tokyo, Japón). Las células fueron seccionadas mediante "FIB" para visualizar los dispositivos usando de forma combinada Strata 235 Dual Beam FIB y una estación de trabajo SEM (FEI. Hillsboro, OR, USA).

REIVINDICACIONES

1.- Dispositivo intracelular útil como actuador o elemento sensor de actividad biológica caracterizado porque está constituido o es de base de silicio con unas dimensiones físicas micronanométricas, preferentemente 5 unas dimensiones laterales comprendidas entre los 50 nanómetros y las 5 micras, y un espesor entre los 20 nanómetros y las 2 micras.

2.- Dispositivo según la reivindicación 1 caracterizado porque el material 10 de silicio pertenece al siguiente grupo: silicio monocristalino de orientación cristalográfica (100), polisilicio y óxido de silicio.

3.- Dispositivo según las reivindicaciones 1 y 2 caracterizado porque la(s) 15 superficie(s) del mismo está(n) recubierta(s) por una sustancia con actividad bioquímica o biológica que permite la funcionalización química o biológica del mismo.

4.- Dispositivo según la reivindicación 1 caracterizado porque la sustancia 20 con actividad pertenece al siguiente grupo: compuestos químicos, moléculas fluorescentes, proteínas, anticuerpos, receptores y agentes terapéuticos.

5.- Uso de un dispositivo de base de silicio para la elaboración de un 25 (micronano) dispositivo intracelular útil como actuador o elemento sensor de actividad biológica.

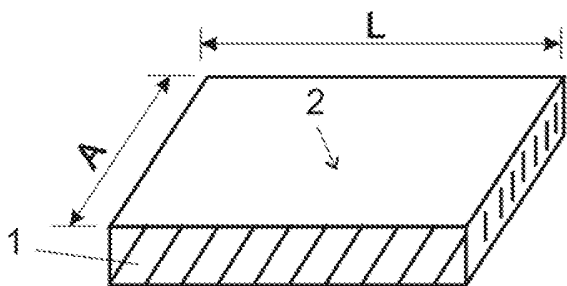


FIG. 1 A

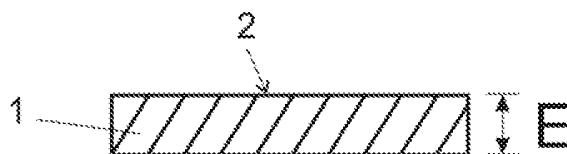


FIG. 1 B

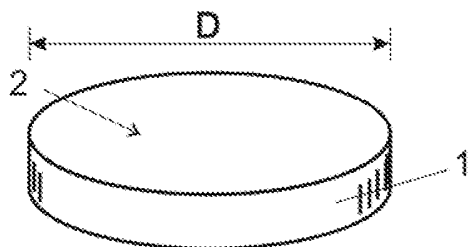


FIG. 2 A

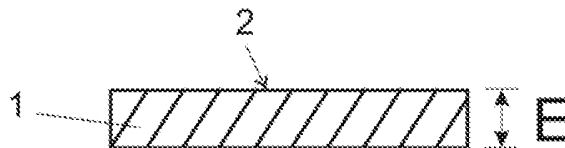


FIG. 2 B

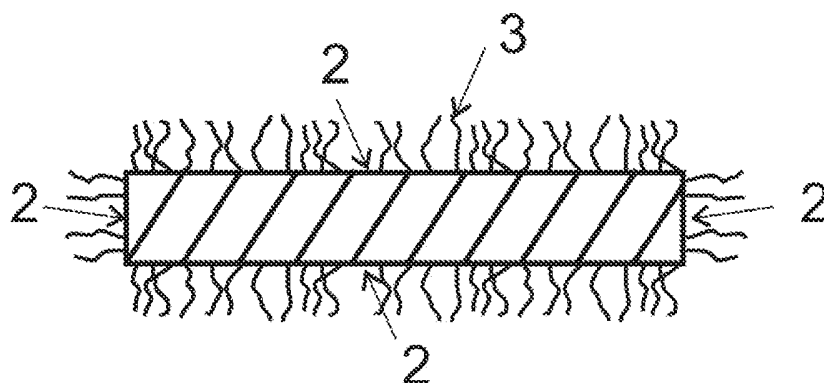


FIG. 3

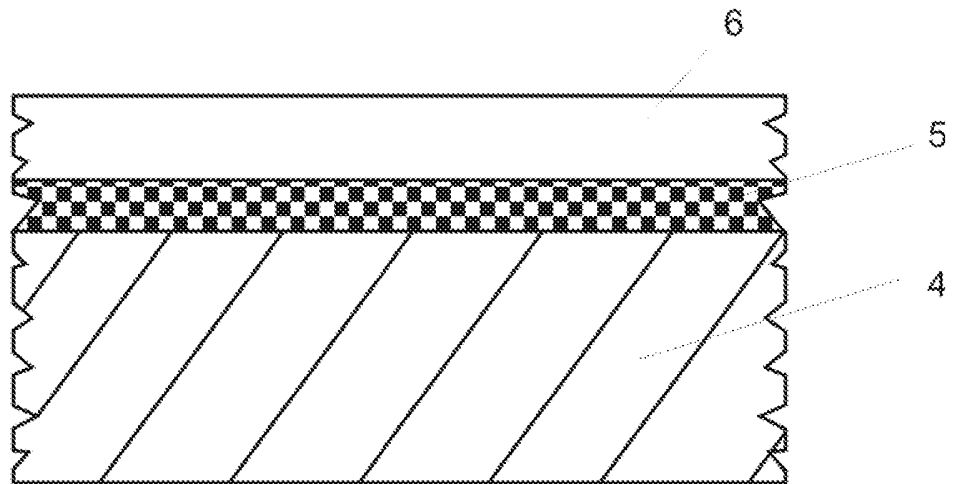


FIG. 4 A

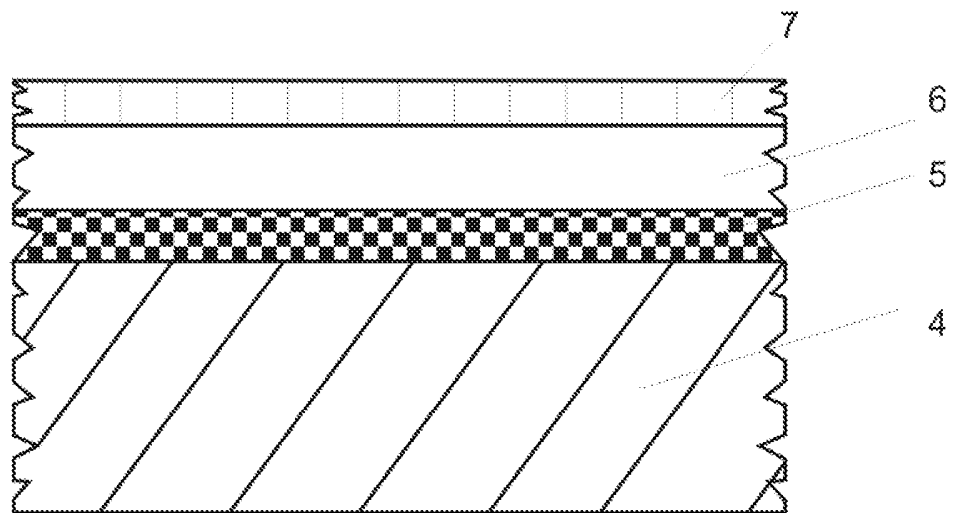


FIG. 4 B

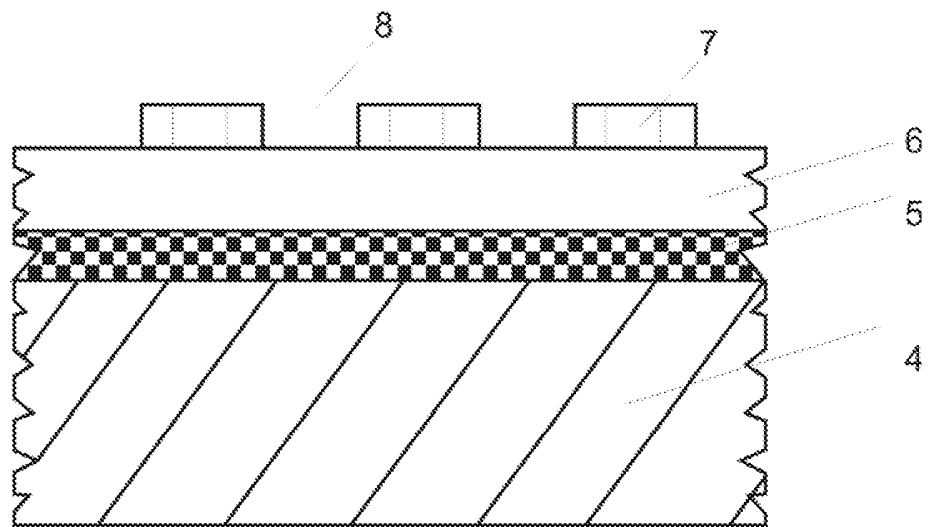


FIG. 4 C

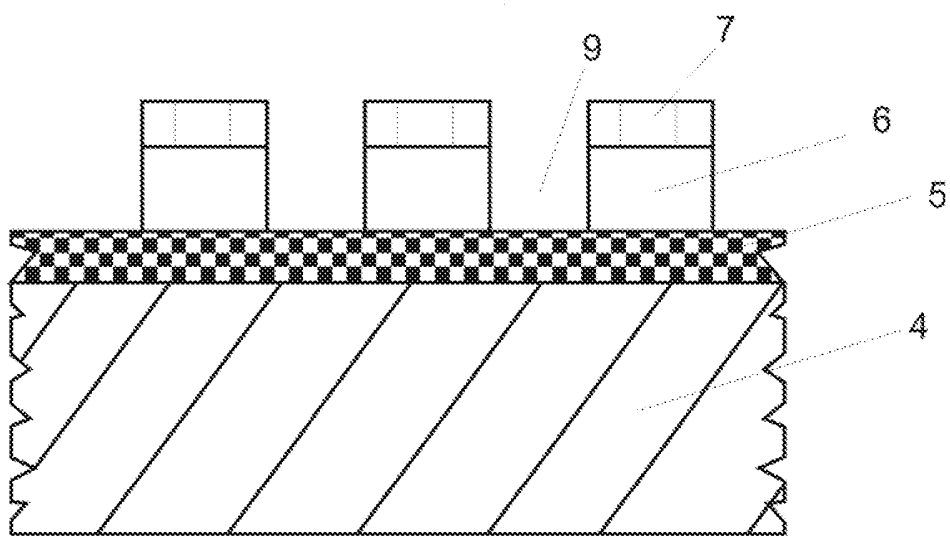


FIG. 4 D

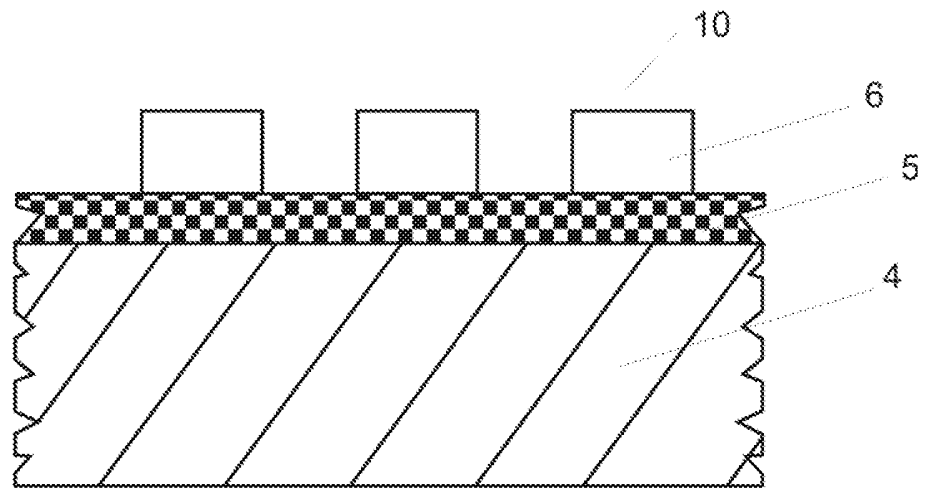


FIG. 4 E

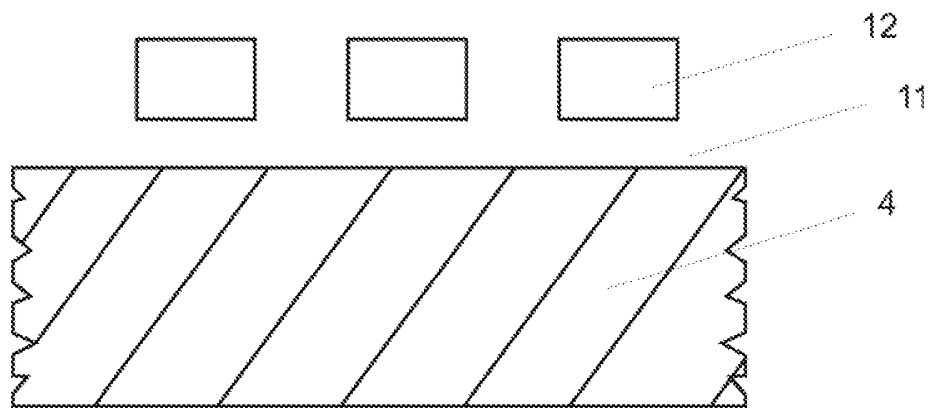


FIG. 4 F

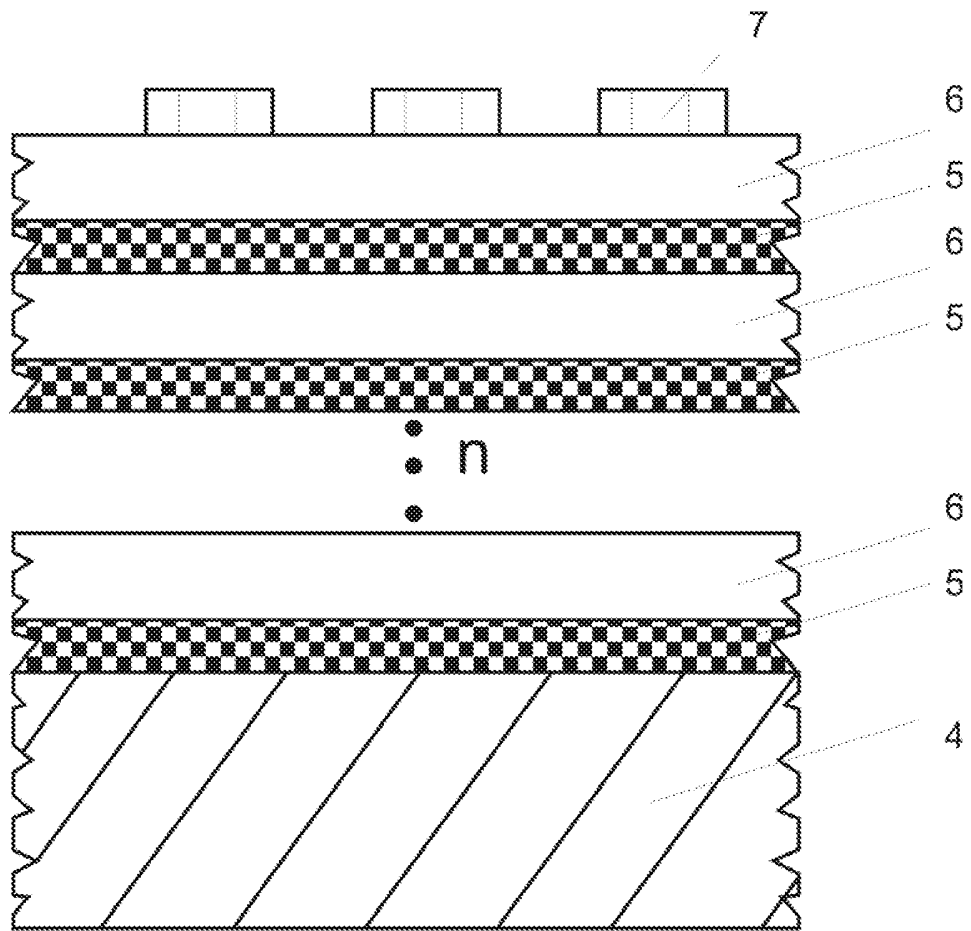


FIG. 5

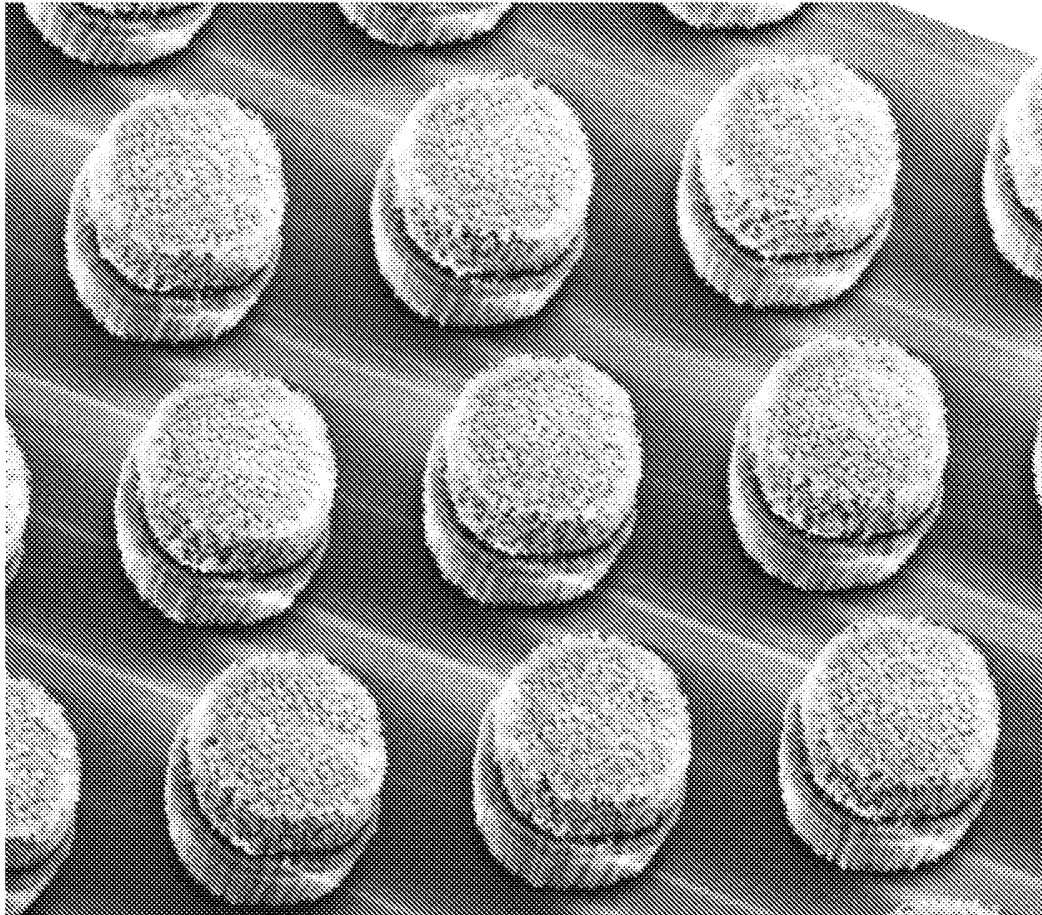


FIG. 6

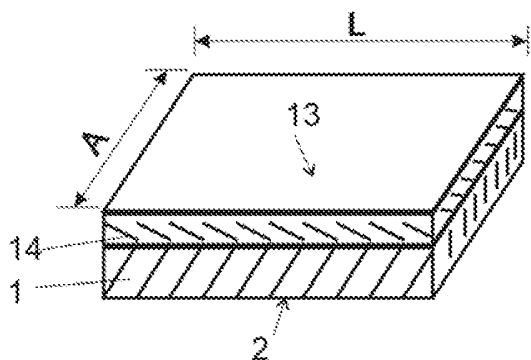


FIG. 7 A

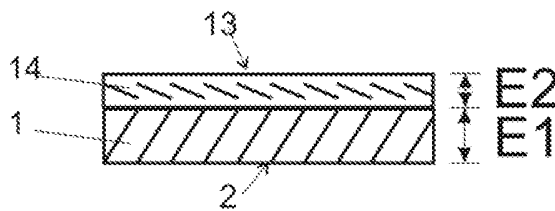


FIG. 7 B

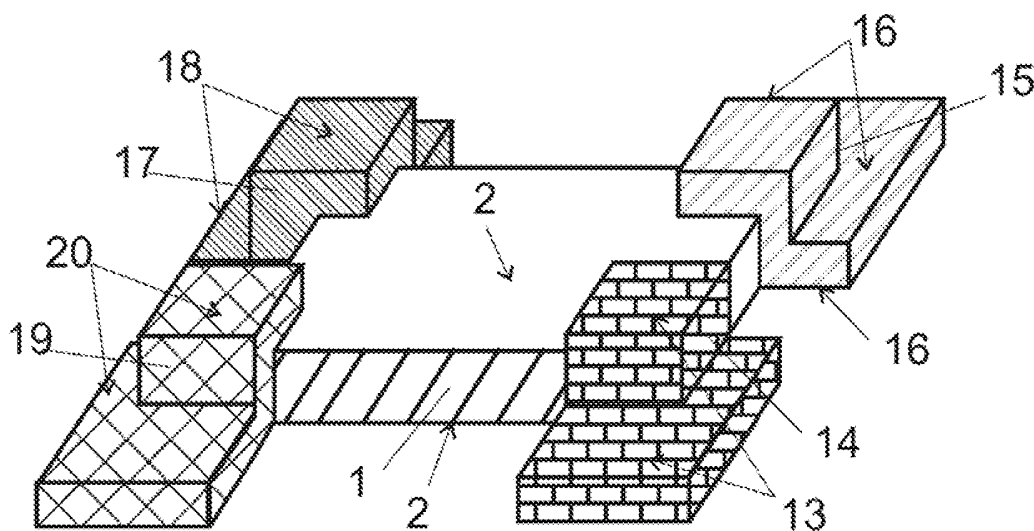


FIG. 8

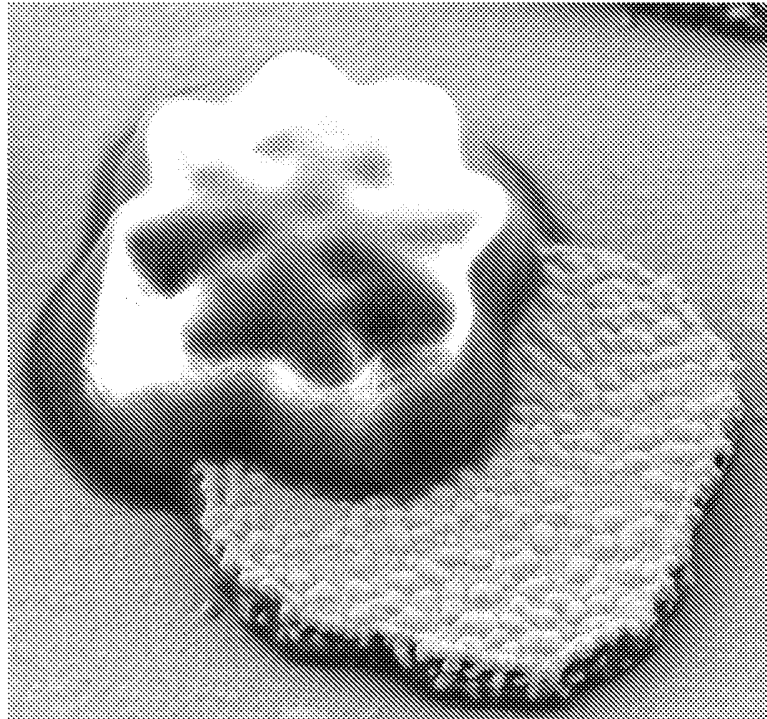


FIG. 9

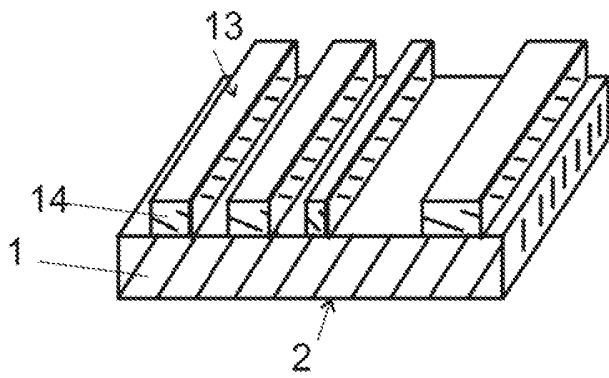


FIG. 10 A

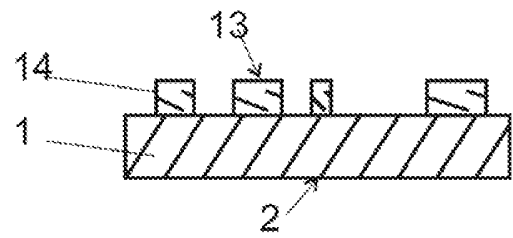


FIG. 10 B

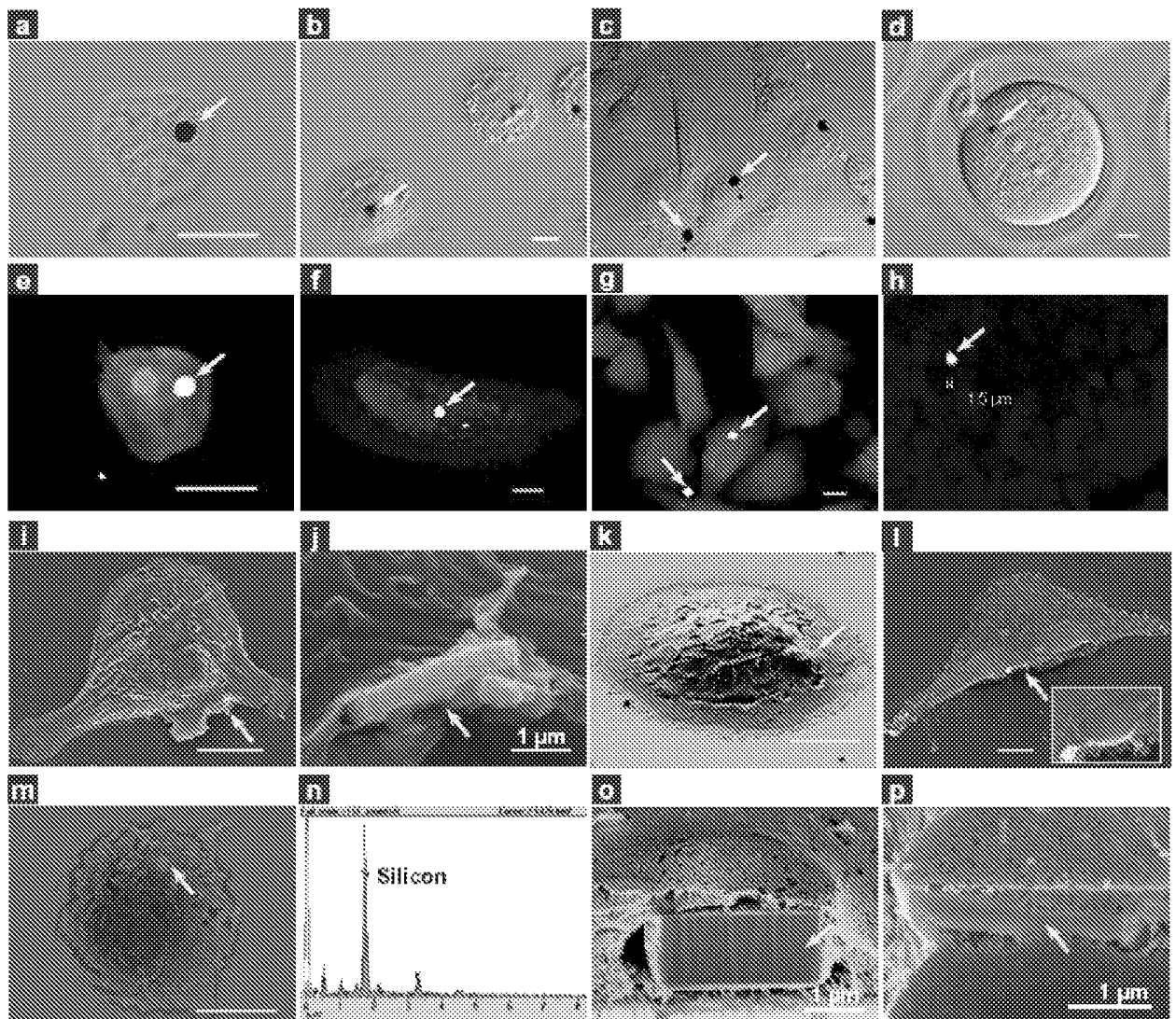


FIG. 11

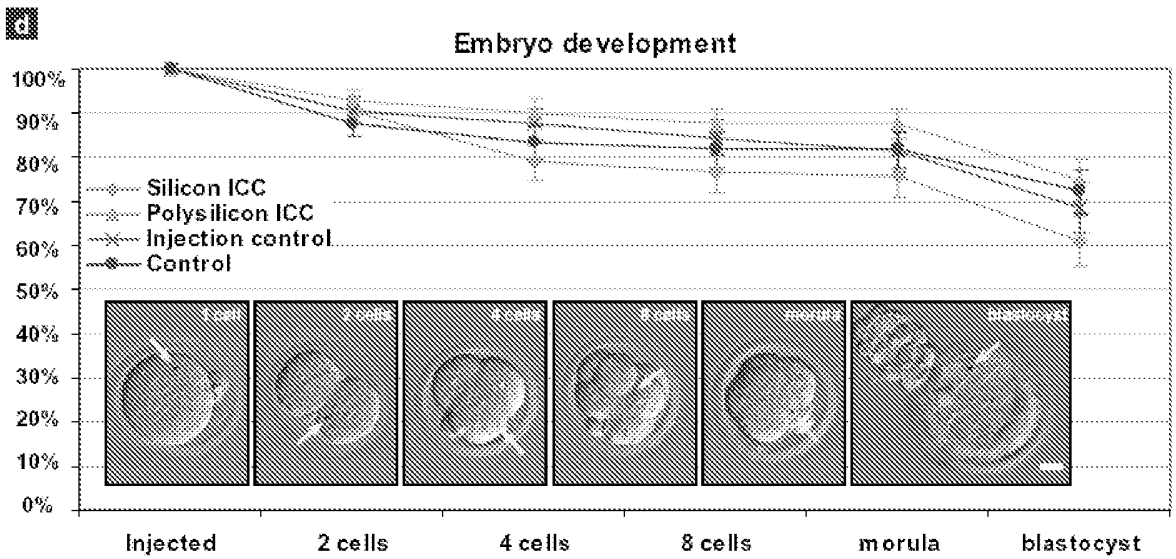
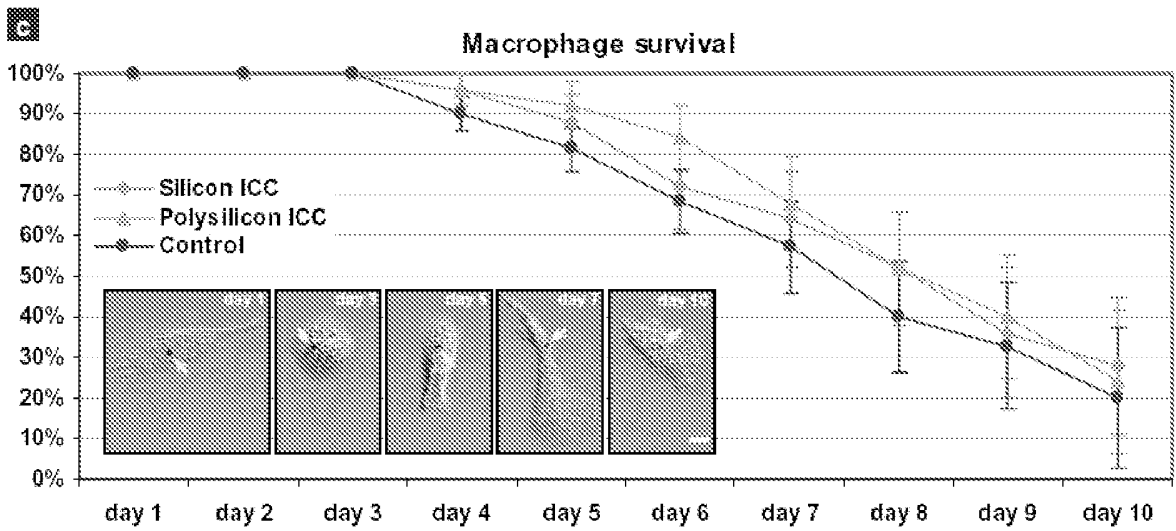
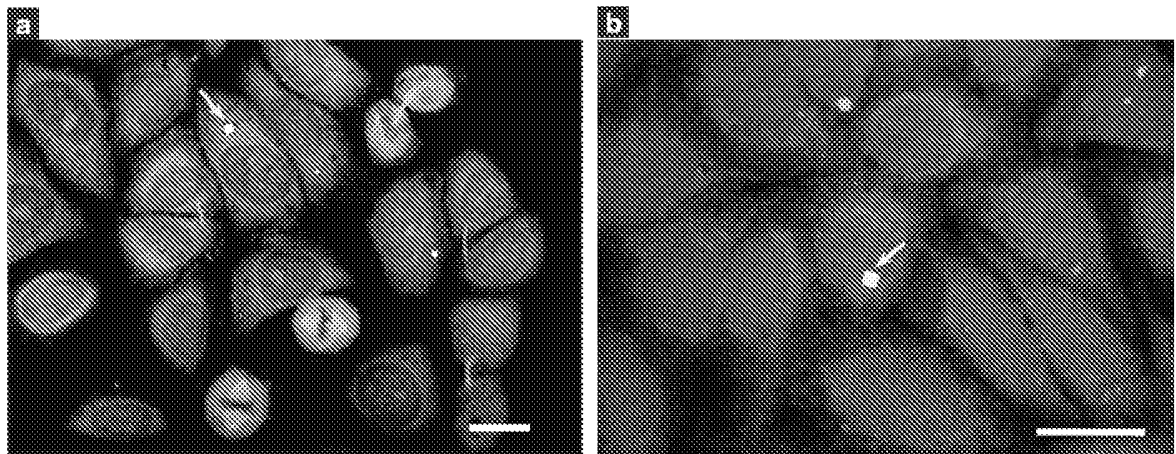


FIG. 12

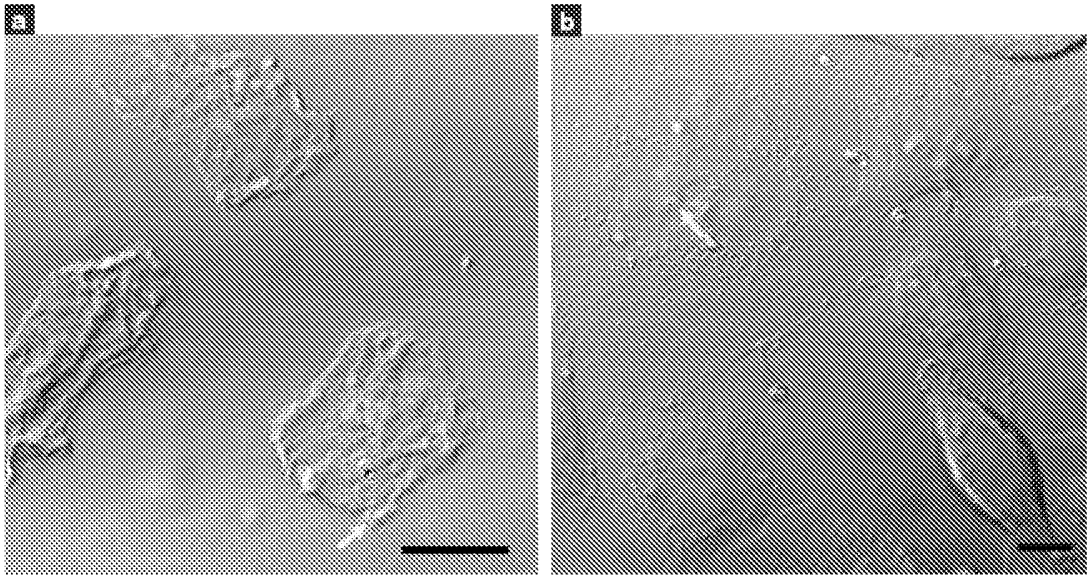


FIG. 13

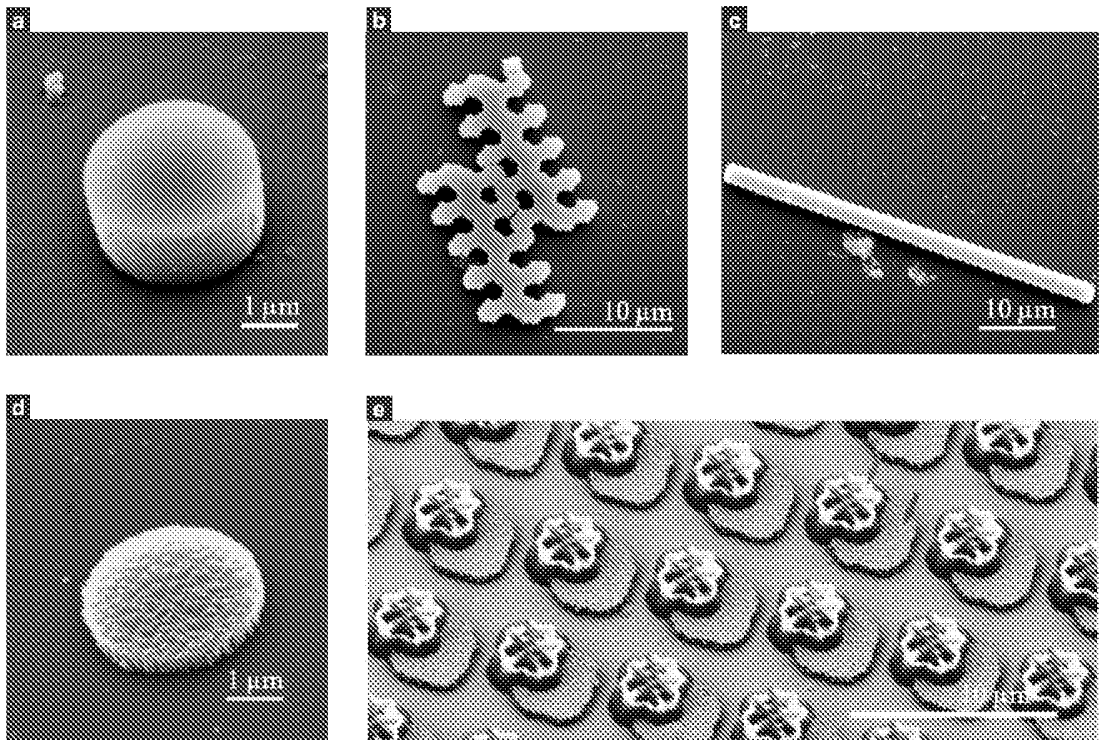


FIG. 14

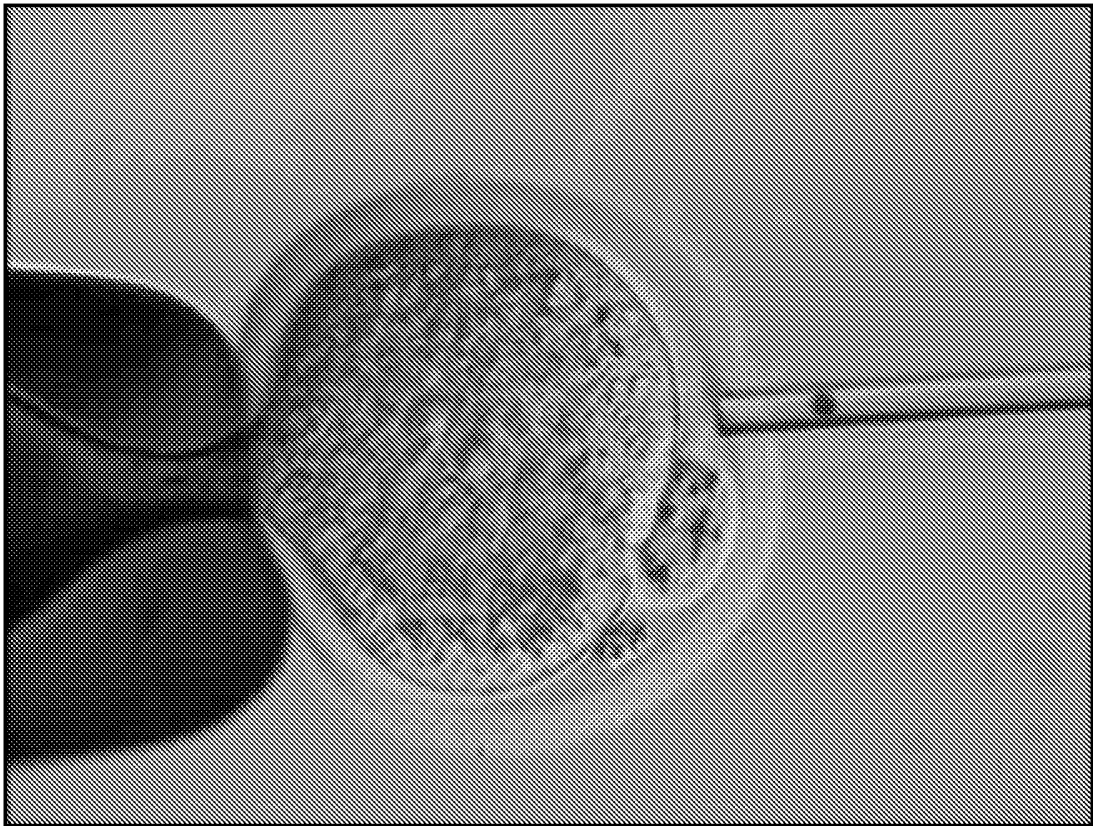


FIG. 15

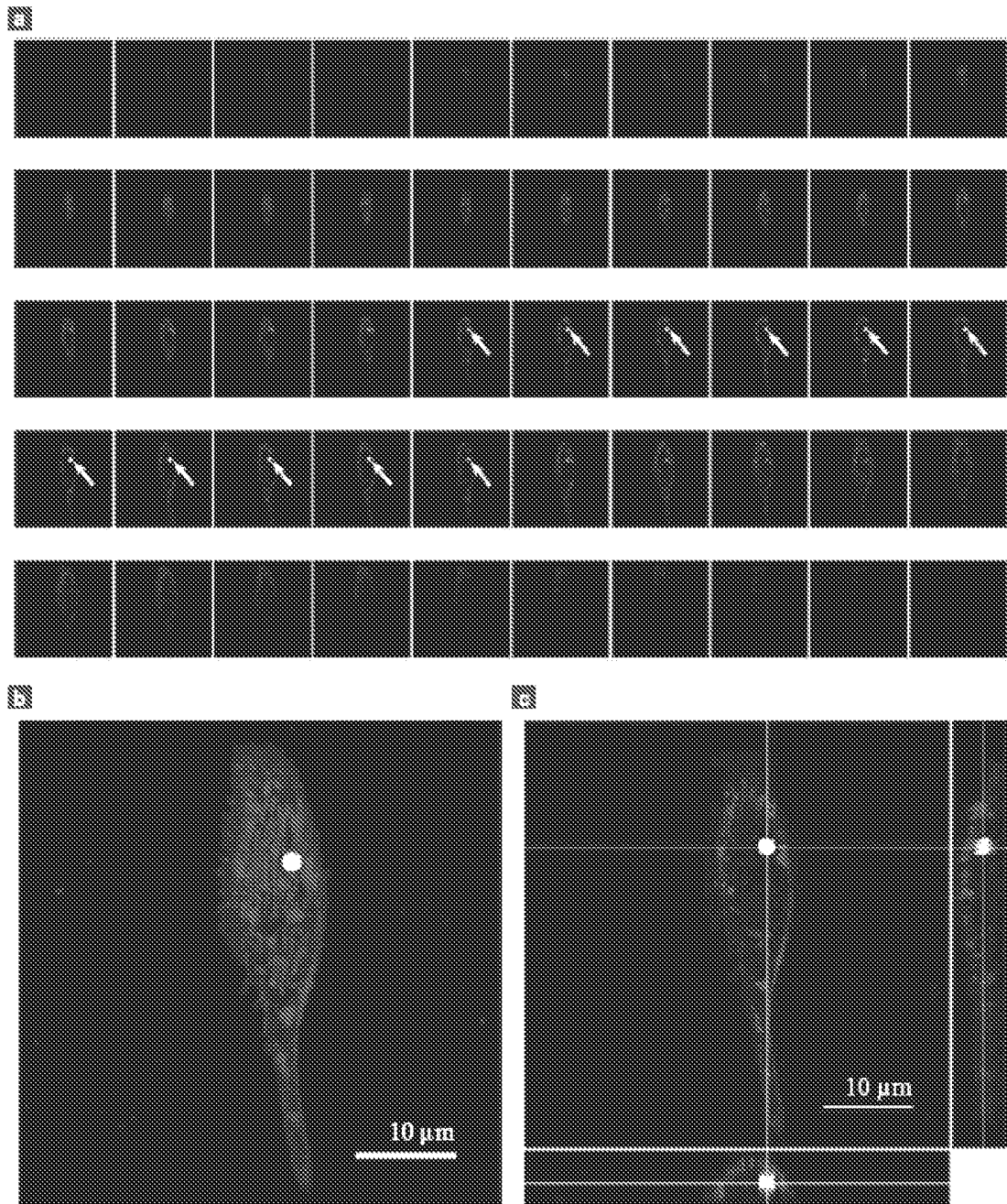


FIG. 16

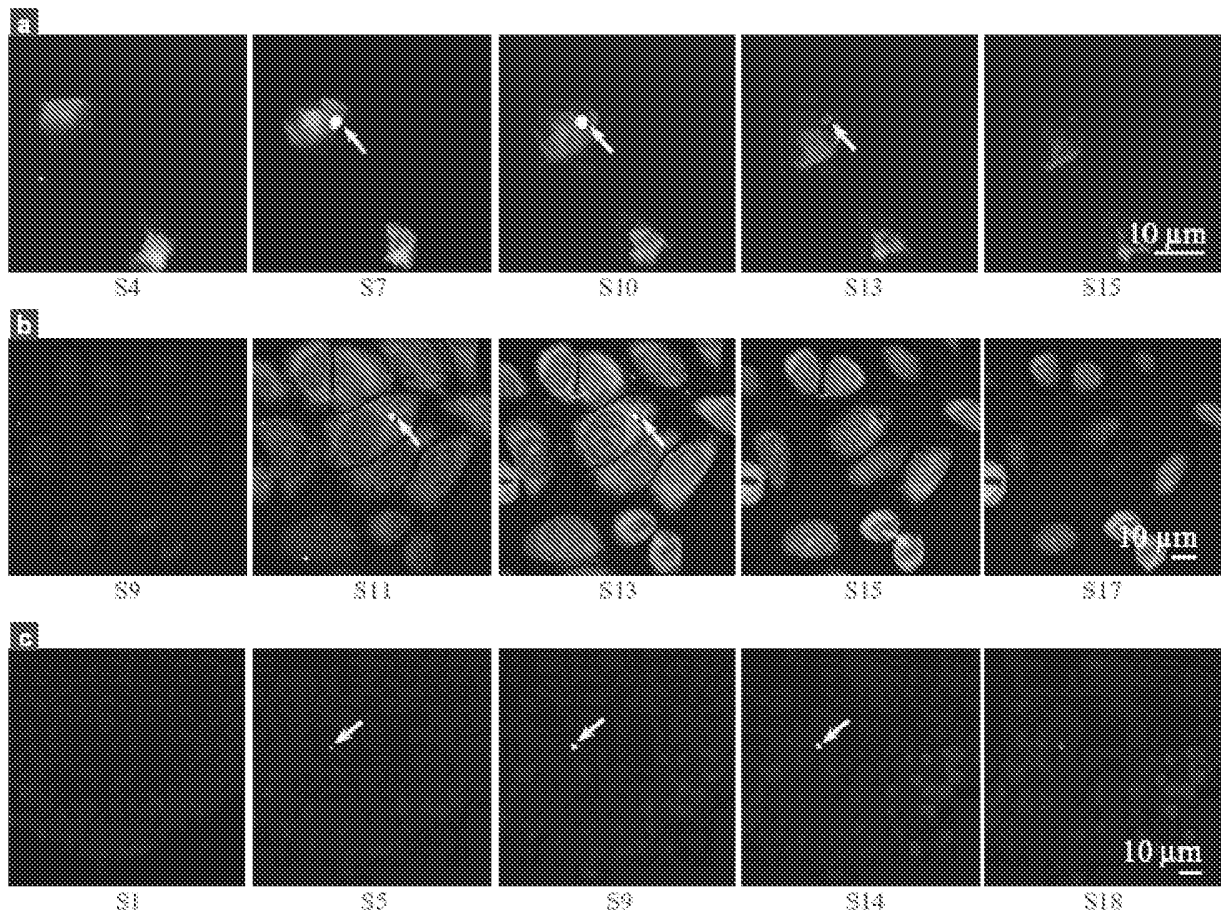


FIG. 17

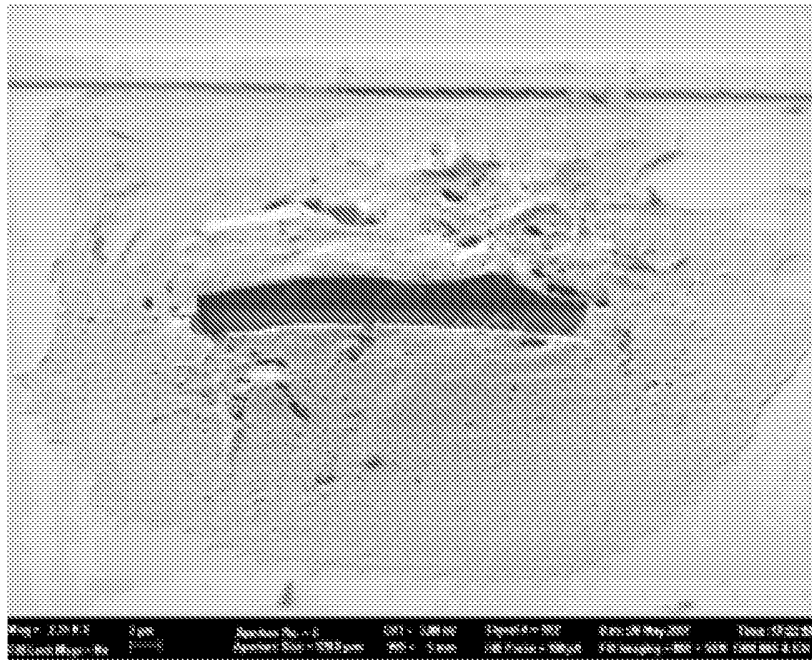


FIG. 18

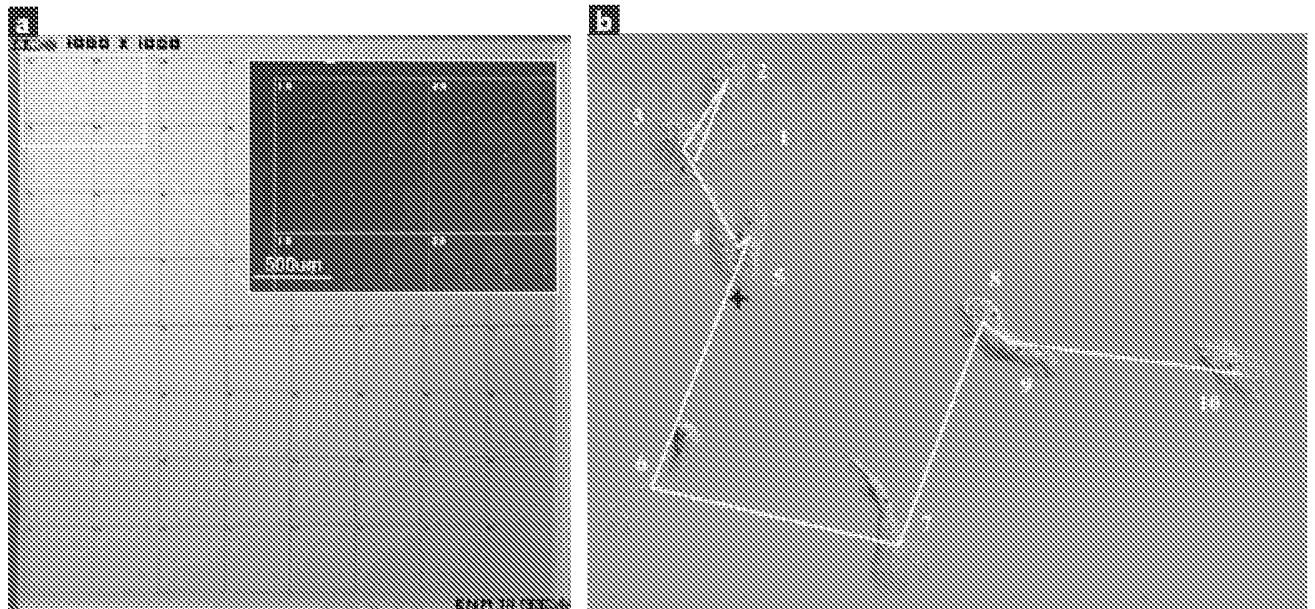


FIG. 19

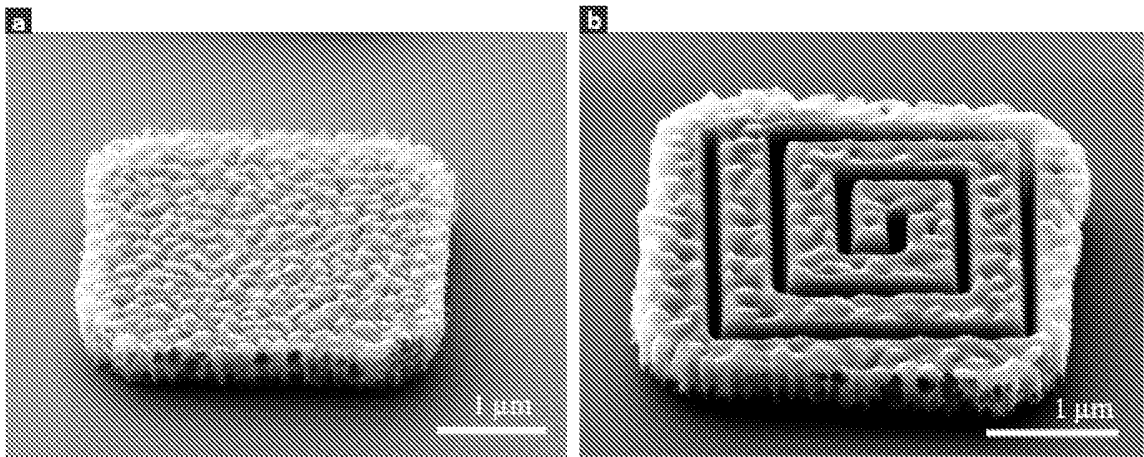


FIG. 20

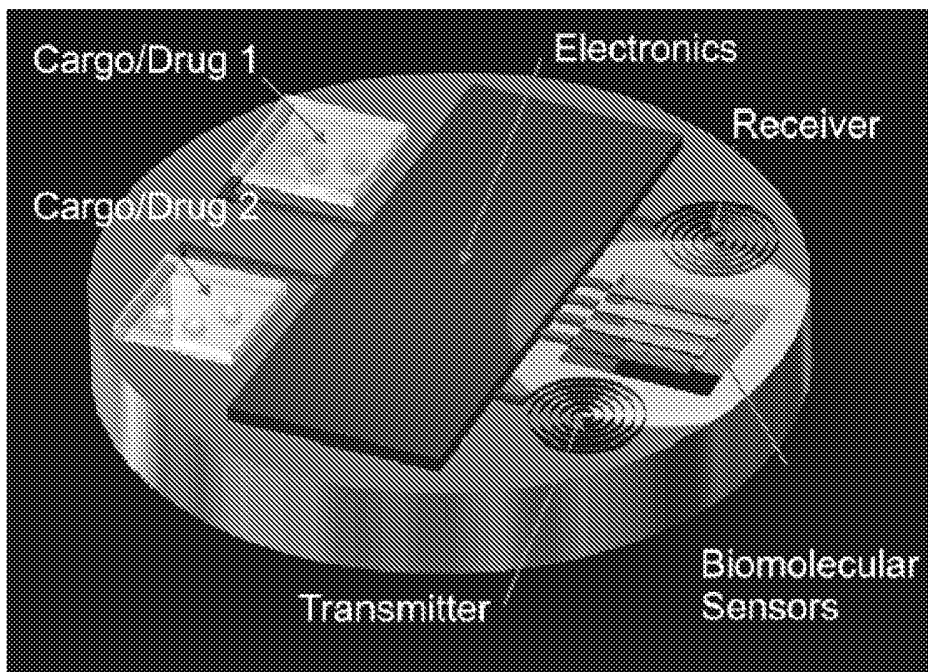


FIG. 21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 2008/070185

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N,C12Q, A61K

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

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

INVENES,EPODOC, WPI,XPESP,NPL,MEDLINE,HCAPLUS,ISI-WEB

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHI PING XU ET AL "Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery" CHEMICAL ENGINEERING SCIENCE. February 2006 Vol. 61, N°3, pages 1027-1040; paragraphs 2.1, 2.4, 3.4, 4.1 - 5.	1-5
X	GB 2433589 A (UNIV. NEWCASTLE) 27.06.2007, page 4, lines 21-37; page 17, lines 27-37; page 18, lines 4-37; page 30, lines 20-38.	1-5
X	JONGHOON CHOI ET AL. "Cytotoxicity of the photoluminiscent silicon nanocrystals" Nanoengineering: Fabrication, Properties, Optics and Devices IV. Proc. of SPIE. August 2007 Vol. 6645 66451Q-1; paragraphs 2.1 and 4.	1-5

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

02 February 2009 (02.02.2009)

Date of mailing of the international search report

(09/02/2009)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

V. Balmaseda Valencia

Telephone No. +34 91 349 30 48

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2008/070185

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	S.K. SAHOO ET AL "The present and future of nanotechnology in human health care" Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine 2007 Vol.3, pages 20-31	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2008/070185

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB 2433589 AB	27.06.2007	WO 2007125300 A	08.11.2007
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2008/070185

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/50 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ ES 2008/070185

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

G01N,C12Q, A61K

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

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

INVENES,EPODOC, WPI,XPESP,NPL,MEDLINE,HCAPLUS,ISI-WEB

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	ZHI PING XU ET AL "Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery" CHEMICAL ENGINEERING SCIENCE. Febrero 2006 Vol. 61, N°3, páginas 1027-1040; apartados 2.1, 2.4, 3.4, 4.1 - 5.	1-5
X	GB 2433589 A (UNIV. NEWCASTLE) 27.06.2007, página 4, líneas 21-37; página 17, líneas 27-37; página 18, líneas 4-37; página 30, líneas 20-38.	1-5
X	JONGHOON CHOI ET AL. "Cytotoxicity of the photoluminescent silicon nanocrystals" Nanoengineering: Fabrication, Properties, Optics and Devices IV. Proc. of SPIE. Agosto 2007 Vol. 6645 66451Q-1; apartados 2.1 y 4.	1-5

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

02 Febrero 2009 (02.02.2009)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

09 de Febrero de 2009 (09/02/2009)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
N° de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

V. Balmaseda Valencia

N° de teléfono +34 91 349 30 48

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2008/070185

C (continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	S.K. SAHOO ET AL "The present and future of nanotechnology in human health care" Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine 2007 Vol.3, páginas 20-31	1-5

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2008/070185

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
GB 2433589 AB	27.06.2007	WO 2007125300 A	08.11.2007
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>			

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N 33/50 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)