

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 504**

51 Int. Cl.:

G01N 21/25 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2009** **E 09784219 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2015** **EP 2291638**

54 Título: **Procedimiento y dispositivo de detección de la fluorescencia de un biochip**

30 Prioridad:

24.06.2008 FR 0803528

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

24.09.2015

73 Titular/es:

GENEWAVE (100.0%)
Génopole Industrie, 4 rue Pierre Fontaine
91000 Evry, FR

72 Inventor/es:

MARTINELLI, LUCIO;
MARCY, YANN y
BENISTY, HENRI

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 546 504 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

Procedimiento y dispositivo de detección de la fluorescencia de un biochip.

5 La invención se refiere a un procedimiento y a un dispositivo de detección de la fluorescencia de un biochip, y más precisamente de formación de imágenes y de detección de la fluorescencia emitida por cromóforos fijados en un sustrato del biochip.

10 Los biochips se utilizan ampliamente en la actualidad tanto para la investigación como en la industria. Comprenden esencialmente un sustrato sólido, en general plano, sobre el que se inmovilizan biomoléculas tales como cadenas de ADN o de ARN, proteínas, antígenos, anticuerpos, aptámeros, etc. o bien microorganismos enteros o fraccionados tales como bacterias, células, virus, esporas, etc., o incluso microobjetos que portan a su vez biomoléculas.

15 Los biochips de fluorescencia conocidos están constituidos por lo general por una hoja de vidrio cuya superficie se ha funcionalizado químicamente y porta, tras reaccionar con componentes de interés, "puntos" fluorescentes que, en respuesta a una excitación luminosa de una longitud de onda dada, emiten una luz a otra longitud de onda.

20 Esta luz emitida puede ser captada por un sistema óptico apropiado y ser transmitida a un sensor, por ejemplo a fotodetectores del tipo CCD o CMOS. La imagen obtenida de la superficie del biochip comprende unos puntos luminosos cuyas intensidades dependen de la cantidad de cromóforos presentes en estos puntos. Para un buen análisis de los "puntos", es necesario disponer de una imagen de estos puntos que presente suficiente fidelidad y resolución.

25 Los cromóforos dispuestos en la superficie de contacto entre un medio de índice superior y un medio de índice inferior (normalmente una superficie de contacto vidrio-aire o vidrio-líquido) emitirán preferentemente hacia el medio de índice superior a una razón igual (en una primera aproximación) al cubo de la razón de los índices de refracción de los dos medios, es decir, aproximadamente 4,1 en el caso del vidrio y el aire, lo cual significa que, cuando el sensor está colocado por encima del biochip, aproximadamente el 80% de la emisión luminosa de los cromóforos se pierde en la hoja de vidrio.

30 Además, los sistemas ópticos utilizados presentan una apertura digital limitada de modo que sólo una pequeña fracción de la luz emitida hacia el aire puede ser transmitida al sensor. La eficacia total de captación de la luz emitida por los cromóforos está por tanto limitada a ciertos porcentajes.

35 Para disminuir estos inconvenientes ya se ha propuesto captar la luz emitida por los cromóforos hacia el medio de índice superior. En este contexto, la forma de realización más simple consiste en utilizar el sensor en sí mismo como sustrato del biochip y, por tanto, en depositar sobre la superficie del sensor una red de sondas biológicas que se pondrá a continuación en contacto con las moléculas que se van a analizar.

40 El inconveniente de esta técnica es su coste, ya que cada análisis requiere el empleo de un nuevo sensor.

45 El documento US nº 6.479.301 B1 (véanse las figuras 1, 9-10A) da a conocer un dispositivo (un lector de microplacas) de formación de imágenes y de detección de la fluorescencia emitida por cromóforos fijados en un sustrato (microplaca 1A, 20) que comprende un sustrato (microplaca 1A) que es transparente a la emisión de los cromóforos en dirección descendente tras una excitación óptica de un haz de luz procedente de una fuente situada por encima del sustrato. Un filtro de eliminación de la longitud de onda de excitación de los cromóforos está constituido o bien por la puerta de transferencia de CCD, la placa frontal de fibras ópticas, una capa o red de aluminio 17, o bien por una capa dieléctrica 18 interpuesta entre la microplaca (1A, 20) y una cámara (10) CCD. La microplaca (1A, 20) se pone en contacto óptico con la cámara (10) CCD por medio de una placa frontal de fibras ópticas para la formación de una imagen de los cromóforos en la cámara (10) CCD de una manera que permite separar el sustrato del sensor tras la utilización.

50 La presente invención tiene esencialmente como objetivo aportar una solución sencilla, económica y eficaz para el conjunto de estos problemas.

55 La presente solicitud se refiere a un procedimiento de formación de imágenes y de detección de la fluorescencia emitida por cromóforos fijados en un sustrato de un biochip, consistiendo la detección en iluminar los cromóforos con una longitud de onda de excitación y en captar la luz emitida por los cromóforos en respuesta a esta iluminación. El procedimiento consiste en utilizar un sustrato por lo menos parcialmente transparente a la longitud de onda de emisión de los cromóforos y que porta unas sondas biológicas puestas en contacto con unas dianas biológicas estudiadas, en poner el sustrato en contacto óptico con un sensor, por ejemplo con matriz de fotodetectores del tipo CCD o CMOS o con emulsión fotosensible, interponiendo entre los cromóforos y el sensor un filtro de eliminación de la longitud de onda de excitación, siendo este filtro transparente a la longitud de onda de emisión, y garantizando eventualmente una continuidad de índice por lo menos parcial entre el sustrato y el sensor, y después en iluminar el sustrato a la longitud de onda de excitación de los cromóforos y en detectar por medio del sensor las señales luminosas emitidas por los cromóforos.

Tras la adquisición de estas señales luminosas, se puede volver a utilizar el sensor para otro análisis: basta con separar el sustrato del sensor y sustituirlo por otro sustrato.

- 5 La adquisición de las señales luminosas de los cromóforos se puede realizar "en seco" de manera tradicional, secándose el sustrato antes de ser colocado sobre el sensor.

También se pueden interponer un conjunto de fibras ópticas, que se presentan en forma de un bloque o de una torta plana, entre el sustrato y el sensor o entre el sustrato y el filtro.

- 10 El procedimiento según la invención prevé colocar y fijar en el sustrato un dispositivo fluídico que comprende unos canales y/o unas cámaras de introducción o de circulación de fluidos, y utilizar este dispositivo para poner unas dianas biológicas en contacto con las sondas fijadas en el sustrato.

- 15 En este caso, se puede colocar el conjunto formado por el dispositivo fluídico y por el sustrato sobre el sensor antes de que las dianas biológicas se pongan en contacto con las sondas del sustrato.

La adquisición de las imágenes por medio del sensor permite entonces seguir en tiempo real las interacciones entre las dianas y las sondas, por ejemplo mediante análisis de la forma y de la intensidad de los puntos.

- 20 La presente solicitud también se refiere a un dispositivo de formación de imágenes y de detección de la fluorescencia emitida por cromóforos fijados en un sustrato de un biochip, realizándose la formación de imágenes y la detección mediante la realización del procedimiento descrito anteriormente. El dispositivo comprende:

- 25 - un sustrato por lo menos parcialmente transparente a la longitud de onda de emisión de los cromóforos,
- un filtro de eliminación de la longitud de onda de excitación de los cromóforos,
- 30 - unos medios de detección y de adquisición de la luz emitida por los cromóforos en respuesta a su excitación luminosa, comprendiendo estos medios un sensor con matriz de fotodetectores del tipo CCD o CMOS, por ejemplo, o con emulsión fotosensible, y
- unos medios de puesta en contacto óptico del sustrato con el sensor, para la formación de una imagen de los cromóforos sobre el sensor y que permiten retirar el sustrato del sensor tras la utilización.

- 35 El sustrato comprende por ejemplo una placa delgada de vidrio o de zafiro, una película de un material de plástico tal como PDMS, Mylar, Zeonex, un filtro polarizador, un haz de fibras ópticas o un conjunto de tubos capilares que contienen las sondas.

- 40 Como variante, el sustrato puede estar formado por el filtro de eliminación de la longitud de onda de excitación.

Ventajosamente, este filtro comprende un filtro absorbente o un filtro reflectante o una combinación de filtros absorbente y reflectante, en particular tal como se describe en la solicitud anterior WO 200704575 del solicitante.

- 45 Pueden estar previstos unos medios para garantizar una continuidad de índice entre el sustrato y el sensor y comprenden una capa delgada de líquido o de gel de índice apropiado o de material flexible (por ejemplo de PDMS) que une el sustrato al sensor.

- 50 Según la invención, un dispositivo fluídico que comprende unos canales y/o unas cámaras de introducción o de circulación de fluidos está destinado a ser colocado sobre el sustrato para poner unas dianas biológicas en contacto con unas sondas fijadas en el sustrato. Este dispositivo puede estar realizado en vidrio mediante grabado o en polímero mediante moldeo, mediante termoconformación o mediante ensamblaje de películas de polímero que comprenden unos recortes correspondientes a los canales y/o a las cámaras mencionados anteriormente.

- 55 La invención se comprenderá mejor, y otras características, detalles y ventajas de la misma se pondrán de manifiesto más claramente, con la lectura de la siguiente descripción, realizada a modo de ejemplo en referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

- 60 - la figura 1 representa esquemáticamente un dispositivo de detección según la divulgación,
- las figuras 2, 3 y 4 representan esquemáticamente diferentes etapas de realización de este dispositivo;
- la figura 5 es una vista esquemática desde arriba del dispositivo de la figura 4;
- 65 - la figura 6 ilustra la utilización de este dispositivo colocado sobre un sensor;

- la figura 7 representa esquemáticamente la imagen obtenida por el sensor del dispositivo de la figura 6;
- la figura 8 es una vista esquemática ampliada del halo borroso que rodea cada punto de la imagen de la figura 7.

Se hace referencia en primer lugar a la figura 1, que representa esquemáticamente un dispositivo de detección, en el que la detección se realiza "en seco".

Este dispositivo comprende un sensor 10, por ejemplo del tipo matricial con fotodetectores CCD o CMOS o bien, como variante, un soporte de una emulsión fotosensible, sobre la que se ha depositado un sustrato 12 delgado que porta sobre su superficie superior una serie de sondas 14 biológicas por ejemplo dispuestas en red.

Estas sondas se han puesto en contacto con unas dianas biológicas de interés, de manera clásica, que se han fijado a las sondas correspondientes, poniéndose esta fijación de manifiesto mediante unos marcadores fluorescentes. Tras la fijación de las dianas a las sondas 14, se lava el sustrato 12, después se seca y a continuación se coloca sobre el sensor 10 situándose sobre este sensor de manera que se forma adecuadamente una imagen de toda la zona que se va a analizar y con interposición eventual de una capa de un material tal como un líquido o un gel o una película flexible, que garantiza una continuidad de índice por lo menos parcial entre el sustrato 12 y el sensor 10.

La iluminación del sustrato 12 mediante una fuente luminosa apropiada, tal como por ejemplo un generador láser o un diodo electroluminiscente 18 asociado a un filtro 20, que emite a una longitud de onda de excitación de los marcadores fluorescentes, y colocada por encima del sustrato 12, permite adquirir una imagen de la zona que comprende las sondas 14, imagen que se analiza para detectar y contar las dianas biológicas fijadas a las sondas 14.

Es necesario montar, entre los marcadores fluorescentes y el sensor 10, un filtro de eliminación de la luz de excitación de los marcadores fluorescentes, presentando este filtro una tasa de eliminación de la longitud de onda de excitación de por lo menos 10^{-5} y siendo transparente por lo menos a una parte del espectro de emisión de los marcadores fluorescentes.

Este filtro de eliminación puede constituir el sustrato 12 en sí mismo o ser interpuesto entre este sustrato y el sensor 10. Puede estar constituido por un filtro absorbente o por un filtro reflectante o por combinaciones de los mismos, tal como ya se ha descrito en la solicitud anterior WO 200704575 del solicitante. Se puede colocar por ejemplo un filtro reflectante sobre el sustrato 12 y un filtro absorbente sobre el sensor 10. Esta combinación permite beneficiarse de una amplificación de la luz de excitación de los marcadores fluorescentes, por un efecto de interferencia constructiva, y del mismo modo de una amplificación de la fluorescencia emitida por los marcadores. El filtro también puede ser depositado sobre un bloque o una torta plana 16 de fibras ópticas montada entre el sustrato y el sensor.

El sustrato es por lo menos parcialmente transparente a las longitudes de onda del espectro de emisión de los marcadores fluorescentes o de los cromóforos mencionados anteriormente. En la práctica, la relación de sus transmitancias de las longitudes de onda de emisión y de excitación de los marcadores o cromóforos es de por lo menos 10^5 .

Tras la adquisición de la imagen proporcionada por el sensor 10, el sustrato 12 se puede separar de este sensor y ser sustituido por otro sustrato 12 para una nueva adquisición de imagen.

El sustrato puede ser colocado sobre el sensor de la manera representada en el dibujo, estando en contacto con el sensor por su cara opuesta a la que porta los marcadores. Como variante, es la cara del sustrato la que porta los marcadores la que puede estar en contacto con el sensor.

En la variante de realización representada en las figuras 2 a 6, se asocia un dispositivo fluídico al sustrato para la puesta en contacto de las dianas biológicas con las sondas portadas por el sustrato.

Este dispositivo 22 fluídico comprende unos canales y/o unas cámaras de introducción y de circulación de fluidos, estando este dispositivo realizado en vidrio o en polímero, por ejemplo mediante moldeo, mediante termoconformación, o mediante ensamblaje de películas.

En particular puede ser colado en un molde un polímero reticulable o polimerizable, por ejemplo del tipo PDMS (polidimetilsiloxano) o un adhesivo óptico NOA, comprendiendo el fondo del molde una estructura en relieve que corresponde a los canales y/o a las cámaras que se desea obtener. A continuación se reticula o polimeriza el polímero por lo menos parcialmente de manera que el producto moldeado presente una resistencia suficiente para su manipulación. Como variante, el dispositivo 22 puede estar formado por un ensamblaje de películas poliméricas de las que algunas han sido recortadas, por ejemplo por láser, para realizar los canales y/o las cámaras deseados.

En otra variante, el dispositivo 22 se realiza mediante termoconformación de un material polimérico prensado sobre un molde caliente.

Tal como se representa en la figura 2, a continuación se coloca el dispositivo 22 sobre un sustrato 12 portado por un soporte 24, portando la cara superior del sustrato 12 un conjunto de sondas 14 tal como ya se ha descrito con referencia a la figura 1.

5 Cuando el polímero del dispositivo 22 sólo se ha reticulado o polimerizado parcialmente durante el moldeo de este dispositivo, se procede a una etapa de reticulación o de polimerización final de este dispositivo para fijarlo en el sustrato.

10 En el resto de casos, si la adherencia del polímero del dispositivo 22 al sustrato 12 no es suficiente, se aplica una capa de adhesivo óptico sobre el dispositivo 22 antes de su colocación sobre el sustrato 12 y se irradia con una radiación ultravioleta cuando se realiza la colocación del dispositivo sobre el sustrato. Como variante, también se puede utilizar un adhesivo sensible a la presión.

15 A continuación se separa el conjunto dispositivo 22-sustrato 12 del soporte 24 y se coloca este conjunto sobre un sensor 10 tal como se representa en la figura 4, garantizándose eventualmente la continuidad por lo menos parcial de índice entre el sustrato y el sensor mediante una gota 26 de líquido o de un gel de índice apropiado depositada sobre el sensor 10, pudiendo éste asociarse a un bloque o a una torta de fibras ópticas, tal como ya se ha descrito con referencia a la figura 1.

20 Cuando el sustrato 12 es de material flexible, por ejemplo de PDMS o cuando comprende una capa inferior de un material flexible de este tipo, basta con la aplicación de una presión para garantizar un contacto óptico entre el sustrato 12 y el sensor 10.

25 A continuación, es necesario alimentar el dispositivo 22 con fluido e iluminarlo mediante una fuente luminosa apropiada que emite a la longitud de onda de excitación de los marcadores fluorescentes y colocada por encima del dispositivo 22 tal como se representa esquemáticamente en la figura 6, para seguir en tiempo real las fijaciones de las dianas biológicas a las sondas del sustrato.

30 Asimismo, tal como se ha descrito con referencia a la figura 1, es necesario colocar un filtro de eliminación de la luz de excitación entre las sondas 14 y el sensor 10, pudiendo este filtro formar parte del sustrato o del sensor o ser añadido a estos últimos, tal como se ha mencionado anteriormente.

35 En el ejemplo de realización representado en el dibujo, el dispositivo 22 comprende un conducto de entrada de líquido 28 y un conducto de salida de líquido 30, que están formados en todo su grosor y que se comunican por sus extremos inferiores con por lo menos un canal 32 formado en hueco sobre la cara inferior del dispositivo 22 y que está configurado para pasar por todas las sondas 14 portadas por el sustrato 12 (figura 5), o con un conjunto de canales conectados entre sí y que pasan por las sondas 14 del sustrato 12. Es necesario alinear el o los canales 32 con las sondas 14, aunque no es necesaria ninguna alineación de estos canales sobre el sensor.

40 El sensor permite obtener una imagen del sustrato 12 tal como la 34 representada esquemáticamente en la figura 7, que comprende un determinado número de puntos luminosos 36 que corresponden a las sondas 14 a las que se han fijado unas moléculas diana asociadas a unos marcadores fluorescentes. La intensidad luminosa en cada punto 36 depende del número de moléculas diana que se han fijado a las sondas 14 en este punto.

45 Se constata que cada punto luminoso 36 presenta un halo borroso, lo cual hace necesaria la utilización de algoritmos apropiados de procesamiento de la imagen por filtración o por segmentación. La extensión E de este halo borroso alrededor de cada punto luminoso 36 se determina mediante el diagrama de radiación de los cromóforos o marcadores fluorescentes utilizados. La forma del halo también depende de la función de transferencia óptica del bloque o de la torta de fibras ópticas. Se puede utilizar un bloque o una torta de fibras que presente una dispersión despreciable, del orden de la distancia entre los píxeles del sensor.

50 En el caso de un cromóforo dispuesto en una superficie de contacto vidrio/aire, la emisión se concentra en un cono de aproximadamente 120° alrededor de la normal, con un pico principal a aproximadamente 40° de la normal. Si t es el grosor del sustrato 12 y α el ángulo de emisión, la extensión E del halo borroso es igual a $t \tan \alpha$.

55 En el caso en el que el sustrato 12 es una lámina de vidrio con un grosor de 0,17 mm con aire por encima, la extensión E del halo es igual a 0,15 mm.

60 Para limitar esta extensión y aumentar la eficacia de captación de la luz (es decir la cantidad de luz emitida en el sustrato), es deseable utilizar sustratos con un índice de refracción lo más elevado posible o un apilamiento de capas dieléctricas del tipo espejo de Bragg, en particular cuando las medidas se efectúan en fase líquida, ya que el índice de refracción del medio por encima del sustrato 12 es entonces igual a aproximadamente 1,3 en lugar de 1 para el aire.

65 El dispositivo según la invención también se puede utilizar cuando el fenómeno observado para la detección es la

luminiscencia. En este caso, las dianas se asocian a un sustrato enzimático que emite fotones cuando se añade una especie química reactiva.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de formación de imágenes y de detección de la fluorescencia emitida por unos cromóforos fijados en un sustrato, mediante iluminación de estos cromóforos a una longitud de onda de excitación y captación de la luz emitida por los cromóforos en respuesta a esta iluminación, siendo el sustrato (12) por lo menos parcialmente transparente a la longitud de onda de emisión de los cromóforos, y portando unas sondas biológicas (14) destinadas a ser puestas en contacto con unas dianas biológicas estudiadas, que comprende las etapas siguientes:
 - colocar o fijar en el sustrato (12) un dispositivo fluídico (22) que comprende unos canales y/o unas cámaras (28, 30, 32) de introducción o de circulación de fluidos,
 - poner el sustrato (12) que porta el dispositivo fluídico (22) en contacto con un sensor (10), por ejemplo con matriz de fotodetectores del tipo CCD o CMOS o con emulsión fotosensible, interponiendo entre los cromóforos y el sensor (10) un filtro de eliminación de la longitud de onda de excitación, siendo este filtro transparente a la longitud de onda de emisión,
 - utilizar el dispositivo fluídico (22) para poner unas dianas biológicas en contacto con las sondas (14) fijadas en el sustrato (12),
 - e iluminar después el sustrato a la longitud de onda de excitación de los cromóforos y detectar por medio del sensor las señales luminosas emitidas por los cromóforos.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que se garantiza una continuidad de índice por lo menos parcial entre el sustrato (12) y el sensor (10).
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que se transmite una imagen de las sondas (14) al sensor por medio de un bloque o de una torta (16) de fibras ópticas.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que, tras la adquisición de las señales luminosas emitidas por los cromóforos, el sensor (10) se separa del sustrato (12) y se puede volver a utilizar con otro sustrato.
5. Dispositivo de formación de imágenes y de detección de la fluorescencia emitida por unos cromóforos fijados en un sustrato, mediante la realización del procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, que comprende un sustrato (12) por lo menos parcialmente transparente a la longitud de onda de emisión de los cromóforos y medios de formación de imágenes, de detección y de adquisición de la luz emitida por los cromóforos en respuesta a su excitación luminosa, comprendiendo estos medios un sensor (10) del tipo con matriz de fotodetectores CCD o CMOS por ejemplo o con emulsión fotosensible, que comprende además:
 - un dispositivo fluídico (22) que comprende unos canales y/o unas cámaras (28, 30, 32) de introducción o de circulación de fluido, colocado o fijado en el sustrato (12) para poner unas dianas biológicas en contacto con las sondas (14) fijadas en el sustrato y colocado con el sustrato sobre el sensor (10),
 - un filtro de eliminación de la longitud de onda de excitación de los cromóforos, dispuesto entre los cromóforos y el sensor (10),
 - y unos medios de puesta en contacto óptico del sustrato (12) con el sensor (10), para la formación de una imagen de los cromóforos sobre el sensor y que permite separar el sustrato del sensor tras la utilización.
6. Dispositivo según la reivindicación 5, caracterizado por que el sustrato comprende una placa delgada de vidrio o de zafiro, una película de una material de plástico tal como PDMS, Mylar, Zeonex, un filtro polarizador, un conjunto de fibras ópticas o un conjunto de tubos capilares que contienen las sondas.
7. Dispositivo según la reivindicación 5, caracterizado por que el sustrato está formado por el filtro de eliminación de la longitud de onda de excitación.
8. Dispositivo según una de las reivindicaciones 5 a 7, caracterizado por que el filtro de eliminación comprende un filtro absorbente o un filtro reflectante o una combinación de filtros absorbente y reflectante.
9. Dispositivo según una de las reivindicaciones 5 a 8, caracterizado por que comprende unos medios que garantizan una continuidad de índice entre el sustrato y el sensor, que comprenden una capa delgada de líquido o de gel o de material flexible de índice apropiado que une el sustrato al sensor.
10. Dispositivo según una de las reivindicaciones 5 a 9, caracterizado por que el dispositivo fluídico (22) está realizado en vidrio mediante grabado o en polímero por moldeo, termoconformación o ensamblaje de películas de polímero que comprenden unos recortes correspondientes a los canales y/o a las cámaras mencionados anteriormente.

