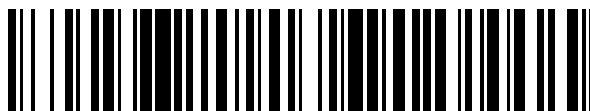


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 681**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/536** (2006.01)

**G01N 33/558** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.03.2014 PCT/EP2014/054117**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2014 WO2014135512**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2014 E 14709591 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016 EP 2965082**

54 Título: **Procedimiento y sistema para la determinación de la respuesta biológica de un objetivo frente a una sustancia candidata soluble**

30 Prioridad:

**05.03.2013 EP 13157877**

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

**19.06.2017**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
Grenzacherstrasse 124  
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**WERNER, MICHAEL;  
MARTIN, RAINER E. y  
HOCHSTRASSER, REMO**

74 Agente/Representante:

**SALVA FERRER, Joan**

ES 2 617 681 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 sistema para la determinación de la respuesta biológica de un objetivo frente a una sustancia candidata soluble

5

**[0001]** La presente invención se refiere a un procedimiento para la determinación de la respuesta biológica de un objetivo frente a una sustancia candidata soluble y a un sistema correspondiente según la respectiva reivindicación independiente.

10 **[0002]** El descubrimiento de un fármaco basado en un objetivo está formado en general por el diseño racional de fármacos, una síntesis química, los ensayos biológicos y el análisis de los datos, llevados a cabo de una forma iterativa hasta que parezca una estructura principal. Los ensayos biológicos con objeto de determinar la potencia, la selectividad y la eficacia de un fármaco candidato recién sintetizado como el objetivo de interés son una parte fundamental de este flujo de trabajo.

15

**[0003]** Un tipo específico de dicho ensayo biológico es un ensayo de dilución. En principio, el ensayo de dilución proporciona un soluto de una sustancia candidata a diferentes concentraciones y aspira a relacionar la respuesta biológica de un objetivo con las diferentes concentraciones del soluto de la sustancia candidata.

20 **[0004]** El documento WO 2011/042509 describe un procedimiento para la generación de una pluralidad de microgotitas con diferentes concentraciones de un soluto (soluto de una sustancia candidata) en un disolvente (líquido tamponante). Las microgotitas también contienen un objetivo a una concentración constante. Las microgotitas son generadas mediante la introducción de la sustancia candidata soluble en un flujo laminar del disolvente que fluye a través de un canal microfluidado para formar un soluto de una sustancia candidata en el  
25 disolvente. Inmediatamente después de la introducción en el disolvente, el soluto tiene un perfil de concentración inicial con forma de pulso. El flujo laminar del líquido tamponante provoca que el perfil de concentración inicial con forma de pulso del soluto cambie su perfil, debido a una dispersión de Taylor-Aris, a un perfil de concentración dispersado con forma gaussiana.

30 **[0005]** A este respecto, debe apreciarse que el término "perfil de concentración dispersado con forma gaussiana" según se usa en esta solicitud representa un perfil dispersado de concentraciones que en teoría tiene forma gaussiana, sin embargo, en la práctica la forma real del perfil de concentración dispersado puede desviarse ligeramente del perfil ideal de concentración dispersado con forma gaussiana, en particular en lo que respecta a la simetría exacta del perfil. Por lo tanto, siempre que dicho perfil con forma gaussiana se describa como un perfil  
35 simétrico y el perfil de concentración dispersado real se desvíe ligeramente de un perfil exacto con forma gaussiana, la forma del perfil de concentración dispersado real también puede desviarse de una forma exactamente simétrica.

**[0006]** Volviendo al procedimiento descrito en el documento WO 2011/042509, después de la introducción del objetivo en el disolvente que contiene el perfil de concentración dispersado con forma gaussiana del soluto, al flujo  
40 continuo de disolvente es segmentado en una pluralidad de microgotitas individuales. Estas microgotitas son generadas por la combinación del flujo continuo del disolvente que contiene el perfil de concentración dispersado con forma gaussiana del soluto y el objetivo a la concentración constante con una fase oleosa en un módulo centrado en un flujo hidrodinámico específico, de forma que se proporcionen diferentes concentraciones medidas del soluto en las microgotitas individuales. El tamaño de las etapas en la concentración del soluto está proporcionado por la  
45 diferencia entre la concentración media de las microgotitas adyacentes, que se basa en la velocidad de producción de las gotitas: si la velocidad de producción de las gotitas disminuye, el tamaño de las etapas en la concentración media aumenta.

**[0007]** Con el procedimiento descrito, de proporcionar el objetivo y el soluto en el disolvente en una serie de  
50 microgotitas, se asocian varios inconvenientes. Las microgotitas segmentan el perfil de concentración en concentraciones medias individuales (las concentraciones medias de las microgotitas individuales). Esto limita el número de concentraciones medias diferentes (el tamaño de las etapas de concentración) al número de microgotitas que segmentan el perfil de concentración, por lo que la "resolución" (tamaño de la etapa) en términos de diferentes concentraciones está limitada. Adicionalmente, el uso de aceite para generar las microgotitas excluye la utilización  
55 de sustancias candidatas o de objetivos lipófilos, debido a su tendencia a difundir en el aceite.

**[0008]** Por lo tanto, es un objeto de la invención proporcionar un procedimiento para la determinación de la respuesta biológica de un objetivo frente a un candidato soluble que supere o al menos reduzca en gran medida los inconvenientes conocidos a partir de la técnica anterior.

**[0009]** La presente invención sugiere un procedimiento para la determinación de la respuesta biológica de un objetivo a una sustancia candidata soluble, y comprende las siguientes etapas:

- 5 - la introducción de una sustancia candidata soluble en un flujo laminar de un líquido tamponante que fluye a través de un canal de dispersión para formar un soluto de una sustancia candidata en el líquido tamponante que tiene un perfil de concentración inicial;
- mediante el flujo laminar del líquido tamponante a través del canal de dispersión que dispersa el perfil de concentración inicial del soluto de una sustancia candidata en el líquido tamponante para formar un perfil de concentración dispersado del soluto de una sustancia candidata en el líquido tamponante;
- 10 - dirigir el flujo laminar del líquido tamponante que contiene el soluto de una sustancia candidata que tiene el perfil de concentración dispersado a un canal de detección para formar un perfil de concentración simétrico final del soluto de una sustancia candidata en el líquido tamponante en el canal de detección;
- la introducción de un objetivo en el canal de detección de tal forma que se obtenga un perfil de concentración combinado en el líquido tamponante, comprendiendo el perfil de concentración combinado un perfil de concentración del objetivo constante suprayacente al perfil de concentración simétrico final del soluto de una sustancia candidata;
- 15 - mantener en el canal de detección al menos una mitad del perfil de concentración combinado contenido en el líquido tamponante; y
- llevar a cabo un barrido óptico de al menos una mitad del perfil de concentración combinado contenido en el líquido tamponante mantenido en el canal de detección para detectar, a las diversas concentraciones del soluto de una sustancia candidata del perfil de concentración combinado, una señal óptica que sea representativa de la respuesta biológica del objetivo frente a la sustancia candidata soluble.

**[0010]** Consecuentemente, el procedimiento según la invención sugiere que se mantenga al menos una mitad del perfil de concentración combinado en forma de un perfil continuo estacionario en el canal de detección, de forma que, en principio, pueda elegirse un número de ubicaciones de detección ilimitadas a lo largo del perfil para el barrido óptico (limitado únicamente por la resolución del escáner óptico). La forma de un perfil continuo estacionario permite el barrido óptico del perfil de concentración combinado en un periodo de tiempo predeterminado en el que el perfil de concentración combinado es estable debido a procesos de difusión (moleculares) que son despreciables durante ese periodo de tiempo predeterminado. El perfil de concentración combinado del soluto candidato es proporcionado únicamente en el líquido tamponante (sin fase oleosa), de forma que en el ensayo también pueden usarse sustancias candidatas u objetivos lipófilos.

**[0011]** El procedimiento descrito es aplicable en principio a los ensayos de dilución conocidos, en los que normalmente se determina la potencia, la selectividad o la eficacia de una sustancia candidata soluble hacia un objetivo de interés. La "respuesta biológica del objetivo frente a la sustancia candidata soluble", en el significado de la presente invención como incluye cualquier respuesta biológica, bioquímica, farmacéutica, etc. adecuada para establecer una curva de dosis-respuesta mediante el uso de un ensayo de dilución. Las siguientes tablas ejemplares de ejemplos de ensayo se clasifican con respecto a las diferentes lecturas que son representativas de una respuesta biológica del objetivo frente a la sustancia candidata soluble.

Fluorescencia

Lectura	Ejemplo(s) de ensayo	Ejemplo(s) de respuesta biológica
Intensidad de la fluorescencia	Ensayos de inactivación de la fluorescencia	Actividad enzimática Actividad enzimática
	Ensayos fluorogénicos Ensayo de desplazamiento térmico	Interacción receptor-ligando
Fluorescencia resuelta en el tiempo (TRF)	LANCE™ (Perkin Elmer)	Actividad enzimática
Polarización de la fluorescencia	Ensayo de unión al ligando IMAP™ (Mol. Devices)	Interacción receptor-ligando Actividad enzimática
Transferencia de la energía de resonancia de fluorescencia (FRET)	Ensayos de proteasa	Actividad enzimática
Espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS)	Ensayo de unión al ligando	Interacción receptor-ligando

Luminiscencia

Lectura	Ejemplo(s) de ensayo	Ejemplo(s) de respuesta biológica
Quimioluminiscencia	Alpha-Screen™ (Perkin Elmer)	Actividad enzimática Interacción proteína-proteína
Bioluminiscencia	BRET™ (Perkin Elmer)	Interacciones proteína-proteína

Otras lecturas

5

Lectura	Ejemplo(s) de ensayo	Ejemplo(s) de respuesta biológica
Absorbancia	Ensayo cromogénico	Actividad enzimática
Espectroscopia de Raman	Ensayo de SERS	Actividad enzimática

**[0012]** A modo de ejemplo, un objetivo puede pertenecer al grupo que consiste en proteínas (proteínas solubles, proteínas de membrana), tales como enzimas (por ejemplo, cinasas, proteasas, peptidasas), proteínas de transporte (por ejemplo, canales iónicos, albúminas), receptores acoplados a proteínas G (por ejemplo, el receptor de la histamina, el receptor de la serotonina), factores de transcripción, etc.

**[0013]** Puede entenderse que una sustancia candidata soluble es una sustancia frente a la que puede responder un objetivo de interés. Por ejemplo, la sustancia candidata soluble puede ser un principio activo que es soluble *per se* en el líquido tamponante o, como alternativa, la sustancia candidata soluble puede ser un principio activo (por ejemplo, una sustancia farmacéuticamente activa) ya disuelto en un disolvente (por ejemplo, una solución que contiene el principio activo) y la solución que contiene el principio activo es soluble en el líquido tamponante. El término "soluble" se refiere a la capacidad de la sustancia candidata soluble definitiva para disolverse en el respectivo líquido tamponante usado para un ensayo específico. El término "líquido tamponante" se refiere a cualquier líquido conocido adecuado que normalmente es inerte con respecto a la respuesta biológica que se va a determinar. Debe entenderse que el término "objetivo" según se usa en esta solicitud comprende tanto sustancias individuales como "objetivos combinados" según se describe a continuación en el presente documento.

**[0014]** El líquido tamponante puede ser mantenido en el canal de detección mediante cualquier medida adecuada que dé como resultado la detención del flujo laminar del líquido tamponante, de forma que se interrumpan los efectos de dispersión en el canal de detección asociados con una dispersión de Taylor-Aris. Para el periodo de tiempo necesario para llevar a cabo el barrido óptico, otros procesos de difusión (moleculares) pueden ser despreciables, pero más bien puede contemplarse el perfil de concentración simétrico combinado contenido en el líquido tamponante mantenido de forma estacionaria en el canal de detección como estable.

**[0015]** Tanto el canal de dispersión como el canal de detección pueden ser canales microfluidos que tienen un diámetro interno menor de 2 mm, más preferentemente menor de 1 mm, lo más preferentemente menor de 100 µm. Ambos, el canal de dispersión y el canal de detección, necesitan permitir el paso de un flujo laminar del líquido tamponante a su través, lo que requiere un número de Reynolds apropiado. El flujo laminar del líquido tamponante provoca un cambio en el perfil de concentración inicial del soluto de una sustancia candidata debido a una dispersión de Taylor-Aris (véase la descripción anterior). La dispersión de Taylor-Aris provoca que el perfil de concentración del soluto de una sustancia candidata cambie a un perfil de concentración con forma gaussiana.

**[0016]** En un aspecto del procedimiento según la invención, la etapa de mantener en el canal de detección la al menos una mitad del perfil de concentración combinado contenido en el líquido tamponante se lleva a cabo mediante la detención de una introducción adicional de líquido tamponante en el canal de dispersión y de objetivo en el canal de detección. En un ejemplo práctico, el suministro adicional de líquido tamponante se detiene mediante la desconexión de una bomba de suministro de líquido tamponante, de forma que el flujo laminar del líquido tamponante se interrumpe. Dicha bomba puede estar controlada en el tiempo de forma que se desconecte automáticamente después de un periodo de tiempo predeterminado. Este periodo de tiempo comienza cuando el flujo laminar del líquido tamponante que contiene el perfil de concentración dispersado del soluto de una sustancia candidata entra en el canal de detección y termina cuando la al menos una mitad del perfil de concentración combinado está totalmente dentro del canal de detección. Se aplican unas consideraciones similares a la detención de la introducción del objetivo en el canal de detección, que puede llevarse a cabo desconectando una bomba de suministro del objetivo que introduce un flujo laminar del objetivo en el canal de detección.

50

**[0017]** Según un aspecto adicional del procedimiento según la invención, el flujo laminar del líquido tamponante que contiene el soluto de una sustancia candidata que tiene el perfil de concentración dispersado es dirigido al canal de detección con un caudal constante. También, el objetivo es introducido en el canal de detección con un caudal constante para obtener el perfil de concentración combinado que comprende el perfil de  
5 concentración del objetivo constante suprayacente al perfil de concentración simétrico final del soluto de una sustancia candidata en el líquido tamponante. Esta es una estrategia práctica que permite obtener en el canal de detección un exceso muy uniforme del perfil de concentración del objetivo constante a lo largo del perfil de concentración del soluto final de una sustancia candidata en el líquido tamponante. Desde un punto de vista práctico, la introducción del objetivo a un caudal constante ya comienza en un punto temporal antes de que el perfil  
10 de concentración dispersado final del soluto de una sustancia candidata en el líquido tamponante alcance el canal de detección, de forma que se establece un flujo laminar del objetivo en el momento en el que el perfil de concentración dispersado final del soluto candidato en el líquido tamponante alcanza el canal de detección. Este flujo laminar del objetivo suprayace entonces uniformemente al perfil de concentración dispersado final del soluto de una sustancia candidata para formar el perfil de concentración combinado en el canal de detección.

**[0018]** Según un aspecto adicional del procedimiento según la invención, la etapa de mantener en el canal de detección al menos una mitad del perfil de concentración combinado contenido en el líquido tamponante comprende mantener únicamente una mitad del perfil de concentración combinado en el canal de detección. Y aunque generalmente puede mantenerse y barrerse la totalidad del perfil de concentración combinado o más de una mitad  
20 del perfil de concentración combinado en el canal de detección, sólo es necesario mantener una mitad del perfil de concentración combinado en el canal de detección, dado que todas las concentraciones de interés están contenidas en una mitad del perfil de concentración combinado. Por lo tanto, puede reducirse la longitud del canal de detección, y también puede reducirse el tiempo de barrido del perfil de concentración combinado en el canal de detección (a una resolución dada), dado que únicamente debe barrerse ópticamente una mitad del perfil de concentración  
25 combinado, en lugar de la totalidad del perfil de concentración combinado. Esto puede tener una importancia particular en vista del muy elevado número de ensayos que se deben llevar a cabo durante la fase temprana del descubrimiento de fármacos, que deben ser automatizados lo máximo posible.

**[0019]** Según un aspecto adicional más del procedimiento según la invención, la única mitad del perfil de  
30 concentración combinado contiene al menos cinco (preferentemente entre cinco y seis) órdenes de magnitud de la concentración del soluto de una sustancia candidata en el líquido tamponante. Cinco órdenes de magnitud cubren, por ejemplo, un intervalo de entre 1 y 100.000 nM [nanoMolar], seis órdenes de magnitud, un intervalo de entre 1 y 1.000.000 nM concentraciones del soluto de una sustancia candidata en el líquido tamponante. Esto resulta ser suficiente para detectar (si la hay) cualquier respuesta biológica significativa en la única mitad del perfil de  
35 concentración simétrico combinado.

**[0020]** Según un aspecto adicional del procedimiento según la invención, la etapa de barrido óptico en el canal de detección de la al menos una mitad del perfil de concentración combinado contenido en el líquido tamponante se realiza mediante el desplazamiento del canal de detección con respecto a una unidad de detección  
40 óptica dispuesta de forma estacionaria. Generalmente, únicamente se necesita un movimiento relativo de la al menos una mitad del perfil de concentración combinado contenida en el líquido tamponante en el canal de detección y de la unidad de detección óptica con objeto de barrer la al menos una mitad del perfil de concentración combinado para obtener una señal representativa de la respuesta biológica del objetivo frente a la sustancia candidata soluble. Sin embargo, dado que los sistemas ópticos de alta resolución son normalmente muy sensibles a cualquier cambio,  
45 se prefiere disponer de forma estacionaria la unidad de detección óptica mientras se desplaza el canal de detección (por ejemplo, un chip que comprende el canal de detección) con respecto a la unidad de detección óptica.

**[0021]** Según un aspecto adicional del procedimiento según la invención, la etapa de barrido óptico en el canal de detección de la al menos una mitad del perfil de concentración combinado contenido en el líquido  
50 tamponante se lleva a cabo mediante el desplazamiento repetido del canal de detección a lo largo del mismo intervalo de posiciones relativas del canal de detección y de la unidad de detección óptica, y en el que las respectivas señales de las diversas respuestas biológicas son procesadas a continuación para formar una señal promedio o un cambio en la señal dependiente del tiempo representativo de la respuesta biológica del objetivo frente a la sustancia candidata soluble. La obtención de una pluralidad de señales individuales para cada concentración del  
55 perfil de concentración combinado y promediado de estas señales, estas señales dan como resultado una señal que es incluso más representativa de la respuesta biológica.

**[0022]** Según un aspecto adicional más del procedimiento según la invención, la etapa de barrido óptico en el canal de detección de la al menos una mitad del perfil de concentración combinado contenido en el líquido

tamponante se lleva a cabo con unas sensibilidades de detección diferentes mediante el ajuste de la sensibilidad de detección de la unidad de detección óptica a la señal óptica que es representativa de la respuesta biológica del objetivo frente al candidato soluble y/o frente a una señal óptica representativa de la concentración de la sustancia candidata soluble.

5

**[0023]** En principio puede emplearse cualquier dispositivo óptico de lectura como unidad de detección óptica para la lectura de la respectiva señal óptica característica. Por ejemplo, la unidad de detección óptica puede ser una cámara de CCD que normalmente es sensible a una intensidad de luz que se corresponde con 2-3 órdenes de magnitud de la concentración del soluto de una sustancia candidata, mientras que el intervalo de concentraciones que se va a barrer abarca normalmente 5-6 órdenes de magnitud de la concentración del soluto de una sustancia candidata. Por lo tanto, un cambio en la sensibilidad de detección es ventajoso para ser capaces de usar la misma cámara de CCD para el barrido del perfil de concentración combinado a lo largo de la totalidad del intervalo en el que puede esperarse una señal representativa de la respuesta biológica del objetivo.

10

**[0024]** Según un aspecto adicional más del procedimiento según la invención, el objetivo introducido en el canal de detección es un objetivo combinado que comprende al menos dos componentes que se introducen por separado en el canal de detección. Por ejemplo, en el caso de que la sustancia candidata sea una sustancia que va a ser ensayada para evaluar su potencial para inhibir la actividad de conversión de una enzima, el objetivo combinado no comprende únicamente la enzima, sino que también comprende el componente convertido por la enzima sin que esté presente el inhibidor. Consecuentemente, el objetivo combinado comprende dos componentes. Aquí, la respuesta biológica podría ser la actividad de un componente (la enzima convertora) del objetivo combinado para convertir el otro componente del objetivo combinado. Ambos componentes del objetivo combinado pueden ser introducidos por separado en el canal de detección, de forma que se genere el perfil de concentración combinado en el canal de detección. Esta realización puede usarse, por ejemplo, para la determinación de la mitad de la concentración inhibitoria máxima (CI<sub>50</sub>) para la medición de la potencia de la sustancia candidata en la inhibición de la actividad de conversión de la enzima.

15

20

25

**[0025]** Según un aspecto adicional del procedimiento según la invención, tanto la sustancia candidata soluble que forma el soluto de una sustancia candidata, como el objetivo, o ambos, comprenden un marcador fluorescente, siendo el marcador fluorescente capaz de emitir una señal fluorescente detectable ópticamente. En el caso de que el marcador fluorescente esté unido a la sustancia candidata (por ejemplo, en el caso de que no pueda detectarse fácilmente de otro modo el gradiente de concentración), la señal fluorescente detectable ópticamente emitida por el marcador fluorescente permite la detección en el canal de detección de la concentración real del soluto de una sustancia candidata con respecto a la al menos una mitad del perfil de concentración combinado en el líquido tamponante, de forma que sea posible la determinación en el canal de detección de la ubicación de las concentraciones individuales con respecto a la al menos una mitad del perfil de concentración combinado en el líquido tamponante. Por lo tanto, puede llevarse a cabo un calibrado (*ex situ* en otro experimento, o *in situ* en el mismo experimento). En el caso de que el objetivo comprenda un marcador fluorescente, después de la calibración, la intensidad de la señal emitida por el marcador fluorescente puede usarse como la señal óptica representativa de la respuesta biológica del objetivo frente al candidato soluble. Por ejemplo, en el caso de que el componente que va a ser convertido por la enzima comprenda la conversión del marcador fluorescente del componente por parte de la enzima, puede disminuir la luz fluorescente del sustrato. En el caso de que tanto el soluto de una sustancia candidata como el objetivo comprendan un marcador fluorescente, es evidente que la luz fluorescente del marcador del soluto de una sustancia candidata y la luz fluorescente del marcador del objetivo deben tener una longitud de onda diferente, de forma que sea posible distinguir entre la luz fluorescente emitida por el marcador del soluto de una sustancia candidata y la luz fluorescente emitida por el marcador del objetivo.

30

35

40

45

**[0026]** Otro aspecto de la presente invención se refiere a un sistema para la determinación de la respuesta biológica de un objetivo a una sustancia candidata soluble. El sistema comprende:

50

- un canal de dispersión, canal de dispersión que tiene

una primera entrada del canal de dispersión para la introducción de un líquido tamponante en el canal de dispersión, una segunda entrada del canal de dispersión dispuesta después de la primera entrada del canal de dispersión, para la introducción de una sustancia candidata soluble en el líquido tamponante que fluye a través del canal de dispersión, para formar un soluto de una sustancia candidata en el líquido tamponante, y una salida del canal de dispersión dispuesta después de la primera y la segunda entrada del canal de dispersión, para permitir que el líquido tamponante que contiene el soluto de una sustancia candidata salga del canal de dispersión,

55

- una bomba para la generación de un flujo laminar del líquido tamponante a través del canal de dispersión,
- un inyector de la sustancia candidata para la introducción de la sustancia candidata soluble en el flujo laminar del líquido tamponante a través del canal de dispersión para formar el soluto de una sustancia candidata en el líquido tamponante que tiene un perfil de concentración inicial que a continuación es dispersado por el flujo laminar del líquido tamponante a través del canal de dispersión, para formar un perfil de concentración dispersado del soluto de una sustancia candidata en el líquido tamponante,
- un canal de detección, canal de detección que tiene

10 una primera entrada del canal de detección que está dispuesta en comunicación fluida con la salida del canal de dispersión, de forma que el flujo laminar del líquido tamponante que sale del canal de dispersión a través de la salida del canal de dispersión y que contiene el perfil de concentración dispersado del soluto de una sustancia candidata, es dirigido a través de la primera entrada del canal de detección hacia el canal de detección para formar un perfil de concentración simétrico final del soluto de una sustancia candidata en el líquido tamponante

15 en el canal de detección, y al menos una entrada adicional del canal de detección para la introducción de un objetivo en el canal de detección,

- al menos un inyector del objetivo para la introducción de un objetivo en el canal de detección a través de la al menos una entrada adicional del canal de detección, de forma que se obtenga un perfil de concentración combinado que comprende un perfil de concentración del objetivo constante suprayacente al perfil de concentración simétrico final del soluto de una sustancia candidata en el líquido tamponante,
- medio para mantener en el canal de detección al menos una mitad del perfil de concentración combinado contenido en el líquido tamponante, y
- una unidad de detección óptica capaz de, y dispuesta para, barrer ópticamente la al menos una mitad del perfil de concentración combinado contenido en el líquido tamponante en el canal de detección para la detección, a las diversas concentraciones del soluto de una sustancia candidata del perfil de concentración combinado, de una señal óptica representativa de la respuesta biológica del objetivo frente a la sustancia candidata soluble,

en la que la salida del canal de dispersión y la primera entrada del canal de detección están conectadas entre sí de forma que se mantenga el flujo laminar en la conexión de estos canales y en el canal de detección.

35 **[0027]** Según un aspecto adicional del sistema según la invención, una pared interna del canal de dispersión en la salida del canal de dispersión, y una pared interna del canal de detección en la primera entrada del canal de detección, tienen la misma forma y tamaño para proporcionar un contorno de la pared interna del canal continuo en la conexión del canal de dispersión con el canal de detección.

40 **[0028]** Según un aspecto adicional más del sistema según la invención, la pared interna del canal de dispersión en la salida del canal de dispersión y la pared interna del canal de detección en la entrada del canal de detección están formadas íntegramente, de forma que se forme una pared interna continua común.

**[0029]** Algunos aspectos ventajosos adicionales de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción de la invención con referencia a los dibujos anexos, en los cuales:

45 Fig. 1 muestra una vista en sección de un canal de dispersión y de un canal de detección que están formados íntegramente mientras se lleva a cabo el procedimiento según la invención; y  
 Fig. 2 muestra una vista en perspectiva de una realización de un sistema según la invención en el que hay dispuesto un canal de detección en un chip que es desplazable con respecto a una unidad de detección óptica, y  
 Fig. 3 muestra una vista ampliada del detalle III de la Fig. 2.

50 **[0030]** La Fig. 1 muestra un canal de dispersión 11 y un canal de detección 12 que están formados íntegramente. El canal de dispersión 11 tiene una primera entrada del canal de dispersión 111, una segunda entrada del canal de dispersión 112 y una salida del canal de dispersión 113. La segunda entrada del canal de dispersión 112 está dispuesta después de la primera entrada del canal de dispersión 111, y la salida del canal de dispersión 113 está dispuesta después de la primera y de la segunda entrada del canal de dispersión 111, 112. El canal de  
 55 detección 12 tiene una entrada del canal de detección 121 que es idéntica a la salida del canal de dispersión 113, y dos entradas adicionales del canal de detección 122, 123.

**[0031]** Durante el uso se introduce un líquido tamponante 2 en el canal de dispersión 11 a través de la primera entrada del canal de dispersión 111 con la ayuda de una bomba 1 (véase la Fig. 2), y el perfil de velocidad

parabólica del flujo laminar del líquido tamponante 2 que fluye a través de canal de dispersión 11 está indicado por las flechas. Hay dispuesto un inyector de la sustancia candidata 7 en una segunda entrada del canal de dispersión 112 para la introducción de una sustancia candidata soluble en el flujo laminar del líquido tamponante 2 que fluye a través de canal de dispersión 11. En la realización mostrada, la sustancia candidata soluble es una sustancia

5 candidata soluble capaz de inhibir la actividad de una enzima conversora. Inmediatamente después de la introducción en el flujo laminar del líquido tamponante, la sustancia candidata soluble se disuelve en el líquido tamponante 2 para formar un soluto de una sustancia candidata 3 en el líquido tamponante 2, que tiene un perfil de concentración inicial indicado esquemáticamente por el perfil rectangular 31 representado por encima de la segunda entrada del canal de dispersión, aunque el perfil real de la concentración no es rectangular según se muestra.

10

**[0032]** Como ya se ha descrito anteriormente, el perfil de concentración inicial 31 es dispersado a continuación por una dispersión de Taylor-Aris causada por el flujo laminar del líquido tamponante 2 a través del canal de dispersión 11, de forma que el perfil de concentración inicial 31 cambia a un perfil de concentración dispersado indicado por la curva gaussiana 32 indicada por encima de la entrada 113 del canal de dispersión 11. El

15 líquido tamponante 2 que contiene el perfil de concentración dispersado 32 es dirigido a continuación al canal de detección 12 a través de la entrada 121 del canal de detección 12, que en la realización mostrada es idéntica a la salida 113 del canal de dispersión 11, dado que el canal de dispersión 11 y el canal de detección 12 están formados íntegramente, de forma que la pared interior 13 del canal de dispersión 11 en la salida del canal de dispersión 113 y la pared interior 14 del canal de detección 12 en la entrada del canal de detección 121 tienen el mismo tamaño y la

20 misma forma para proporcionar una pared interna continua del canal en la conexión del canal de dispersión 11 con el canal de detección 12. Esto permite la transferencia del líquido tamponante 2 fuera del canal de dispersión 11 y hacia el canal de detección 12 mientras se mantiene el flujo laminar, de forma que el perfil de concentración dispersado 32 es dispersado adicionalmente en el canal de detección 12 para formar un perfil de concentración simétrico final representado por la curva gaussiana 33 indicada por encima del canal de detección 12.

25

**[0033]** El canal de detección 12 comprende dos entradas adicionales del canal de detección 122, 123 que están dispuestas en la conexión del canal de dispersión 11 con el canal de detección 12. Dos componentes objetivo 41, 42 son introducidos por separado a través de las dos entradas adicionales del canal de detección 122, 123 con la ayuda de los inyectores de objetivo adicionales 8, 9 (véase la Fig. 2). En la práctica, el flujo del líquido tamponante

30 2, así como el flujo del objetivo combinado que comprende los dos componentes objetivo 41, 42 (por ejemplo, dos soluciones de objetivo líquidas individuales), son suministrados de forma continua antes de que se introduzca la sustancia candidata soluble en el canal de dispersión 11. Esto proporciona una concentración constante del objetivo combinado que comprende los dos componentes 41, 42 en el canal de detección 12. Este perfil constante del objetivo combinado superyace al perfil de concentración simétrico final 33 del soluto de una sustancia candidata 3 en

35 el canal de detección 12 para formar un perfil de concentración combinado que comprende el perfil de concentración del objetivo constante suprayacente al perfil de concentración simétrico final 33 del soluto de una sustancia candidata.

**[0034]**

Como ya se ha analizado adicionalmente anteriormente, la introducción de un objetivo combinado que

40 comprende dos componentes 41, 42 permite llevar a cabo ensayos biológicos específicos con objetivos combinados. Dicho objetivo combinado puede comprender, por ejemplo, una enzima 41 y un componente 42 que va a ser convertido por la enzima. La actividad enzimática, como respuesta biológica, puede ser determinada mediante la detección de la velocidad de conversión del componente 42. Si la sustancia candidata es un inhibidor enzimático que

45 inhibe la actividad de conversión de la enzima 41, la respuesta biológica debería ser una disminución en la actividad de la enzima.

**[0035]**

Una vez que al menos una mitad del perfil de concentración combinado que comprende el perfil de concentración del objetivo constante suprayacente al perfil de concentración simétrico final 33 del soluto de una sustancia candidata 3 ha entrado en el canal de detección 12, se mantiene en el canal de detección. Como ya se ha

50 explicado anteriormente, una mitad del perfil de concentración combinado es suficiente debido a la simetría del perfil de concentración combinado. Por supuesto, es posible mantener la totalidad del perfil de concentración combinado en el canal de detección 12. El mantenimiento del líquido tamponante 2 que contiene la al menos una mitad del perfil de concentración combinado en el canal de detección se consigue mediante la detención del suministro adicional del líquido tamponante 12 y también de los componentes objetivo 41, 42 en el canal de detección 12. Mediante la

55 detención del flujo laminar se interrumpe la dispersión de Taylor-Aris, mientras que otros procesos de difusión (moleculares) pueden ser despreciados en el periodo de tiempo necesario para llevar a cabo la etapa de barrido óptico de la al menos una mitad del perfil de concentración combinado mantenida en el canal de detección. La respuesta biológica puede ser detectada en el presente ejemplo mediante la detección óptica de una señal fluorescente emitida por un marcador fluorescente comprendido por el componente 42. La conversión del



componente 42 por parte de la enzima da como resultado una disminución en la intensidad de la señal fluorescente detectada (puede detectarse un aumento en los ensayos basados en efectos de inactivación). Esta disminución en la señal fluorescente detectada es la consecuencia de la actividad de la enzima. Consecuentemente, si la sustancia candidata es un inhibidor de la enzima que inhibe la conversión por parte de la enzima del componente 42, la señal fluorescente detectada procedente del componente 42 no disminuiría en absoluto o sólo disminuiría en un menor grado. Consecuentemente, en este ejemplo, la señal detectada ópticamente representativa de la respuesta biológica es el cambio en la intensidad de la luz fluorescente emitida por el marcador fluorescente comprendido por el componente 42.

10 **[0036]** Esta disminución reducida en la intensidad puede ser determinada a lo largo de la al menos una mitad del perfil de concentración combinado mantenida en el canal de detección 12. Dado que la al menos una mitad del perfil de concentración combinado comprende "diluciones" continuas a lo largo de la al menos una mitad del perfil de concentración combinado (diferentes concentraciones del soluto de una sustancia candidata 3 en el líquido tamponante que abarcan idealmente la totalidad del intervalo de concentraciones entre cero y la concentración inicial, sin embargo, al menos aproximadamente entre cinco y seis órdenes de magnitud), el ensayo de dilución permite la determinación de la respuesta biológica lo largo de la totalidad del intervalo prácticamente a todas las concentraciones del soluto de una sustancia candidata 3 contenida en el perfil de concentración combinado.

15 **[0037]** La luz fluorescente puede ser detectada a lo largo del canal mediante una cámara de CCD 6 (véase la Fig. 2) como unidad de detección óptica. La cámara de CCD detecta la intensidad de la luz fluorescente en diferentes ubicaciones de detección del canal de detección 12 con respecto a la cámara de CCD 6.

20 **[0038]** En la Fig. 2 se muestra una realización del sistema según la invención. El sistema puede usarse, por ejemplo, para llevar a cabo el procedimiento descrito anteriormente con respecto a la Fig. 1. En esta realización del sistema según la invención, una porción del canal de dispersión 11 y del canal de detección 12 están dispuestas sobre un chip 5. El chip 5 está dispuesto de forma movable para permitir la modificación de la posición de las diversas porciones del canal de detección 12 con respecto a la cámara de CCD 6 como unidad de detección óptica. Únicamente una porción del canal de dispersión 11 está dispuesta en el chip 5, mientras que el canal de dispersión 11 también comprende un capilar 114 para prolongar la longitud del canal de dispersión, para proporcionar una dispersión suficiente del perfil de concentración inicial 31 debido a la dispersión de Taylor-Aris. La bomba 1 está dispuesta en la entrada del canal de dispersión 111 para bombear el líquido tamponante en el canal de dispersión 11 y para provocar un flujo laminar a su través. La segunda entrada del canal de dispersión 112 está dispuesta después de la primera entrada del canal de dispersión 111, en la que es introducida la sustancia candidata soluble en el líquido tamponante con la ayuda del inyector de la sustancia candidata 7. Con la ayuda de la bomba 1, se genera un flujo laminar tanto a través del capilar 114 como de la porción sobre el chip del canal de dispersión 11, como se ha explicado anteriormente, dispersando el perfil de inicial del soluto de una sustancia candidata representado por la curva rectangular 31 mediante una dispersión de Taylor-Aris en el perfil dispersado representado por la curva gaussiana 32 (véase la Fig. 1). La entrada del canal de dispersión 113, así como las dos entradas adicionales del canal de detección 122, 123, están dispuestas sobre el chip 5. Las dos entradas adicionales del canal de detección 122, 123 se unen con la primera entrada del canal de detección 121, que es idéntica a la salida del canal de dispersión 113 (véase la Fig. 3). El canal de detección 12 comprende una porción con forma de meandro 124 dispuesta sobre el chip 5. Hay dispuesta una salida del canal de detección 125 al final del canal de detección 12 para el drenaje del líquido tamponante desde el canal de detección 12.

30 **[0039]** Las realizaciones de la invención se han descrito con ayuda de los dibujos. Sin embargo, son posibles diversas modificaciones y cambios en las realizaciones descritas sin desviarse de las enseñanzas generales subyacentes en la presente invención. Por lo tanto, no debe entenderse que la invención se limita a las realizaciones descritas, sino más bien, que el ámbito de protección está definido por las reivindicaciones anexas.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la determinación de la respuesta biológica de un objetivo (41; 41, 42) frente a una sustancia candidata soluble, procedimiento que comprende las siguientes etapas:
- 5
- la introducción de una sustancia candidata soluble en un flujo laminar de un líquido tamponante (2) que fluye a través de un canal de dispersión (11) para formar un soluto de una sustancia candidata (3) en el líquido tamponante (2) que tiene un perfil de concentración inicial (31);
  - mediante el flujo laminar del líquido tamponante (2) a través del canal de dispersión (11) que dispersa el perfil de concentración inicial (31) del soluto de una sustancia candidata (3) en el líquido tamponante (2) para formar un perfil de concentración dispersado (32) del soluto de una sustancia candidata (3) en el líquido tamponante (2);
  - dirigir el flujo laminar del líquido tamponante (2) que contiene el soluto de una sustancia candidata (3) que tiene el perfil de concentración dispersado (32) a un canal de detección (12) para formar un perfil de concentración simétrico final (33) del soluto de una sustancia candidata (3) en el líquido tamponante (2) en el canal de detección (12);
  - la introducción de un objetivo en el canal de detección (12) (41; 41, 42) de tal forma que se obtenga un perfil de concentración combinado en el líquido tamponante (2), perfil de concentración combinado que comprende un perfil de concentración del objetivo constante suprayacente al perfil de concentración simétrico final (33) del soluto de una sustancia candidata (3) ;
  - mantener en el canal de detección (12) al menos una mitad del perfil de concentración combinado contenido en el líquido tamponante; y
  - llevar a cabo un barrido óptico de la al menos una mitad del perfil de concentración combinado contenido en el líquido tamponante mantenido en el canal de detección (12) para detectar, a las diversas concentraciones del soluto de una sustancia candidata (3) del perfil de concentración combinado, una señal óptica que sea representativa de la respuesta biológica del objetivo (41; 41, 42) frente a la sustancia candidata soluble.
- 20
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa de mantener en el canal de detección (12) la al menos una mitad del perfil de concentración combinado contenido en el líquido tamponante (2) se lleva a cabo mediante la detención de una introducción adicional de líquido tamponante (2) en el canal de dispersión (11) y de objetivo en el canal de detección.
- 30
3. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el flujo laminar del líquido tamponante (2) que contiene el soluto de una sustancia candidata (3) que tiene el perfil de concentración dispersado (32) es dirigido al canal de detección (12) a un caudal constante, y en el que el objetivo (41; 41, 42) es introducido en el canal de detección (12) a un caudal constante para obtener un perfil de concentración combinado que comprende el perfil de concentración objetivo constante (41; 41, 42) suprayacente al perfil de concentración simétrico final del soluto de una sustancia candidata (3) en el líquido tamponante (2).
- 35
4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de mantener en el canal de detección (12) al menos una mitad del perfil de concentración combinado contenido en el líquido tamponante (2) comprende mantener únicamente una mitad del perfil de concentración combinado (33) en el canal de detección (12).
- 40
5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que la única mitad del perfil de concentración combinado (33) contiene al menos cinco órdenes de magnitud de la concentración del soluto de una sustancia candidata (3) en el líquido tamponante (2).
- 45
6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de barrido óptico en el canal de detección (12) de la al menos una mitad del perfil de concentración combinado contenido en el líquido tamponante (2) se lleva a cabo mediante el desplazamiento del canal de detección (12) con respecto a la unidad de detección óptica (6) dispuesta de forma estacionaria.
- 50
7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que la etapa de barrido óptico en el canal de detección (12) de la al menos una mitad del perfil de concentración combinado contenido en el líquido tamponante (2) se lleva a cabo mediante el desplazamiento repetido del canal de detección (12) a lo largo del mismo intervalo de posiciones relativas del canal de detección (12) y de la unidad de detección óptica (6), y en el que las respectivas señales representativas de las diversas respuestas biológicas son procesadas a continuación para formar una señal promedio o un cambio en la señal dependiente del tiempo representativo de la respuesta biológica del objetivo frente a la sustancia candidata soluble.
- 55

8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, en el que la etapa de barrido óptico en el canal de detección de la al menos una mitad del perfil de concentración combinado contenido en el líquido tamponante se lleva a cabo con diferentes sensibilidades de detección mediante el ajuste de la sensibilidad de detección de la unidad de detección óptica (6) a la señal óptica que es representativa de la respuesta biológica del objetivo (41; 41, 42) frente a la sustancia candidata soluble y/o a una señal óptica representativa de la concentración de la sustancia candidata soluble.
9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el objetivo introducido en el canal de detección (12) es un objetivo combinado que comprende al menos dos componentes (41, 42) que son introducidos por separado en el canal de detección (12).
10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que tanto la sustancia candidata soluble que forma el soluto de una sustancia candidata (3) como el objetivo (41; 41, 42), o ambos, comprenden un marcador fluorescente, marcador fluorescente que es capaz de emitir una señal fluorescente detectable ópticamente.
11. Sistema para la determinación de la respuesta biológica de un objetivo (41; 41,42) frente a una sustancia candidata soluble, sistema que comprende
- 20 - un canal de dispersión (11), canal de dispersión (11) que tiene
- una primera entrada del canal de dispersión (111) para la introducción de un líquido tamponante (2) en el canal de dispersión (11), una segunda entrada del canal de dispersión (112) dispuesta después de la primera entrada del canal de dispersión (111), para la introducción de una sustancia candidata soluble en el líquido tamponante (2) que fluye a través del canal de dispersión (11) para formar un soluto de una sustancia candidata (3) en el líquido tamponante (2), y
- una salida del canal de dispersión (113) después de la primera y de la segunda entrada del canal de dispersión (111, 112), para permitir que el líquido tamponante (2) que contiene el soluto de una sustancia candidata (3) salga del canal de dispersión (11),
- una bomba (1) para la generación de un flujo laminar del líquido tamponante a través del canal de dispersión (11),
- un inyector de la sustancia candidata (7) para la introducción de la sustancia candidata soluble en el flujo laminar del líquido tamponante a través del canal de dispersión (11) para formar el soluto de una sustancia candidata (3) en el líquido tamponante (2) que tiene un perfil de concentración inicial que a continuación es dispersado por el flujo laminar del líquido tamponante (2) a través del canal de dispersión (11) para formar un perfil de concentración dispersado del soluto de una sustancia candidata (3) en el líquido tamponante (2),
- un canal de detección (12), canal de detección (12) que tiene
- una primera entrada del canal de detección (121) que está dispuesta en comunicación fluida con la salida del canal de dispersión (113) de forma que el flujo laminar del líquido tamponante (2) que sale del canal de dispersión (11) a través de la salida del canal de dispersión (113) y que contiene el perfil de concentración dispersado del soluto de una sustancia candidata (3) es dirigido a través de la primera entrada del canal de detección (121) hacia el canal de detección (12) para formar un perfil de concentración simétrico final del soluto de una sustancia candidata (3) en el líquido tamponante en el canal de detección (12), y
- al menos una entrada adicional del canal de detección (122, 123) para la introducción de un objetivo (41; 41, 42) en el canal de detección (12),
- al menos un inyector del objetivo (8, 9) para la introducción de un objetivo en el canal de detección (12) a través de la al menos una entrada adicional del canal de detección (122, 123) de forma que se obtenga un perfil de concentración combinado que comprende un perfil de concentración del objetivo constante suprayacente al perfil de concentración simétrico final del soluto de una sustancia candidata (3) en el líquido tamponante (2),
- medio para mantener en el canal de detección (12) al menos una mitad del perfil de concentración combinado contenido en el líquido tamponante (2), y
- una unidad de detección óptica (6) capaz de, y dispuesta para, barrer ópticamente la al menos una mitad del perfil de concentración combinado contenido en el líquido tamponante (2) en el canal de detección (12) para la detección, a las diversas concentraciones del soluto de una sustancia candidata (3) del perfil de concentración combinado, de una señal óptica representativa de la respuesta biológica del objetivo frente a la sustancia candidata soluble,
- en la que la salida del canal de dispersión (113) y la primera entrada del canal de detección (121) están conectadas

entre sí de forma que se mantenga el flujo laminar en la conexión de estos canales y en el canal de detección (12).

12. Sistema según la reivindicación 11, en el que una pared interna (13) del canal de dispersión (11) en la salida del canal de dispersión (113) y una pared interna (14) del canal de detección (12) en la primera entrada del canal de detección (121) tienen la misma forma y tamaño para proporcionar un contorno de la pared interna del canal continuo en la conexión del canal de dispersión (11) con el canal de detección (12).

13. Sistema según la reivindicación 12, en el que la pared interna (13) del canal de dispersión (11) en la salida del canal de dispersión (113) y la pared interna (14) del canal de detección (12) en la entrada del canal de detección (121) están formadas íntegramente, de forma que se forme una pared interna continua común (13, 14).

