

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 962**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

C07H 1/00 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2002 E 12180829 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2017 EP 2565648**

54 Título: **Matrices de micropartículas y procedimientos de preparación de las mismas**

30 Prioridad:

28.12.2001 US 343621 P
09.07.2002 US 192352

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

16.01.2018

73 Titular/es:

BIOARRAY SOLUTIONS LTD. (100.0%)
35 Technology Drive, Suite 100
Warren, NJ 07059, US

72 Inventor/es:

SEUL, MICHAEL;
CHAU, CHIU WO;
HUANG, HUI;
BANERJEE, SUKANTA;
HONG, YE y
YANG, JIACHENG

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 649 962 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

Matrices de micropartículas y procedimientos de preparación de las mismas

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a biochips, chips y ensamblaje de múltiples chips.

10 **Antecedentes**

10 Un formato de matriz para análisis biológicos y químicos sostiene la promesa de proporcionar rápidamente resultados precisos, mientras que se minimiza el trabajo [Nature Genetics, 1999 vol. 21 (1) suplemento pág. 3-4]. Típicamente, las matrices de sondas biológicas tales como ADN, ARN o moléculas de proteína se forman tanto por deposición e inmovilización como por síntesis *in situ* sobre sustratos inertes. En estos procedimientos de la técnica anterior, la formación de matrices se consigue normalmente uniendo moléculas de sondas directamente a un sustrato, que puede estar compuesto por materiales orgánicos (tales como materiales poliméricos como nitrocelulosa) o materiales inorgánicos (tales como vidrio o silicio).

20 El uso de silicio como sustrato proporciona ciertas ventajas relacionadas con los procedimientos bien establecidos de procesamiento de obleas de semiconductores y chips. En el procesamiento de semiconductores, las obleas se modifican y se forman en una serie de múltiples etapas de procesamiento para crear rasgos deseables. Normalmente, se hace una pluralidad de rasgos idénticos sobre cada oblea simultáneamente por procesamiento en paralelo para formar segmentos individuales sobre una oblea. Se logran espectaculares ahorros en el tiempo de fabricación fabricando rasgos idénticos usando procesamiento en paralelo o por lotes. Además, el procesamiento por lotes da alta uniformidad de chips y usando ciertos procedimientos de fotolitografía y grabado pueden fabricarse con mucha precisión rasgos muy pequeños (submicrómetros). Por consiguiente, pueden fabricarse estructuras con altas densidades de rasgos sobre un chip muy pequeño. Después de completarse el procesamiento, los segmentos individuales se cortan de obleas en un procedimiento conocido como singulación, para obtener una multiplicidad de chips [Peter Van Zant, "Microchip Fabrication", 3ª edición, McGraw-Hill 1998].

30 Las obleas de semiconductores que contienen diferentes chips funcionales pueden combinarse tanto en procedimientos de empaquetamiento finales interconectando diferentes chips o simplemente uniendo dos obleas con diferentes chips funcionales, partiendo luego la pila de obleas. La alta eficiencia del procedimiento de fabricación de semiconductores ha contribuido significativamente al rápido crecimiento de la industria. Se han desarrollado sistemas altamente sofisticados para la producción, empaquetamiento y control de la calidad de chips.

35 Los biochips son matrices de diferentes biomoléculas ("sondas") que pueden unirse a dianas específicas que están unidas a un soporte sólido. Ha habido esencialmente dos procedimientos para preparar biochips.

40 El primer procedimiento implica disponer alícuotas de disoluciones que contienen moléculas de sondas presintetizadas de interés sobre un sustrato plano, seguido de inmovilizar las moléculas de sondas en posiciones designadas. Por ejemplo, las disoluciones de sonda pueden dispensarse ("aplicarse en puntos") sobre un sustrato para formar matrices de sonda posicionalmente codificadas unidimensionales [Kricka, Larry J., "Immunoassay", Capítulo 18, páginas 389-404, Academic Press, 1996] o bidimensionales [patente de EE. UU. n.º 5.807.755 y 5.837.551] de composición personalizada. Las sondas moleculares pueden unirse directamente a una superficie de sustrato o pueden unirse a soportes de fase sólida, que a su vez se depositan sobre o se unen a un sustrato para formar una matriz. Las micropartículas ("perlas") representan un tipo de tal soporte. Las perlas ofrecen la ventaja de separar el procedimiento de preparación y prueba de sustratos del procedimiento de preparación, aplicación y prueba de químicas de sondas y de ensayo [patente de EE. UU. n.º 6.251.691]. Las perlas de diversos tamaños y composiciones se han usado extensivamente en análisis químico y bioquímico, además de en síntesis combinatoria.

50 Los procedimientos de deposición, impresión y aplicación por puntos para la producción de matrices de sondas tienen varias características no deseables. Primero, incluso las tecnologías de deposición e impresión del estado de la técnica sólo producen matrices de baja densidad de rasgos, reflejando dimensiones de puntos típicas de 55 100 micrómetros y separaciones punto a punto de 300 micrómetros. Segundo, los procedimientos de deposición de sondas descritos hasta la fecha han fracasado en producir puntos uniformes, con variaciones punto a punto significativas. Tercero, los procedimientos de aplicación por puntos, que incluyen variantes tales como deposición electroforética a electrodos con patrón [patente de Estados Unidos n.º 5.605.662] requieren soporte instrumental y logístico sustancial para implementar la producción de matrices a cualquier escala significativa. En particular, los procedimientos de aplicación por puntos no soportan la fabricación por lotes de matrices de sondas. Es decir, 60 mientras puede usarse un formato de procesamiento por lotes para producir sustratos eficazmente, la posterior etapa de "biofuncionalizar" estos sustratos aplicando sondas químicas o bioquímicas es ineficaz debido a que no se ajusta a un formato por lotes, sino que en su lugar requiere muchas etapas de aplicación por puntos individuales. Por tanto, este procedimiento de fabricar grandes números de chips funcionalizados idénticos requiere mucho más tiempo y es más caro que un procedimiento que usa procedimientos de procesamiento en paralelo.

El segundo procedimiento de preparación de matrices de sondas implica síntesis fotoquímica *in situ* de moléculas de sondas lineales tales como oligonucleótidos y péptidos usando un procedimiento similar a la fotolitografía, un componente convencional del procesamiento de semiconductores. Estos procedimientos se han usado más ampliamente en los últimos años para sintetizar, en un conjunto paralelo de reacciones fotoquímicas de múltiples etapas, conjuntos de oligonucleótidos en secciones designadas de vidrio o sustratos similares [patente de Estados Unidos n.º 5.143.854; Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1996, 93: 13555-13560].

Aunque el procesamiento en paralelo para generar simultáneamente una multitud de matrices de sondas directamente sobre una oblea tiene la ventaja de la escalabilidad y mejora intrínseca en la uniformidad proporcionada por el procesamiento en lotes, existen graves inconvenientes para la fabricación de matrices de sondas. Primero, sólo moléculas lineales simples relativamente cortas se sintetizan adecuadamente en una serie de reacciones de una única etapa y, en la práctica, sólo las matrices de oligonucleótidos cortos se han preparado por este procedimiento. Segundo, las reacciones frecuentemente no avanzan hasta completitud, conduciendo a heterogeneidad composicional significativa. Tercero, todo el procesamiento de semiconductores debe completarse antes de la introducción de biomoléculas, debido a que las biomoléculas pueden no ser compatibles con los duros entornos en ciertas etapas de procesamiento de semiconductores. Esta limitación puede excluir que se tome la ventaja completa de la amplia variedad de técnicas de fabricación de semiconductores. Cuarto, si la funcionalización se realiza en un formato de fabricación por lotes, ese procedimiento de fabricación define la composición química o bioquímica ("contenido") de cada chip sobre la oblea. Es decir, introducir un cambio en el diseño de sondas requiere que el procedimiento de fabricación entero se cambie consecuentemente. La personalización, mientras que es teóricamente factible, requiere un cambio en la secuencia de etapas de enmascarado necesarias requeridas para la síntesis fotoquímica de un conjunto deseado de moléculas de sonda. El coste y los retrasos de tiempo asociados a este procedimiento hacen que la personalización sea poco factible en la práctica.

El documento WO 01/98765 A1 divulga una matriz de partículas en formato de bioensayo para realizar análisis de interacción molecular cualitativo y/o cuantitativo entre dos clases de moléculas (un analito y un agente de unión).

Breve descripción de los dibujos

Las figs. 1a y 1b son una ilustración del procedimiento para producir biochips.

La fig. 2 muestra un ejemplo de un chip que comprende una matriz de perlas. El chip comprende tres capas (L1, L2, L3). L1 es un sustrato de silicio con una matriz microproducida para acomodar perlas (A1); L2, SiO₂ con patrón (100 nm de espesor); L3, es una capa de Si₃N₄ (5-10 nm de espesor).

La fig. 3 muestra un ejemplo de diseño de oblea.

La fig. 4 muestra un ejemplo del diseño de chips que comprenden matrices de perlas. El sustrato es silicio (Si). El patrón de estrella de 12 puntos está sobre una capa de 100 nm de espesor de SiO₂. El área dentro de la estrella no tiene cubierta de SiO₂, mientras que el área fuera de la estrella tiene una cubierta de SiO₂. En el centro hay una matriz de cavidades hexagonales estrechamente compactas. El número total de cavidades es 4012.

La fig. 5 proporciona ejemplos de estructuras superficiales que pueden usarse para asegurar perlas. H1 es un orificio de retención de una única perla con paredes laterales rectas. H2 es una cavidad piramidal que puede acomodar una perla. H3 es el grupo de postes que confinan una perla. Hx es una cavidad que puede contener una pluralidad de perlas.

La fig. 6 muestra ejemplos de estructuras de matriz. A1 y A2 son matrices de cavidades rectangulares. A3 es una matriz de cavidades hexagonales.

La fig. 7 muestra un ejemplo de agrupamiento de chips.

La fig. 8 ilustra el procedimiento del empaquetamiento de chips. A, B, C, D son chips con diferente funcionalización. Las obleas pueden separarse en chips rompiendo la oblea según las líneas de trazado. Chips individuales con diferentes grupos funcionales que se separaron de diferentes obleas pueden colocarse juntos. Un empaquetamiento de 4 chips consiste en cuatro chips funcionalizados distintos unidos el uno a continuación del otro para aplicación biológica. Los cuatro chips pueden disponerse en una variedad de formas, con ejemplos no limitantes que incluyen formatos cuadrados o lineales.

La fig. 9 ilustra un procedimiento de ensamblaje de chips moviendo chips libres en filas y columnas.

La fig. 10 muestra un ejemplo de un diseño de chip que pone una matriz de sondas sobre una esquina de cada chip. Combinando cuatro de tales chips en la forma mostrada en el dibujo puede formarse una matriz mayor.

La fig. 11 ilustra el procedimiento de fabricación para los chips que comprenden matrices de perlas.

La fig. 12 es una fotografía de hidrogel formado sobre oblea de silicio.

La fig. 13a es una ilustración de las imágenes fluorescentes de una matriz de perlas sobre un chip antes de la formación de hidrogel y después del desprendimiento del gel. El número de perlas y posiciones de perlas fueron idénticos. La fig. 13b es una ilustración de resultados de reacción sobre chip con tratamiento con hidrogel y sin tratamiento con hidrogel.

La fig. 14 es una ilustración de un soporte de chips móvil y su aplicación conjuntamente con cámaras de reacción.

La fig. 15 ilustra un ejemplo de una matriz codificada al azar; (b) biblioteca de chips (c) ensamblaje al azar de chips de la biblioteca de chips, (d) embaldosado al azar de matriz.

La fig. 16 es una ilustración del diseño de matrices para el ensamblaje simultáneo o ensamblaje secuencial de grupos de perlas con distintos tamaños.

La fig. 17 es una ilustración del diseño de soportes de múltiples chips.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona biochips tal como se definen en la reivindicación 1. En las reivindicaciones dependientes 2-15 se definen realizaciones preferidas de los biochips. Además, la presente invención proporciona una pluralidad de chips tal como se definen en la reivindicación 16. Además, la presente invención proporciona un ensamblaje de múltiples chips tal como se define en la reivindicación 17. El procedimiento para producir biochips según la presente invención comprende modelar un sustrato para formar una pluralidad de regiones de chip; delinear un límite de separación entre las regiones de chip, ensamblar al menos una matriz de perlas que comprende perlas biofuncionalizadas, ópticamente codificadas, sobre una superficie del sustrato, y singular las regiones de chip para formar biochips individuales. Como se trata anteriormente, la singulación puede conseguirse antes de ensamblar una matriz de perlas sobre una superficie de chip. (En este contexto, el término "biochip", como se usa en el presente documento, se refiere a un chip que tiene biomoléculas unidas a su superficie, por ejemplo, para su uso en bioanálisis). Ejemplos no limitantes de biomoléculas incluyen oligonucleótidos, fragmentos de ácido nucleico, proteínas, oligopéptidos, ligandos, receptores, antígenos, anticuerpos y miembros individuales de pares de unión biológica. Además, el término "singular" o "singulación" como se usa en el presente documento se refiere a un procedimiento para obtener chips rompiendo las conexiones entre regiones de chip individuales sobre un sustrato o una subunidad de un sustrato que contiene más de un chip. También, los términos "funcionalización" y "biofuncionalización" como se usan en el presente documento se refieren a un procedimiento para unir biomoléculas (por ejemplo, sondas moleculares) a un sustrato, que incluye unir a la superficie de perlas.

Descripción detallada

La siguiente descripción es útil para entender la presente invención tal como se definió anteriormente en la sección de resumen de la invención. En particular, se proporcionan composiciones y procedimientos para diseñar y producir matrices de composición y disposición deseadas que comprenden entidades químicas o biológicas tales como biomoléculas como ácidos nucleicos y proteínas. Específicamente, los procedimientos descritos en el presente documento combinan la flexibilidad de la selección en tiempo real del contenido de matrices y alta densidad de rasgos con las economías de escala proporcionadas por un procedimiento en paralelo para el ensamblaje de una multiplicidad de matrices de sondas codificadas al azar presentadas en soporte sólido de composición seleccionable, en posiciones designadas de compartimentos de oblea delineados ("chips"). También se incluyen procedimientos para la formación de matrices posicional y composicionalmente codificadas de tales chips. Además, se proporcionan diseños de obleas y chips que optimizan el rendimiento de soportes de fase sólida tales como micropartículas etiquetadas ("perlas") y chips etiquetados ("baldosas") en pruebas y ensayos bioanalíticos que implican biomoléculas y células.

En el presente documento, se proporcionan procedimientos y procesos para preparar matrices de alta densidad unitaria de micropartículas que están biológica o químicamente funcionalizadas. Tales matrices pueden producirse en cantidades ajustables, en un formato flexible y con composiciones preseleccionadas. Los procedimientos y procesos pueden llevarse a cabo en un formato de lotes y paralelo. Específicamente, se describe la fabricación de tales matrices de micropartículas sobre una o más obleas, de forma que una parte o la totalidad de una oblea específica presente una o más de tales matrices de micropartículas con una composición y funcionalidad que puede ser preseleccionada. También se describe el empaquetamiento de la matriz resultante de micropartículas en un formato de múltiples chips.

Se describen matrices con composiciones que dependen del uso final de la matriz. Pueden prepararse matrices que contienen de aproximadamente una perla a muchos millones. Generalmente, la matriz comprenderá de una a hasta un mil millones o más, dependiendo del tamaño de las perlas y el sustrato, además del uso final de la matriz. Intervalos preferidos para matriz de alta densidad de rasgos son de aproximadamente 1.000.000.000 (1 mil millones) a 1 perla/mm², más preferentemente 1.000.000 a 100 perlas/mm², lo más preferentemente 100.000 a 1.000

perlas/mm³.

Las micropartículas se funcionalizan para incluir entidades químicas o biológicas tales como, por ejemplo, ADN, ARN y proteínas. Estas entidades pueden seleccionarse dependiendo de la aplicación de interés, proporcionándose así flexibilidad de selección del contenido de matrices. Además, como una matriz de micropartículas tal tiene una alta densidad de rasgos, puede diseñarse para optimizar el rendimiento de matrices en el ensayo bioanalítico de interés. Ejemplos de tales ensayos se desvelan en el documento PCT/US01/20179 y la patente de EE. UU. n.º 6.251.691.

Los procedimientos del procedimiento general pueden agruparse en cuatro categorías generales, concretamente preensamblaje, ensamblaje, posensamblaje y empaquetamiento. Tal agrupación no pretende limitar ciertos procedimientos a ciertos grupos. La figura 1a y 1b son ilustraciones particulares del procedimiento como se describe adicionalmente más adelante.

I. Preensamblaje

Los procedimientos de preensamblaje incluyen la implementación de disposición de chips, fabricación de la oblea basándose en tal disposición, opcionalmente trazado de la oblea, seguido de limpieza e inspección, si se requiere. Como se ilustra en la fig. 1a y 1b, la singulación (como se describe más adelante) puede seguir a los procedimientos de ensamblaje (fig. 1a) o seguir al procedimiento de fabricación de obleas (fig. 1b). En el supuesto caso de que se obtengan chips individuales de una oblea, los chips resultantes se agrupan y cada chip puede etiquetarse como se describe más adelante para identificar tal chip basándose en su historia de funcionalización.

1.1 Disposición de chips

Un ejemplo de disposición de chips se muestra en la figura 2. Debe entenderse que un "chip" puede tener cualquier forma tridimensional. Cada chip comprende un sustrato (por ejemplo, capa 1 (L1)) en el que perlas biofuncionalizadas pueden ensamblarse para formar una matriz de micropartículas. Pueden usarse muchos tipos de materiales como sustrato. Los materiales adecuados tienen ciertas características deseables. Estas características pueden clasificarse como mecánicas (por ejemplo, resistencia), eléctricas (por ejemplo, que tienen una impedancia interfacial que puede modificarse), ópticas (por ejemplo, lisura, transparencia, un espectro de absorción óptica bien definido, autofluorescencia mínima, alta reflectividad) y químicas (por ejemplo, sujetas a procedimientos para definir rasgos precisos o para depositar capas dieléctricas, reactividad superficial que permite enlaces covalentes). Ejemplos no limitantes de sustratos adecuados incluyen semiconductores (por ejemplo, silicio), aislantes (por ejemplo, zafiro, mica y rubí), materiales cerámicos y polímeros (por ejemplo, Mylar™, Kapton™ y Lucite™).

En ciertas realizaciones, el sustrato puede ser una oblea de semiconductor tal como obleas de semiconductores monocristalinas que se usan comúnmente en la industria de dispositivos semiconductores. En otras realizaciones, el sustrato puede ser cualquier sustrato sólido modelable seleccionado para ser inerte a los reactivos usados en la fabricación de chips y bioensayos. Ejemplos no limitantes de tales sustratos incluyen vidrio, plásticos y polímeros.

La figura 2 es una ilustración de un chip que tiene una sección transversal rectangular y no pretende limitar otras geometrías del chip. En la figura 2, L1 se representa como una capa intermedia (aunque no se requieren capas sobre ambas caras de L1). La matriz de la cavidad A1 de L1 es donde va a construirse la matriz de perlas. La forma de las cavidades A1 no necesita ser cuadrada. Ejemplos no limitantes de otras formas adecuadas incluyen triángulos, rectángulos, pentágonos, hexágonos y círculos. Una de las funciones de la matriz de cavidades A1 es ayudar a disponer y asegurar las perlas construyendo estructuras regulares sobre la oblea o chips para confinar el movimiento de perlas sobre la superficie.

Opcionalmente, el chip también puede contener una segunda capa (L2). La capa L2 comprende una capa de dieléctrico aislante modelado (por ejemplo, dióxido de silicio). Un ejemplo de un posible patrón se facilita por la figura 3, que muestra un patrón con forma de estrella en el centro del chip. El área fuertemente sombreada es el material dieléctrico y el área blanca es donde se quita el dieléctrico. El espesor de la capa de dieléctrico es típicamente, pero no se limita a, 100 nm. Si se aplica un campo verticalmente a través del chip, se forma un potencial no uniforme próximo a la superficie del chip debido al patrón de L2. El campo eléctrico puede aplicarse a la superficie según el procedimiento expuesto en la patente de EE. UU. n.º 6.251.691 (un procedimiento tal se denomina "LEAPS"). Usando LEAPS, perlas en una disolución líquida que se aplica a la superficie del sustrato se someten a un cambio en el gradiente de campo eléctrico lateral cuando se aplica un potencial de CA al sustrato. Este gradiente de campo eléctrico acciona las perlas en la disolución de manera que las perlas se acumularán en el área A1 en la que las estructuras superficiales se han construido sobre L1. Por consiguiente, el patrón de L2 puede ser cualquier patrón que pueda producir la acumulación de perlas en un área particular del sustrato, aunque debe reconocerse que algunos patrones son más eficaces que otros en hacer que las perlas se acumulen.

El modelado de la capa de dieléctrico L2 según un diseño predeterminado facilita la modificación casi permanente de la impedancia eléctrica de la estructura de electrolito-aislante-semiconductor (EAS) formada por la disolución de perla-dieléctrico-semiconductor. Modulando espacialmente la impedancia de EAS, el modelado de electrodos

determina la corriente iónica en la proximidad del electrodo. Dependiendo de la frecuencia del campo eléctrico aplicado, las perlas tanto buscan, como evitan, regiones de alta corriente iónica. Por tanto, el modelado espacial transmite el control externo explícito sobre la ubicación y forma de las matrices de perlas.

5 Opcionalmente, un chip que comprende una matriz de perlas puede contener una capa de pasivación protectora que normalmente cubre la superficie. La capa L3 funciona como una interfaz entre el chip y el medio líquido, que puede incluir la suspensión de perlas, muestras de bioensayo o productos químicos de lavado de chips. Por consiguiente, la capa L3 debería ser relativamente robusta contra la corrosión de productos químicos y el entorno ambiental. También debería proteger las sondas funcionales unidas a las perlas del daño electrostático durante el ensamblaje
10 de matrices de perlas. En algunas realizaciones, la capa L3 también minimiza la adhesión de perlas a la superficie del chip durante el ensamblaje de matrices de perlas. La capa L3 es preferentemente inerte a muestras biológicas y es preferentemente no fluorescente en el mismo intervalo de longitud de onda que se usa para la detección fluorescente en bioensayos. Además, su existencia no debe crear un cambio en la distribución del campo eléctrico próxima a la superficie del chip que evite el uso de LEAPS para el ensamblaje de perlas. A modo de ejemplo, la
15 capa L3 puede ser una capa delgada de nitruro de silicio LPCVD (depositado por vapor químico a baja presión) con un espesor de aproximadamente 40 a aproximadamente 100 Å.

La capa L3 también puede manipularse por tratamientos químicos para alterar las propiedades superficiales. Por ejemplo, una superficie de nitruro de silicio podría oxidarse para dar SiO_x (es decir, SiO_x y/u óxido de silicio subestequiométrico) u oxinitruro de silicio (SiO_xN_y), siendo ambos hidrófilos y facilitaría la dispensión de muestras acuosas. En otras realizaciones, el SiO_x o SiO_xN_y superficial puede funcionalizarse adicionalmente con grupos silanol para dar una superficie hidrófoba.

Finalmente, la cara trasera de cada chip puede recubrirse con un metal o aleación metálica para el contacto eléctrico (preferentemente un contacto óhmico). Por ejemplo, si el chip está hecho de un sustrato de silicio, la cara trasera del chip puede recubrirse con una delgada capa de adhesión de cromo y una capa de oro más gruesa usando procedimientos rutinarios en la industria de los semiconductores. Aunque el recubrimiento de oro es útil debido a que es inerte a la mayoría de los productos químicos y tiene alta conductividad, pueden usarse otros recubrimientos de contacto óhmico si son químicamente compatibles con los otros procedimientos de fabricación. Ejemplos no
25 limitantes incluyen nitruro de titanio/tungsteno y titanio tungsteno/tungsteno. Los chips pueden recubrirse con un metal o aleación metálica antes o después de la singulación.

Opcionalmente, una cara de un chip y/o su cara opuesta paralela puede recubrirse con un material magnéticamente sensible. Esto puede conseguirse ensamblando perlas magnéticas sobre cualquiera o ambas caras de las perlas magnéticas del chip usando procedimientos de ensamblaje rutinarios. Pueden usarse los procedimientos expuestos en el documento de EE. UU. n.º de serie 10/032.657 presentado el 28 de diciembre de 2001. El material magnéticamente sensible también puede funcionalizarse antes del ensamblaje para proporcionar funcionalidad química y biológica adicional. Alternativamente, todas las caras de un chip pueden codificarse adsorbiendo al azar perlas sobre el soporte de chips usando procedimientos conocidos en la técnica. La configuración de la matriz proporciona una etiqueta miniaturizada que identifica el chip ("ID de chip"), además de la oblea de origen ("ID de oblea"). Cada ID de chip se saca del número, S, de configuraciones distinguibles de una matriz codificada al azar de L posiciones, dado por el número de formas en las que n muestras (sin ordenar) de r (k) partículas (indistinguibles), $1 \leq k \leq n$, pueden distribuirse entre L posiciones:

$$45 \quad S(L; n; r(k), 1 \leq k \leq n) = L! / [r(1)! r(2)! \dots r(k)! \dots r(n)!]$$

La ilustración del gran número de combinaciones posibles es el hecho de que una matriz de L=16 posiciones, compuesta por n=4 tipos de perlas distinguibles, cada tipo representado cuatro veces ($r(1) = \dots r(4) = 4$) puede mostrar $S(16; 4; r(k) = 4; 1 \leq k \leq 4) = 16! / [(4!)(4!)(4!)(4!)]$, o aproximadamente 63 millones de configuraciones distinguibles.

En el uso de matrices codificadas al azar para producir varias etiquetas T, en las que $T \ll S$, para muchas aplicaciones de interés práctico, un gran espacio de configuración de tamaño S se muestrea para reducir la probabilidad de duplicación. Una ventaja particular de construir etiquetas usando matrices de perlas codificadas al azar es el hecho de que, mediante los procedimientos descritos en el presente documento, se producen fácilmente, económicamente, en formato miniaturizado y en grandes números en una única etapa de procedimiento. Los códigos de ID de chip en forma de matrices de perlas codificadas al azar se construyen fácilmente para compartir subcampos o subcódigos comunes que pueden usarse para determinar si dos o más chips se originaron o no a partir de la misma oblea. Por ejemplo, si un total de n tipos de perlas se usan para producir ID de chip para chips sobre N obleas, p tipos pueden reservarse, seleccionándose $p < n$ y p tal que $2^p > N$. Entonces se construyen los subcódigos específicos para oblea que sólo contienen los n-p tipos de perlas restantes. Por ejemplo, dados n=16 tipos de perlas para la construcción de ID de chip que contienen un subcódigo que identifica cada chip que se ha originado en una de N=100 obleas, p=7 tipos de perlas pueden reservarse para la construcción de un código binario de 7 dígitos para identificar cada una de las 100 obleas por la ausencia de hasta siete de los tipos de perlas reservados. Por ejemplo, una de las obleas en el conjunto carecerá de los 7 tipos reservados, otras 7 carecerán de

uno de los tipos reservados. Las perlas codificantes están funcionalizadas y llevan moléculas de sondas sobre su superficie. Las partículas magnéticas codificantes también pueden magnetizarse y pueden presentar funcionalidad química y biológica.

5 Un ejemplo de un chip fabricado se muestra en la figura 4. El sustrato es una oblea de Si(100) dopada con fósforo de tipo n con una resistividad de 1,5-4 ohm-cm. El chip es un cuadrado con 1,75 mm de lado y un espesor de 0,5 mm. La capa L2 tiene 1000 Å de dióxido de silicio térmicamente crecido con una abertura de estrella de 12 puntas en el centro. Las dimensiones de la estrella son como se indican en la figura 4. En el centro del chip hay una matriz de cavidades hexagonales estrechamente compactas que comprenden 68 filas y 59 columnas. Las dimensiones de las cavidades hexagonales son como se indican en la figura 4. La capa L3 es una capa de 60 Å de espesor de nitruro de silicio LPCVD que cubre el chip entero, excepto las paredes laterales y fondos de las cavidades hexagonales, en las que solo hay silicio desnudo con óxido de silicio nativo.

15 Las figuras 5a y 5b ilustran ejemplos no limitantes de otras estructuras adecuadas para confinar el movimiento de perlas. H1 es una cavidad que retiene una única perla o cavidad con paredes laterales rectas. H2 es una cavidad piramidal inversa que puede acomodar una perla. H3 es el grupo de postes que confinan una perla. Hx es una cavidad que puede contener una pluralidad de perlas. El dibujo superior (fig. 5a) muestra una vista en planta de las estructuras, mientras que el dibujo inferior (fig. 5b) muestra una vista en sección transversal. En una realización puede usarse un compartimento de paredes laterales rectas H1 que sólo acomoda una perla. Esta estructura es útil para confinar perlas en un medio líquido. El área sombreada en la figura 5 es material de sustrato y el área blanca es espacio vacío. La forma del compartimento no se limita a un cuadrado; por ejemplo, una cavidad piramidal H2 puede usarse como compartimento para contener una única perla. Además, aunque los fondos de las cavidades son preferentemente planos, no necesitan serlo en ciertas realizaciones.

25 La fig. 6 muestra ejemplos de estructuras de matriz. A1 y A2 son matrices de cavidades rectangulares. A3 es una matriz de cavidades hexagonales. Puede fabricarse una multitud de estructuras sobre un chip u oblea para formar una matriz o una pluralidad de matrices sobre la superficie del chip u oblea. Las estructuras pueden ser todas de tipos idénticos o diferentes de estructuras y/o pueden coexistir estructuras de diferente tamaño. En la fig. 6 se ilustran tres realizaciones ilustrativas. En los dibujos, las áreas sombreadas son las cavidades. Las áreas no sombreadas son la superficie original del sustrato (que puede cubrirse con una delgada película). La disposición A1 es una matriz cartesiana regular de cavidades cuadradas. La disposición A2 es una matriz en damero alternante de cavidades cuadradas. La disposición A3 es una matriz de cavidades hexagonales. Aunque las matrices no se limitan a matrices regulares, las matrices regulares son convenientes para interpretar los resultados de reacción.

35 Por supuesto, la localización de la matriz sobre un chip no se limita al centro. Por ejemplo, la matriz puede situarse sobre una esquina tal como aquellas mostradas en la figura 10. Además, puede haber más de una matriz sobre un chip. Por ejemplo, pueden fabricarse cuatro matrices sobre un único chip como se muestra en la figura 10. En algunas realizaciones, grupos de perlas diferentes se añaden a cada una de las cuatro matrices sobre el chip. Un procedimiento para conseguir esta distribución de perlas en un procedimiento a gran escala es usar una máscara que sólo expone una matriz cada vez sobre cada chip. Se añade un grupo de perlas distinto a las matrices expuestas. Entonces, la máscara se desplaza para exponer otra matriz sobre cada chip y el procedimiento se repite. Después de repetirlo cuatro veces, cada chip tendrá cuatro matrices con cuatro grupos de perlas distintos.

45 1.2 Fabricación de obleas

Pueden usarse varios procedimientos para conferir una disposición de chip seleccionada sobre la oblea usando técnicas para obleas tales como, por ejemplo, fotolitografía o grabado de material. Los procedimientos seleccionados dependen de los requisitos de diseño de obleas. Una oblea se somete a uno o más ciclos de fabricación dependiendo de diferentes requisitos para dar una oblea completamente fabricada. Cada ciclo de fabricación en este procedimiento comprende, pero no se limita a, tres etapas: (i) crecimiento y/o deposición de material; (ii) litografía; y (iii) grabado. Cada ciclo normalmente produce una capa estructural. Dependiendo de las estructuras diana sobre la oblea, una o más capas pueden fabricarse ciclo por ciclo.

55 Por ejemplo, el crecimiento o deposición de material puede conseguirse por crecimiento de SiO₂ sobre silicio, o deposición de vapor químico de material dieléctrico tal como SiO₂, Si₃N₄ u otros, o deposición de metales tales como aluminio, cromo, oro, titanio u otros. La etapa de litografía puede incluir fotolitografía, litografía por rayos e, litografía por rayos x o litografía por impresión. La etapa de grabado puede incluir la eliminación de una cierta cantidad de material en ciertas áreas definida por una capa de enmascaramiento tal como, pero sin limitarse a, una resina fotosensible. Ejemplos no limitantes de procedimientos de grabado incluyen grabado anisotrópico tal como grabado con iones reactivos, grabado químico húmedo de plano biselado cristalino o grabado isotrópico tal como grabado químico húmedo isotrópico, grabado con vapor o grabado con plasma.

65 1.3 Trazado de obleas

Para la eficiencia de funcionalización, regiones de chip se delimitan después del procedimiento de fabricación de obleas, de manera que las regiones de chip sean adecuadas para el procesamiento en paralelo por lotes. Por este

motivo, se prefiere trazar la oblea para delinear áreas que darán lugar tras la singulación a chips individuales. En otras realizaciones, los chips pueden separarse usando técnicas que no requieren trazado. El fin de las líneas de trazado es producir líneas de rotura para facilitar la separación de chips individuales durante la etapa de singulación de obleas sin dañar o romper el chip individual. Debe observarse que, aunque la línea de trazado cederá a la rotura posterior, son suficientemente robustas para permitir las posteriores etapas del procedimiento sin rotura de los chips. A modo de ejemplo, las líneas de trazado pueden producirse usando una máquina de trazado de obleas (por ejemplo, DISCO, Dynatex o Loomis Industry) para crear líneas de trazado que sólo son una fracción del espesor de la oblea. Esto va seguido de la aplicación de un rodillo en la dirección perpendicular a las líneas de trazado para delinear adicionalmente chips individuales. La oblea puede trazarse usando un trazador de punta de diamante; pueden producirse zanjas entre chips sobre una oblea de silicio por grabado químico usando productos químicos húmedos tales como, por ejemplo, disoluciones de hidróxido potásico/agua a temperatura elevada. La oblea también puede grabarse en seco por grabado con iones reactivos profundo para dar zanjas bien definidas entre los chips.

1.4 Limpieza e inspección de obleas

Durante la etapa del trazado de obleas puede generarse polvo o partículas. Para proteger la superficie de la oblea, en una realización, una capa protectora se aplica a la superficie de la oblea. Por ejemplo, la capa puede estar en forma de una cinta adhesiva (si no daña la superficie de la oblea), un recubrimiento de resina fotosensible o algún otro recubrimiento orgánico. La capa protectora se elimina después del trazado desprendiéndola de la oblea (por ejemplo, si es una cinta adhesiva) o disolviéndola en un disolvente apropiado. Por ejemplo, una capa de resina fotosensible puede eliminarse disolviéndola en acetona y luego aclarando la oblea con alcohol isopropílico. Si se dejan cantidades traza del material de recubrimiento protector sobre la oblea pueden usarse procedimientos de limpieza más agresivos. En una realización, la oblea se limpia por un plasma de oxígeno para eliminar las cantidades traza de material orgánico. En otra realización, la oblea se limpia por limpieza RCA, un procedimiento de limpieza convencional en la industria de los semiconductores que implica una mezcla de hidróxido de amonio/peróxido de hidrógeno que se calienta a aproximadamente 75°C. En otra realización, la oblea se limpia por una mezcla de ácido sulfúrico concentrado y peróxido de hidrógeno a temperaturas elevadas (aproximadamente 60°C).

1.5 Agrupamiento de chips

La fig. 7 muestra un ejemplo de agrupamiento de chips (C3). C1 es una oblea o cualquier unidad de sustrato que es conveniente para la fabricación por lotes tal como la usada en la industria de los semiconductores; C2 es una subunidad de C1 (podría ser una C1 completa) que consiste en un número deseado de chips; C3 es un chip, que es la unidad más pequeña de un biochip. Normalmente, C2 es una unidad integrada para la funcionalización de chips. Después de la funcionalización, C2 se separa en C3 individuales.

1.6 Funcionalización y reunión de perlas

Los términos "microesfera", "micropartícula", "perla" y "partícula" se usan indistintamente en el presente documento. La composición de las perlas incluye, pero no se limita a, plásticos, cerámicas, vidrio, poliestireno, metilistireno, polímeros acrílicos, materiales paramagnéticos, disolución de toria, grafito de carbono, dióxido de titanio, látex o dextranos reticulados tales como Sepharose, celulosa, nailon, micelas reticuladas y teflón (véase "Microsphere Detection Guide" de Bangs Laboratories, Fishers, IN.) Las partículas no necesitan ser esféricas y pueden ser porosas. Los tamaños de perla pueden oscilar de nanómetros (por ejemplo, 100 nm) a milímetros (por ejemplo, 1 mm), prefiriéndose perlas de aproximadamente 0,2 micrómetros a aproximadamente 200 micrómetros, siendo particularmente preferidas más preferentemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 micrómetros.

En algunas realizaciones, las perlas se funcionalizan antes de distribuirse sobre la superficie de la oblea, de forma que cada perla tiene un tipo específico de sonda biológica enlazada sobre su superficie. Diversos procedimientos para funcionalizar las perlas son adecuados para su uso. El procedimiento apropiado se determina en parte por la naturaleza del material usado para preparar la perla. Por ejemplo, las perlas pueden funcionalizarse uniendo moléculas de agente de unión a las mismas, incluyendo tales moléculas ácidos nucleicos que incluyen fragmentos de ADN (oligonucleótidos) o de ARN; péptidos o proteínas; aptámeros y moléculas orgánicas pequeñas según procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, usando una de varias reacciones de acoplamiento conocidas en la técnica (G. T. Hermanson, Bioconjugate Techniques (Academic Press, 1996); L. Ilium, P. D. E. Jones, Methods in Enzymology 112, 67-84 (1985)). En ciertas realizaciones, las perlas funcionalizadas tienen moléculas de agente de unión (por ejemplo, ADN, ARN o proteína) covalentemente unidas a las perlas. Las perlas pueden almacenarse en una suspensión en masa tamponada hasta que se necesiten. La funcionalización típicamente requiere reacciones de una etapa o dos etapas que pueden realizarse en paralelo usando robótica de manipulación de líquidos convencional para unir covalentemente cualquiera de varias funcionalidades deseables a perlas designadas. Pueden usarse perlas de arquitectura núcleo-vaina, estando la vaina compuesta en forma de una capa de bloqueo polimérica cuya composición preferida se selecciona; y la funcionalización se realiza según la aplicación del ensayo elegido como diana.

En algunas realizaciones, las perlas se codifican por color con colorantes fluorescentes. Para su uso en diversos

ensayos, las perlas pueden comprender sustancias biológicas etiquetadas con colorante adicionales sobre sus superficies. Para detectar la señal de las perlas y ensayo pueden usarse obtención de imágenes microscópicas fluorescentes.

- 5 Se establece una biblioteca de perlas preparando subpoblaciones de diferentes grupos de perlas. Cada subpoblación de perlas se prepara fijando un tipo de sonda molecular de una biblioteca de sondas a una pluralidad de perlas, formando la subpoblación. Cada subpoblación de perlas puede distinguirse por la codificación de color con colorante fluorescente u otro procedimiento.

10 II. Ensamblaje

Las matrices de perlas se ensamblan asegurando las perlas sobre la superficie de una oblea o porción de oblea. Antes de asegurar las perlas a la superficie de la oblea, una biblioteca de perlas puede formarse por codificación química o tinción de perlas con conjuntos de etiquetas ópticamente distinguibles tales como aquellas que contienen uno o más colorantes fluoróforos espectralmente distinguibles por longitud de onda de excitación, longitud de onda de emisión, vida del estado excitado o intensidad de emisión. Las etiquetas ópticamente distinguibles se hicieron para usarse para teñir perlas en relaciones especificadas, como se ha desvelado, por ejemplo, en Fulwyler, patente de EE. UU. n.º 4.717.655. La tinción también puede conseguirse por hinchamiento de partículas según procedimientos conocidos para aquellos expertos en la técnica, (Molday, Dreyer, Rembaum & Yen, *J. Mol Biol* 64, 75-88 (1975); L. Bangs, "Uniform Latex Particles, Seragen Diagnostics, 1984]. Por ejemplo, hasta doce poblaciones distinguibles de perlas pueden codificarse por hinchamiento y tinción en masa con dos colores, cada una individualmente en cuatro niveles de intensidad, y mezclarse en cuatro relaciones molares nominales. Los códigos de color combinatorios para superficies exteriores e interiores se desvelan en la solicitud internacional n.º PCT/US/98/10719. Los códigos de color también se tratan en la patente de Estados Unidos n.º 6.327.410.

Hay muchas formas posibles para asegurar perlas sobre la superficie de un chip cuando se forman matrices de perlas. Las cavidades que se forman durante las etapas de fabricación de obleas proporcionan compartimentos que retienen las perlas sobre la superficie del sustrato. La eficacia de asegurar (o inmovilizar) las perlas depende de las dimensiones de la cavidad con respecto al tamaño de la perla. Las dimensiones de cavidades usadas para este fin son de forma que la profundidad de la cavidad sea aproximadamente 0,5 a 1,5 veces el diámetro de las perlas usadas. Más preferentemente, las dimensiones de la cavidad son de forma que cuando una perla es gravitacionalmente estable en la cavidad, su punto más alto esté por debajo de la parte superior de los bordes, y sólo haya espacio suficiente para acomodar hasta 1/3 del volumen de otra perla. Además, mientras se prefiere que el tamaño de la cavidad sea mayor que el tamaño de la perla, en esta realización preferida, cada cavidad no debe ser capaz de acomodar más de una perla. Además, las aberturas de las cavidades son ligeramente más grandes que las perlas. La matriz hexagonal mostrada en la figura 4, por ejemplo, es compatible con perlas que tienen un diámetro de 3,2 micrómetros.

Puede no ser necesario usar cavidades en un sustrato que contenga las perlas. Por ejemplo, puede disponerse una pluralidad de postes sobre una superficie del sustrato para sujetar las perlas. Se muestra una posible estructura en el dibujo superior (vista en planta) y en el dibujo inferior (vista en perspectiva) de la figura 5c. En este caso, cada perla está confinada por seis postes alrededor de la misma. El número de postes no está limitado a seis, pero podrían ser tres o más. Además, puede usarse cualquier otra estructura superficial elevada o rebajada, que incluye bloques, postes, bultos e indentaciones. En otras realizaciones pueden usarse grandes cavidades que pueden contener más de una perla. Por ejemplo, la figura 5d muestra una gran cavidad con paredes laterales rectas. La visión general en el dibujo superior muestra que las dimensiones horizontales de la cavidad grande son superiores a dos veces la de un diámetro de perla.

Como se ha descrito anteriormente, puede variarse la geometría y tamaño de las cavidades usadas en el ensamblaje de matrices de micropartículas. En ciertas realizaciones, se varían la geometría y el tamaño depositando una capa de óxido de silicio o polímero después de que se formen los orificios por grabado. Por ejemplo, pueden formarse cavidades con perfiles de paredes laterales reentrantes por este procedimiento de deposición. En este contexto, el término "perfil de paredes laterales reentrantes" se refiere a la situación en la que el perfil de paredes laterales es de forma que el diámetro de la abertura de la cavidad en la superficie sea más pequeño que el diámetro de la cavidad en su fondo. Las cavidades con perfiles de paredes laterales reentrantes formadas por este procedimiento tienen una mayor tasa de retención de perlas durante el procesamiento y ensayo.

Las perlas pueden fijarse a una superficie por enlaces covalentes o por fuerzas de van der Waals, electrostáticas, gravitacionales, magnéticas u otras fuerzas. También pueden usarse combinaciones de tales procedimientos de unión. En una realización pueden producirse matrices de perlas tomando alícuotas de perlas codificadas designadas de depósitos individuales según la composición de matriz especificada. Alícuotas "reunidas" de suspensión se dispensan sobre sustratos seleccionados tales como una oblea delineada en compartimentos.

En otras realizaciones, la matriz de perlas puede prepararse usando LEAPS. En estas realizaciones se proporciona un primer electrodo plano que es sustancialmente paralelo a un segundo electrodo plano (configuración de "sándwich"), estando los dos electrodos separados por un hueco que contiene una disolución de electrolito. La

superficie o el interior del primer electrodo plano se modela por un procedimiento de modelado interfacial, como se describe más adelante. Las perlas codificadas y funcionalizadas se introducen en el hueco. Cuando se aplica un voltaje de CA al hueco, las perlas forman una matriz de perlas codificada al azar sobre el primer electrodo (por ejemplo, un chip o una oblea). Alternativamente, una matriz de perlas puede formarse sobre un electrodo sensible a la luz, por ejemplo, chip u oblea) usando LEAPS. Preferentemente, la configuración de sándwich descrita anteriormente también se usa con un electrodo sensible a la luz plano y otro electrodo plano. De nuevo, los dos electrodos están separados por un hueco que contiene una disolución de electrolito. Las perlas funcionalizadas y codificadas se introducen en el hueco, y tras la aplicación de un voltaje de CA en combinación con una luz, forman una matriz sobre el electrodo sensible a la luz.

Los sustratos (por ejemplo, chips u obleas) pueden modelarse según los procedimientos de modelado interfacial de LEAPS, por ejemplo, el crecimiento modelado de óxido u otros materiales dieléctricos para crear una configuración deseada de gradientes de impedancia en presencia de un campo eléctrico de CA aplicado. Alternativamente, un sustrato modelado puede obtenerse dopando selectivamente regiones interiores del sustrato. Pueden diseñarse patrones de forma que se produzca una configuración deseada de flujo de fluido inducido por campo de CA y transporte de partículas correspondiente. Los sustratos pueden modelarse sobre una escala de oblea usando tecnología de procesamiento de semiconductores. Además, los sustratos pueden compartimentalizarse depositando una película delgada de un polímero ópticamente transparente modelable por UV que fija una disposición deseada de conductos y compartimentos fluidicos al sustrato para confinar un fluido en uno o más compartimentos discretos, acomodando así múltiples muestras sobre un sustrato dado.

La codificación espacial, por ejemplo, puede conseguirse dentro de una única fase fluida en el transcurso del ensamblaje de la matriz, por ejemplo, usando LEAPS para ensamblar matrices de perlas planas en cualquier configuración deseada en respuesta a campos eléctricos alternos y/o según patrones de luz proyectada sobre el sustrato. LEAPS crea gradientes laterales en la impedancia de la interfaz entre el chip de silicio y la disolución para modular las fuerzas electrodinámicas que median en el ensamblaje de la matriz. Los requisitos eléctricos son modestos: se aplican bajos voltajes de CA de típicamente inferiores a $10V_{pp}$ a través de un hueco de fluido de típicamente 100 m entre dos electrodos planos. Este procedimiento de ensamblaje es rápido y es ópticamente programable: matrices que contienen miles de perlas se forman en el plazo de segundos bajo un campo eléctrico. La formación de múltiples submatrices también puede producirse en múltiples fases fluidas mantenidas sobre una superficie compartimentalizada de chip. Alternativamente, la codificación espacial se consigue ensamblando chips separados, llevando cada uno al menos una matriz codificada al azar sacada de un conjunto específico, en configuraciones de múltiples chips designadas.

En una realización, el procedimiento desvelado en el documento PCT/US01/20179 puede usarse para preparar matrices de perlas personalizadas que pueden usarse en la realización de análisis biomoleculares multiplexados. Usando READ, la matriz puede prepararse empleando procedimientos por lotes separados para producir sustratos específicos para la aplicación (por ejemplo, chip a la escala de la oblea) y para producir perlas que están químicamente codificadas y biológicamente funcionalizadas (por ejemplo, a la escala de $\sim 10^8$ perlas/100 l de suspensión). Preferentemente, las perlas se someten a etapas de control de calidad (QC) respectivas antes del ensamblaje de matrices, tal como la determinación de características morfológicas y eléctricas, incluyendo los ejemplos de las últimas potencial superficial ("zeta") y conductividad superficial. Además, se realizan ensayos reales sobre perlas en suspensión antes de que se introduzcan al sustrato. Esto es para optimizar las condiciones de ensayo, generalmente con el objetivo de maximizar la sensibilidad y especificidad del ensayo y para minimizar las variaciones perla a perla. Para sustratos, las etapas de QC pueden incluir inspección óptica, elipsometría y mediciones del transporte eléctrico.

Una vez las perlas químicamente codificadas y biológicamente funcionalizadas se combinan con el sustrato (por ejemplo, chip u oblea), LEAPS u otro procedimiento de deposición activa descrito en el presente documento permite el rápido ensamblaje de matrices densas sobre un área designada sobre el sustrato. Ensamblando dentro de la misma fase fluidica se evitan problemas tales como la variabilidad punto a punto o chip a chip sin la necesidad de reestructurar o volver a diseñar el procedimiento. Además, la uniformidad de estos procedimientos permite la caracterización de perlas independiente de chip, además de la optimización de las condiciones de ensayo. Además, pueden formarse múltiples matrices de perlas simultáneamente en compartimentos de fluido discretos mantenidos sobre el mismo chip u oblea. Una vez formadas, estas múltiples matrices de perlas pueden usarse para el procesamiento simultáneo de múltiples muestras. La integración de LEAPS con microfluidica produce una plataforma ópticamente programable miniaturizada autocontenida para el análisis en paralelo de proteínas y ácidos nucleicos.

Una vez se preparan perlas funcionalizadas y codificadas y luego se combinan con el sustrato, la interacción de unión entre el agente de unión sobre las perlas y un analito puede realizarse tanto antes como después de ensamblar la matriz codificada al azar sobre el sustrato. Por ejemplo, la matriz de perlas puede formarse después del ensayo, posterior al cual pueden tomarse una imagen del ensayo y una imagen descodificante de la matriz. Alternativamente, las perlas pueden ensamblarse en una matriz e inmovilizarse por medios físicos o químicos para producir matrices codificadas al azar. Puede aplicarse un voltaje de CC para producir matrices codificadas al azar. El voltaje de CC, típicamente fijado a 5-7 V (para perlas en el intervalo de 2-6 μm y para un tamaño de hueco de 100-

150 μm) y aplicado durante < 30 s en configuración de “sesgo inverso” de manera que un sustrato de silicio dopado en n formara el ánodo, hace que la matriz se comprima, facilitando el contacto entre perlas adyacentes dentro de la matriz y produce simultáneamente perlas que van a moverse hacia la región de alto campo eléctrico en proximidad inmediata de la superficie del electrodo. Las perlas pueden anclarse sobre la superficie por fuerzas de van der Waals o “ataduras” que se extienden desde la superficie de la perla, por ejemplo, polilisina y estreptavidina.

Después del ensamblaje de perlas, los chips u obleas se inspeccionan y se obtienen imágenes por microscopía fluorescente para obtener un mapa descodificante. La descodificación puede usarse después para identificar la posición y funcionalidad de cada perla individual.

El porcentaje de las posiciones de matriz que están llenas es preferentemente superior al 50%, más preferentemente superior al 90%. Para probar cómo de eficazmente retienen las cavidades las perlas en la superficie del sustrato, los chips que comprenden matrices de perlas se colocaron en una disolución acuosa y se agitaron continuamente durante tres días. Una comparación de las imágenes tomadas antes y después de esta prueba revelaron que más del 99% de las perlas sobre todos los chips probados permanecieron en las cavidades.

III. Posensamblaje

Durante el posensamblaje, las matrices de perlas pueden cubrirse con una superficie protectora. Antes o después de cubrir las perlas, las obleas que comprenden las matrices de perlas se singulan en uno o más chips de perlas.

3.1 Aseguramiento de micropartículas

En ciertas realizaciones, un gel que cubre el área de la matriz de perlas puede usarse para evitar que las perlas se desplacen. En otras realizaciones, grupos funcionales químicos sobre los fondos y/o las paredes laterales de las cavidades pueden usarse para enlazar las perlas a la superficie. Un polímero cargado también puede usarse para recubrir los chips antes de la deposición de perlas. La carga del recubrimiento de polímero se elige para ser opuesta a la de las perlas, de manera que las perlas se atraerán electrostáticamente al polímero. Cuando una perla está en una cavidad recubierta con polímero cargado, la atracción colúmbica entre la perla y las paredes laterales y el fondo de la cavidad sirve para contener la perla en la cavidad. De esta forma aumenta la tasa de retención de perlas durante el procesamiento y ensayo. En algunas realizaciones, un segundo polímero cargado se deposita sobre la superficie de chip después de que las perlas se hayan ubicado en las cavidades. La carga del segundo polímero se elige para ser la misma que la de la perla, de manera que ningún polímero se deposita sobre la perla, pero la carga superficial sobre el chip se neutraliza. Pueden implementarse varias variantes de estas técnicas con alteración mínima del procedimiento central. Por ejemplo, puede usarse una única capa de polielectrolito, o puede construirse una estructura de múltiples capas (que tiene control de polímeros positivos y negativos alternas) para dar un recubrimiento con un espesor más uniforme y controlado. Además, en lugar de polímeros, también pueden usarse nanopartículas de polímero cargadas solas o en combinación con polímeros cargados. También puede usarse un recubrimiento de polímero y/o nanopartículas sin carga, pero de baja T_g (temperatura de transición vítrea), para mejorar la adhesión de las perlas a la superficie del chip.

3.2 Protección de matrices ensambladas

Pueden usarse recubrimientos extraíbles para proteger las perlas biofuncionalizadas en las matrices de tanto una oblea antes de la singulación en biochips como de los propios biochips singulados. Por tanto, se desea tener una forma para proteger la matriz de perlas del polvo, suciedad y otros contaminantes ambientales mientras que el biochip u oblea está en almacenamiento. Se proporcionan recubrimientos protectores para biochips y obleas y procedimientos de preparación de tales recubrimientos. En realizaciones preferidas, los recubrimientos protegen las perlas en matrices de perlas de la contaminación ambiental y evitan la degradación de las biomoléculas (por ejemplo, sondas) sobre la superficie de las perlas. Además, los recubrimientos pueden eliminarse fácilmente de la superficie del biochip antes de realizar los bioensayos.

En ciertas realizaciones, el recubrimiento comprende un azúcar no reductor inerte tal como, por ejemplo, trehalosa que no interacciona con restos químicos reactivos tales como grupos amino en péptidos y proteínas y, por tanto, evita la degradación o agregación que es común cuando se seca con otros excipientes.

En otras realizaciones, un hidrogel (por ejemplo, un hidrogel de agarosa) puede usarse para prevenir la contaminación, deshidratación y daño físico durante el almacenamiento. Antes de realizar un bioensayo, el hidrogel puede desprenderse de la superficie del sustrato. El acto de desprendimiento no sólo elimina el hidrogel, sino que también limpia la superficie de cualquier perla adicional que no esté en las posiciones de matriz definidas por las cavidades u otras estructuras que las sujetan. Estas perlas adicionales, que están incorporadas en el hidrogel, pueden recuperarse para uso posterior.

3.3 Singulación de chips

Después de la funcionalización, los grupos de chips (oblea o subunidad de una oblea) son singulados. Si la oblea se

trazó previamente, puede singularse rompiendo las conexiones entre los chips. Esto puede hacerse haciendo rodar un rodillo sobre la cara trasera de la oblea en dirección perpendicular a las líneas de trazado, según el procedimiento explicado resumidamente en la patente de Estados Unidos n.º 3.790.051. Alternativamente, la singulación puede lograrse por otros procedimientos tales como usando el trazador/interruptor GST fabricado por Dynatex International™. El chip individual obtenido de esta forma está listo para empaquetarse. Además de los procedimientos de singulación descritos en el presente documento, también puede usarse cualquier otro procedimiento de singulación tal como, por ejemplo, corte con láser.

En algunas realizaciones, la oblea o subunidad se singula antes de la biofuncionalización. Los chips individuales pueden luego biofuncionalizarse idénticamente o biofuncionalizarse exponiendo subpoblaciones de los chips a diferentes grupos bioactivos.

IV. Empaquetamiento

Usando los procedimientos descritos en el presente documento, pueden producirse una multiplicidad de chips por el ensamblaje de matrices codificadas al azar de moléculas de sondas presentadas sobre perlas codificadas. Cada chip, cortado de una oblea únicamente identificada, puede contener una o más matrices de perlas codificadas al azar. Este procedimiento de ensamblaje al azar engloba una realización en la que las sondas presentes en perlas sobre chips que contienen matrices codificadas al azar son miembros de bibliotecas de sondas grandes que están presentes sobre chips etiquetados seleccionados de una multiplicidad de obleas. Los chips de diferentes obleas pueden seleccionarse y ensamblarse para formar conjuntos de chips reunidos. Preferentemente, los chips presentan una etiqueta descodificable que identifica la oblea de origen. Las matrices de chips codificadas pueden formarse por ensamblaje al azar sobre una superficie plana en un procedimiento también denominado en el presente documento embaldosado al azar, ilustrado en la fig. 15d. El embaldosado al azar se refiere a un procedimiento de ensamblaje de un conjunto de chips codificados en una disposición o matriz plana de forma que se permita la inspección óptica de cada chip o parte de cada chip dentro del ensamblaje o matriz.

Esta jerarquía de escalas para el ensamblaje al azar desde el nivel de la matriz de perlas hasta el nivel de la matriz de chips proporciona flexibilidad para crear rápidamente matrices de grandes conjuntos de sondas de composición personalizada y alta densidad de rasgos. Tales matrices podrían usarse para presentar un gran conjunto de sondas para el perfilado de expresión génica, o para el perfilado de la metilación de ADN por procedimientos de ensayo conocidos en la técnica. Además, cuando se desea exponer múltiples matrices de sondas a reacciones separadas, un procedimiento de embaldosado al azar de fijar una pluralidad de chips sobre un único soporte como se trata más adelante proporciona un enfoque novedoso rápido y flexible para implementar las estrategias de reunión y desconvolución conocidas en la técnica. Por ejemplo, se producen fácilmente matrices que presentan conjuntos de sondas parcialmente solapantes por construcción y selección adecuada de chips.

Tras el ensamblaje de las matrices de perlas, las obleas se singulan para permitir la manipulación de chips etiquetados individuales. En el embaldosado al azar, los chips etiquetados que se seleccionan de una o más obleas se colocan sobre una superficie (preferentemente proporcionada por un sustrato plano) sobre la cual los chips pueden moverse constantemente para formar un ensamblaje de múltiples chips correspondiente a una disposición deseada. Para facilitar el empaquetamiento compacto, los chips pueden diseñarse para presentar una forma simétrica convexa tal como un cuadrado, triángulo o hexágono. Para reducir la distancia entre matrices de perlas sobre chips adyacentes, los chips pueden diseñarse para presentar formas de interconexión (fig. 14c).

Ensamblaje por deslizamiento

En esta realización, múltiples obleas singuladas se colocan sobre un sustrato grande común presentando los lados las matrices de sondas orientados hacia abajo. En realizaciones preferidas, las matrices de sondas tienen cavidades para prevenir el contacto directo con el sustrato. Uno o más chips se seleccionan al azar de cada oblea y, de un modo similar a monedas deslizantes sobre la parte superior de una mesa, se disponen para formar una matriz de chips deslizando los chips en un área de ensamblaje designada. Este procedimiento puede generalizarse a la manipulación de filas y columnas mostrada en la figura 8. En esta realización, el procedimiento de embaldosado puede monitorizarse y registrarse por instrumentación óptica y de visión de máquina convencionales disponibles para la inspección de semiconductores. Esta instrumentación puede usarse para rastrear chips desde sus obleas de origen respectivas a sus posiciones finales respectivas, permitiendo la codificación y descodificación posicional directa de la matriz de chips ensamblada. Tras completarse el procedimiento de ensamblaje, un soporte de múltiples chips (como se describe en el presente documento) se alinea con una o más matrices de chips dispuestas en el área de ensamblaje y luego se baja y se une a los chips para formar un ensamblaje de múltiples chips. Para facilitar la unión, los soportes pueden recubrirse previamente con adhesivo o pueden recubrirse con materiales magnéticos, si los chips se han convertido en magnetizables mediante procedimientos descritos en el presente documento.

Este procedimiento de ensamblaje por deslizamiento usa preferentemente una punta mecánica, tal como un dispositivo de succión que puede elevar y manejar chips individuales como se conoce en la técnica. Alternativamente, los chips magnetizables se manipulan usando una aguja magnética que puede seleccionar uno o más chips de cada oblea. Las obleas (y los chips contenidos sobre ellas) pueden convertirse en magnetizables por

la deposición de un material magnético tal como níquel o una aleación de níquel-hierro (“permalloy”) por galvanizado o deposición sin corriente eléctrica como se entiende en la técnica, por ejemplo, para semiconductores y cerámicas. Alternativamente pueden introducirse micropartículas paramagnéticas, tanto como una parte de las matrices codificadas al azar de micropartículas que presentan moléculas de sondas o como un rasgo separado, por ejemplo, en forma de una matriz ensamblada en una porción designada de cada chip. La matriz de partículas magnetizables puede estar sobre la cara del chip que contiene la matriz de sondas codificada al azar o sobre la cara opuesta.

El ensamblaje por deslizamiento generalmente implica manejar chips individuales y se vuelve cada vez más difícil a medida que aumenta el número de chips constituyentes en una matriz de chips. Esta situación se agrava si los chips son pequeños, presentando, por ejemplo, dimensiones lineales de 100 μm o menos. Por ejemplo, chips pequeños de forma cúbica o casi cúbica pueden formarse en esta dimensión a partir de sustratos cerámicos. En estas situaciones, los chips individuales se manejan mejor mediante procedimientos conocidos en la técnica para el manejo de micropartículas de vidrio o de polímero de dimensiones similares.

15 Ensamblaje colectivo

En esta realización, chips que se cortan a partir de obleas individuales se almacenan en suspensión en masa usando un tampón de almacenamiento inerte tal como agua de alta pureza que contiene una cantidad traza de azida. Los chips se suspenden por agitación mecánica o magnética. Se forman conjuntos de chips dispensando y mezclando alícuotas de suspensiones seleccionadas. Opcionalmente, una cantidad traza de glucosa u otro componente de alto peso molecular soluble puede añadirse a esta suspensión para aumentar la viscosidad y así mejorar las características de flujo. Entonces, la suspensión se deposita sobre un sustrato plano tanto aplicando puntos de alícuotas discretas usando una jeringuilla, pipeta o tubo capilar para lograr deposición al azar como usando procedimientos continuos conocidos en la técnica para producir matrices de partículas coloidales que incluyen aquellas que aplican la acción de flujo y fuerzas capilares [Adachi, E., y col., Langmuir, vol. 11, 1057-1060 (1995); Science, Vol. 276, 233-235 (1997)].

En el caso de deposición al azar, un molde puede proporcionarse sobre el sustrato para guiar la ubicación de chips individuales y para contenerlos en posiciones designadas sobre el sustrato. En una realización, los chips pueden recogerse de la suspensión mixta insertando una malla en la suspensión y retirándola, de forma que los chips individuales literalmente se elevan o se “vacían”. Preferentemente, los chips, particularmente cuando se ubican sobre un sustrato libre de rasgos plano, se separan entre sí suficientemente de forma que se prevenga el solapamiento parcial y el apilamiento antes de que se “acumulen” en una configuración de empaquetamiento cerrada. La separación se logra, por ejemplo, por ensamblaje por deslizamiento (véase anteriormente) o por agitación mecánica que se aprovecha de la inducción de “modos de tambor” sobre sustratos flexibles tales como sustratos poliméricos, como se pone en práctica en la técnica.

En una realización preferida, los chips se “acumulan” por medios mecánicos, por ejemplo, arrastrando chips en un flujo de fluido dirigido paralelo a la superficie del sustrato en una celda de flujo de sándwich en la que los chips se fuerzan contra una barrera en el extremo lejano de la celda de flujo.

Preferentemente, los chips dentro de un ensamblaje al azar están orientados de manera que expongan la cara activa que presenta matrices de sondas codificadas al azar. En los casos en los que la cara activa no está expuesta, los chips deben invertirse. La inversión de chips en la orientación preferida se logra por ciclos de agitación mecánica y unión de chips correctamente orientados (recubiertos con un adhesivo de unión activada por calor o luz). Alternativamente, la inversión durante la agitación mecánica se ayuda por el desplazamiento del centro de masa hacia la cara no deseada del chip, por ejemplo, por metalización. Los chips magnetizables pueden depositarse en presencia de gradiente de campo magnético alineado perpendicularmente a la superficie del sustrato, proporcionando una sedimentación suficientemente lenta en un medio de alta viscosidad para permitir que los chips adopten la correcta orientación a medida que se aproximan a la superficie.

La inversión también se facilita produciendo formas tridimensionales tales como una forma piramidal, orientándose la punta de la pirámide en la dirección opuesta a la superficie activa, como se produce por procedimientos de grabado de semiconductores convencionales.

Los chips pueden empaquetarse en empaquetamientos de un único o múltiples chips. En un empaquetamiento de múltiples chips, los chips que contienen diferentes matrices de biosondas se colocan sobre el mismo soporte. La figura 8 muestra cuatro chips empaquetados juntos para formar un chip de combinación cuadrado o un chip de combinación lineal. Los cuatro chips pueden unirse con pegamento a un soporte común tal como un portaobjetos de vidrio, o pueden unirse a un soporte por otros procedimientos tales como unión de materiales magnéticos sobre la cara trasera de los chips de manera que se peguen a un soporte magnético. El manejo de chips no se limita a usar equipo de recogida y colocación. Los chips pueden agruparse en filas o columnas después de la singulación. Estas filas y columnas de chips pueden moverse por barras de confinamiento. La figura 9 muestra que disponiendo selectivamente diferentes filas de chip pueden obtenerse diferentes combinaciones de chips.

Otro diseño de empaquetamiento se muestra en la figura 10. Cuatro chips con matrices sobre las esquinas pueden

combinarse para formar un chip con una matriz más grande en el centro. Si las matrices sobre los cuatro chips comprenden distintas sondas funcionales, la matriz grande contendrá cuatro veces más información que un único chip.

5 Puede producirse una multiplicidad de chips por el ensamblaje de matrices codificadas al azar de sondas que están presentes sobre perlas. Cada chip puede incluir una o más matrices de perlas codificadas al azar y pueden cortarse a partir de una oblea únicamente identificada. En otra realización, los chips que contienen matrices codificadas al azar de sondas sobre perlas pueden ser miembros de bibliotecas de sondas. En esta realización, cada chip en una matriz de múltiples chips presenta una etiqueta descodificable que identifica la oblea de origen.

10 Puede usarse una superficie de vidrio en forma de un portaobjetos u otra superficie similar para preparar un soporte de múltiples chips. Para preparar el portaobjetos como soporte, un recubrimiento, tal como Teflon™, puede aplicarse de tal forma que deje aberturas circulares o pocillos (es decir, áreas de vidrio sin ninguna cobertura de teflón). Cada pocillo es un círculo con 6,5 mm de diámetro. Uno o más chips pueden unirse en la superficie de vidrio dentro de un pocillo. Un portaobjetos de vidrio típico tiene 25 x 75 mm y 1 mm de espesor, con una matriz 2 x 5 de pocillos. Con tamaños de chips típicos de 1,75 x 1,75 mm, hasta cuatro chips pueden unirse a la superficie de vidrio en cada pocillo. Cada chip en el mismo pocillo puede tener distintos grupos de perlas que se ensamblaron antes de unirse al soporte. Por ejemplo, si cada chip tiene una matriz que contiene 39 tipos de grupos de perlas, un pocillo con 4 chips distintos tendría un total de $4 \times 39 = 156$ tipos de perlas. Por otra parte, para chips más grandes (por ejemplo, un cuadrado de 4,5 x 4,5 mm), un pocillo entero se ocupa por un único chip. Para las dimensiones de pocillos descritas en el presente documento, cada pocillo puede contener hasta 40 μ l de líquido (normalmente una disolución acuosa). Típicamente, un volumen de 20 μ l de disolución de muestra se añade a cada pocillo para reacciones biológicas, de forma que cada chip se cubre totalmente por la disolución de muestra. Debido a que el recubrimiento de teflón fuera de los pocillos es hidrófobo, las muestras acuosas no se vierten. El formato de un portaobjetos de soporte puede diseñarse para ajustarse a ciertas aplicaciones. Por ejemplo, una única fila de 8 pocillos sobre un portaobjetos puede usarse para analizar 8 muestras. Además, puede usarse una matriz de 4 x 8 pocillos para analizar 32 muestras. Similarmente, pueden disponerse más pocillos (por ejemplo, 96, 384 y 1536) sobre un único portaobjetos para analizar más muestras.

30 En ciertas realizaciones de un soporte de chips móvil, los chips están unidos a un sustrato tal como vidrio, acero inoxidable, materiales de plástico, silicio o materiales cerámicos. La unidad de soporte completa es móvil y puede transportarse durante el procesamiento para exponer los chips a diferentes medios de reacción, tales como cámaras de reacción, cámaras de lavado y etapas de lectura de señales.

35 En otras realizaciones, el soporte de chips móvil comprende una cámara o cámaras en las que los chips están asegurados. Alojando los chips dentro del soporte de chips móvil puede minimizarse la contaminación durante el transporte. En ciertas realizaciones, la cámara o cámaras del soporte de chips móvil también sirven de entorno de procesamiento. Pueden admitirse gases reactivos o disoluciones líquidas para diversos fines, tales como realizar un bioensayo o limpiar los chips, en la cámara y posteriormente evacuarla, si se desea. Adicionalmente, el soporte de chips móvil puede poseer medios para cambiar las propiedades termodinámicas de la cámara, tales como la presión o temperatura de la cámara.

V. Ensayos

45 Los biochips que comprenden matrices de perlas son útiles para llevar a cabo diversos ensayos bioanalíticos y químicos. Una vez ensambladas pueden obtenerse imágenes de las matrices de perlas sobre los biochips para registrar señales de ensayo y pueden descodificarse para identificar analitos diana unidos a las sondas asociadas a perlas individuales dentro de la matriz. La matriz de perlas proporciona un sistema que puede usarse para leer los resultados de secuencias de ensayo bioanalíticos o químicos de múltiples etapas. Además, múltiples analitos diana pueden detectarse simultáneamente debido a la presencia de una pluralidad de sondas dirigidas a diferentes analitos diana que comprenden las matrices. Además de proporcionar la capacidad para detectar la presencia o ausencia de analitos diana específicos, las matrices de perlas también encuentran aplicabilidad en la determinación de constantes de afinidad para los analitos diana que se unen a las sondas. Por tanto, los biochips tienen una amplia aplicabilidad para detectar, por ejemplo, biomoléculas tales TNF-alfa y 11-6. Otras aplicaciones no limitantes incluyen genotipado por análisis de polimorfismos; análisis de expresión génica; perfilado multiplexado cuantitativo de la expresión de citocinas, análisis de genes y productos génicos dentro de la misma muestra de fluido; huella genética por afinidad; y análisis multiplexado de la cinética de reacción. Otros ensayos y determinaciones analíticas tales como aquellas citadas en la patente de Estados Unidos n.º 6.327.410, pueden adaptarse para su uso con los biochips.

60 Ejemplos

Las presentes enseñanzas se entenderán mejor a partir de los ejemplos que siguen. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará fácilmente que los procedimientos y resultados específicos tratados son meramente ilustrativos de la invención descrita en las reivindicaciones que siguen después.

Ejemplo 1: Fabricación de obleas y diseño de chips que comprenden matrices de perlas

El procedimiento de fabricación del chip que comprende una matriz de perlas, como se muestra en la figura 4, se describe en la figura 11. El sustrato era una oblea de silicio de 100 mm de diámetro, 0,5 mm de espesor, con orientación cristalina de (100), dopada con fósforo tipo n. Un intervalo de resistividad adecuado para estas obleas es 1,5 - 4 Ω -cm. Las obleas se fabricaron normalmente en lotes de hasta 25. La primera etapa comprende el crecimiento de SiO₂. Las obleas se limpiaron primero por el procedimiento de limpieza RCA que comprende las etapas de (1) poner en remojo las obleas en una mezcla de NH₄OH:H₂O₂ (30%):H₂O en una relación de volumen de 1:1:5 a 75°C durante 10 minutos; (2) aclarar con una limpieza en lotes de agua en cascada usando 18 M Ω -cm de agua; (3) poner en remojo las obleas en una mezcla de HCl (36%):H₂O₂ (30%):H₂O en una relación de volumen de 1:1:5 a 75°C durante 10 minutos; y (4) aclarar con una limpieza en lotes de agua de flujo en cascada hasta que el agua en el baño fue al menos 16 M Ω -cm. Las obleas se secaron por centrifugación antes de colocarse en un horno horizontal para el crecimiento de SiO₂. Las obleas se colocaron verticalmente sobre una navicilla de cuarzo y se introdujeron a un horno de oxidación a 1050°C que tenía O₂+HCl (4%) a una presión de 760 torr (0,1 MPa). El tiempo de oxidación fue de 34 minutos. Se obtuvo una capa uniforme de 1.000 Å de SiO₂ por este procedimiento, como se verificó usando elipsometría (índice de refracción: n=1,46, variación de espesor: <5%).

Las obleas con SiO₂ se recubrieron por centrifugación con resina fotosensible (Shipley 1813) a una tasa de centrifugación de 4000 rpm (tiempo de centrifugación de 30 segundos), luego se hornearon sobre una placa caliente a 115°C durante 60 segundos para eliminar el disolvente. Entonces, la oblea se expuso a luz UV (365-405 nm) en una etapa de litografía de contacto que usó el alineador de máscara de contacto/proximidad 3HR del sistema de Hybrid Technology Group (HTG). Tras la exposición a UV, la oblea se reveló por el revelador AZ300 MIF durante 60 segundos, se aclaró en agua DI y se secó por soplado con una corriente de nitrógeno seco comprimido. Entonces, las obleas se sumergieron en decapante de óxido tamponado (mezcla 6:1 de fluoruro de amonio y de fluoruro de hidrógeno acuoso al 50%) durante 2 minutos para decapar el SiO₂ sobre el área expuesta (la estrella en la figura 11). Las obleas se aclararon posteriormente con agua DI, luego se pusieron en remojo en el eliminador de resina fotosensible 1165 Microposit a 60°C durante 60 minutos para eliminar la resina fotosensible. Entonces, las obleas se aclararon en agua DI y se secaron por soplado con el chorro de nitrógeno comprimido seco. Este procedimiento entero produce obleas con una capa de óxido modelada.

Tras la etapa de modelado del óxido, las obleas se limpiaron por el procedimiento de RCA y luego se dispusieron en un horno horizontal para la deposición de nitruro de silicio (Si₃N₄). Pueden usarse dos tipos de nitruro de silicio: nitruro convencional y de baja tensión. Las condiciones para la deposición son del siguiente modo: nitruro LPCVD (convencional), presión = 200 mtorr (0,3 hPa), temp = 800°C, SiC₁₂H₂ = 30 sccm, NH₃ = 90 sccm; nitruro LPCVD (baja tensión): presión = 150 mtorr (0,2 hPa), temp = 850°C, SiC₁₂H₂ = 47sccm, NH₃ =10 sccm. Después de 2 a 3 minutos de deposición, el espesor de la película de Si₃N₄ es entre 60-90 Å.

La siguiente etapa es fabricar las estructuras de matriz. Las obleas se recubrieron por centrifugación con resina fotosensible OCG 12i a una tasa de centrifugación de 4000 rpm (tiempo de centrifugación de 30 segundos) y luego se hornearon sobre una placa caliente a 90°C durante 60 segundos para eliminar el disolvente. Las obleas se expusieron a luz UV (365 nm) y se realizó litografía repetida usando un fotorrepetidor de línea i 10x GCA-6300. Después de la exposición, la oblea se horneó sobre una placa caliente a 115°C durante 90 segundos antes de revelarse por el revelador AZ300 MIF durante 60 segundos, aclararse en agua DI y secarse por soplado con corriente de nitrógeno seco comprimido. Las obleas se hornearon en un horno de 90°C durante 20 minutos. Entonces, las obleas se grabaron en un grabador Plasma Therm 72 para eliminar el nitruro de silicio en el área expuesta (los rasgos hexagonales en las matrices) usando grabado con iones reactivos del gas CF₄. Luego se usó grabado con iones reactivos de oxígeno para eliminar material polimérico residual sobre los rasgos hexagonales. Las cavidades hexagonales se fabricaron por grabado por iones reactivos profundos (DRIE) usando un grabado de silicio profundo Unaxis SLR 770 ICP (procedimiento de flúor de Bosch autorizado). El procedimiento se ajustó de manera que durara 2-3 minutos para grabar cavidades de 3,8 micrómetros de profundidad. El control de la profundidad está dentro de 0,3 micrómetros. Después del grabado, las obleas se pusieron en remojo en eliminador de resina fotosensible 1165 Microposit a 60°C durante 60 minutos para eliminar la resina fotosensible. Las obleas se aclararon en agua DI y se secaron por soplado con un chorro de nitrógeno comprimido seco. Entonces, las obleas se procesaron en un separador de resina fotosensible posconectado GaSonic, Aura 1000, por plasma de oxígeno durante 90 segundos para eliminar cualquier polímero residual dentro de las cavidades hexagonales generadas durante el procedimiento de DRIE. Entonces, las obleas se recubrieron por centrifugación con un recubrimiento de resina fotosensible protectora (Shipley 1813, tasa de centrifugación de 4000 rpm, tiempo de centrifugación de 30 segundos), luego se hornearon sobre una placa caliente a 115°C durante 60 segundos para eliminar el disolvente. Las obleas se enviaron a un vendedor comercial para el recubrimiento de la cara trasera de 500 Å de oro con 100 Å de cromo como capa de adhesión. Las caras traseras de las obleas se separaron de la capa de óxido de silicio nativo inmediatamente antes del procedimiento de recubrimiento usando pulverización con iones argón.

Las obleas fabricadas se cortaron con sierra sobre la superficie para definir cada chip (dimensiones de cada chip, cuadrado de 1,75 x 1,75 mm). La profundidad de los cortes fue 2/3 del espesor de las obleas. Después de cortar con sierra, las obleas se limpiaron poniéndolas en remojo en el eliminador de resina fotosensible 1165 Microposit a 60°C durante 60 minutos para eliminar la resina fotosensible, luego aclarando en agua DI y secando por soplado con una

corriente de nitrógeno seco comprimido. Normalmente, las obleas se pusieron luego en remojo en NanoStrip (una mezcla de ácido sulfúrico concentrado y peróxido de hidrógeno) a 60°C durante 2 horas, luego se aclararon en agua DI y se secaron por soplado con una corriente de nitrógeno seco comprimido. Después de estos procedimientos, las obleas están listas para la etapa de ensamblaje de perlas.

Después del ensamblaje de perlas pueden eliminarse las perlas adicionales que no se aseguran en cavidades. Un procedimiento para eliminar perlas sin asegurar es limpiar el chip o superficie de la oblea con aplicadores de algodón humedecidos. Otro procedimiento es lavar las perlas sin asegurar usando chorros de agua casi paralelos al chip o superficie de la oblea. Todavía otro procedimiento comprende hacer crecer un gel sobre la superficie y posteriormente desprender el gel.

Ejemplo 2: Funcionalización de perlas y formación de una matriz de perlas

Perlas funcionalizadas con tosilo codificadas por color de 3,2 μm de diámetro se usaron como soportes de fase sólida. Se generaron varios conjuntos de códigos de color distinguibles por tinción de partículas usando procedimientos convencionales (Bangs. L. B., "Uniform Latex Particles", Seragen Diagnostics Inc., p. 40). Las perlas teñidas se funcionalizaron con neutravidina (Pierce, Rockford, IL), una proteína de unión a biotina, para mediar en la inmovilización de sondas o cebadores biotinilados. En una reacción de acoplamiento a pequeña escala típica, 200 μl de suspensión que contenía 1% de perlas se lavaron tres veces con 500 μl de tampón fosfato 100 mM/pH 7,4 (tampón A) y se resuspendieron en 500 μl de ese tampón. Después de aplicar 20 μl de neutravidina 5 mg/ml a la suspensión de perlas, la reacción se dejó avanzar durante la noche a 37°C. Entonces, las perlas acopladas (es decir, perlas con moléculas biofuncionales unidas a las mismas) se lavaron una vez con 500 μl de PBS/pH 7,4 con BSA 10 mg/ml (tampón B), se resuspendieron en 500 μl de ese tampón y se hicieron reaccionar durante 1 hora a 37°C para bloquear sitios sin reaccionar sobre la superficie de la perla. Después del bloqueo, las perlas se lavaron tres veces con tampón B y se guardaron en 200 μl de ese tampón.

Las sondas (para la detección de moléculas diana) y cebadores (que pueden usarse como moldes para extender la diana de ADN hibridada para las posteriores reacciones catalíticas para identificar las sondas reaccionadas) que iban a acoplarse a las perlas se biotinilaron en el extremo 5'; un ligador de trietilenglicol de 15 carbonos se insertó entre la biotina y el oligonucleótido para minimizar los efectos disruptivos de la inmovilización superficial en las reacciones posteriores. Para cada cebador se realizó una reacción de unión usando 50 μl de suspensión de perlas. Las perlas se lavaron una vez con 500 μl de Tris 20 mM/pH 7,4, NaCl 0,5 M (tampón C) y se resuspendieron en 300 μl de ese tampón. Una disolución de cebador (2,5 μl de una disolución 100 μM) se añadió a la suspensión de perlas y se dejó que reaccionaran durante 30 minutos a temperatura ambiente. Entonces, las perlas se lavaron tres veces con Tris 20 mM/pH 7,4, NaCl 150 mM, Triton al 0,01% y se almacenaron en Tris 20 mM/pH 7,4, NaCl 150 mM.

Una matriz de perlas a modo de ejemplo se ensambló del siguiente modo. La suspensión de perlas obtenida mediante los procedimientos descritos anteriormente se lavó con agua desionizada (toda el agua usada era altamente purificada y se esterilizó con una resistividad de 18 $\text{M}\Omega\text{-cm}$ o superior) cinco veces antes de suspenderse en disolución 0,01 mM de base TRIS + Triton al 0,01% x-100 de agua. El contenido de perlas de la suspensión fue de 0,5%. Se añadieron dos microlitros de la suspensión de perlas a la superficie de un chip cuadrado de 4,5 mm que comprendía una matriz de perlas por micropipeta. Entonces, el chip se sometió al procedimiento de LEAPS. El electrodo de contador fue un trozo de vidrio recubierto por una capa de óxido de indio y estaño (ITO). El hueco entre la superficie del chip y el vidrio recubierto con ITO fue de 100 micrómetros. Se aplicó alimentación de CA en la secuencia enumerada en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencia de suministro de CA. El voltaje es la mitad de la amplitud pico a pico.

Etapas	Tiempo (minutos)	Frecuencia (Hz)	Voltaje (\pm voltios)	Función
1	2	2000	3	CA encendida
2	2	1000	3	CA encendida
3	2	500	3	CA encendida
4	2	2000	3	CA encendida
5	2	500	3	CA encendida
6	2	2000	3	CA encendida
7	2	200	3	CA encendida
8	2	2000	3	CA encendida
9	2	200	3	CA encendida
10	0	200	0	CA parada

Después de completarse la secuencia, las perlas dentro del área abarcada por el patrón con forma de estrella se concentraron en el área de matriz. El patrón de flujo inducido por la presencia del patrón con forma de estrella ayuda a concentrar las perlas. Después de esperar 15 minutos para que las perlas sedimentaran, el dispositivo se dejó remojar lentamente en agua pura. El recubrimiento de vidrio de ITO se elevó lentamente y el agua se drenó lentamente de manera que emergiera la superficie del chip. En este momento, la superficie podía secarse tanto

dejando el chip a temperatura ambiente durante un periodo extendido como horneando el chip en un horno a 55°C durante 5 minutos. El chip secado se dejó remojar en agua pura durante 15 minutos, y la superficie del chip se limpió luego suavemente varias veces con un hisopo de algodón húmedo para eliminar las perlas que no estuvieran en la matriz. El chip se aclaró posteriormente tres veces con agua pura antes de secarse soplando nitrógeno comprimido sobre sus superficies. Finalmente, el chip se inspeccionó por microscopía de luz de fluorescencia para garantizar que no estuvieran perlas adicionales fuera de la matriz.

Ejemplo 3: Formación de una matriz de perlas

Una suspensión de perlas se dispuso directamente sobre el área de matriz sobre un chip. Se usó un aplicador de algodón húmedo (K1) para agitar suavemente la suspensión de perlas sobre la superficie de la matriz. El movimiento de K1 puede ser circular, lineal o de algún otro modo significativo, y es normalmente paralelo a la superficie del chip. Después de agitar la suspensión varias veces, las perlas se movieron a la matriz. Entonces, la superficie del chip se limpió usando K1 para retirar las perlas adicionales que no estuvieran en la matriz. Este procedimiento puede ampliarse de chips individuales al ensamblaje de múltiples chips a escala de obleas, y puede automatizarse.

Un ejemplo de un procedimiento de procesamiento para formar matrices de perlas es del siguiente modo. Se usaron dos microlitros de micropartículas al 1% (aproximadamente 3,2 micrómetros de diámetro) en 100 microlitros de solución salina tamponada con fosfato (también conocida como PBS: NaCl 150 mM; NaP 100 mM, pH 7,2) para el ensamblaje de ocho matrices de micropartículas sobre chips de silicio (2,5 x 2,5 mm) con 4.000 micropocillos sobre cada chip. Se usaron los siguientes procedimientos:

(1) Se recogieron micropartículas de PBS en un tubo de centrifuga de 1,5 ml por centrifugación (14.000 g, 1 minuto). Pueden usarse otros medios de recogida.

(2) El sobrenadante se desechó por aspiración usando una pipeta de transferencia.

(3) Las partículas se resuspendieron en 5 microlitros de glicerol al 5% en Tris 10 mM a pH 7,5.

(4) Las partículas se recogieron de la disolución de glicerol por centrifugación. Pueden usarse otros medios de recogida.

(5) La disolución de glicerol se aspiró a partir de los sedimentos de partículas.

(6) Los sedimentos se resuspendieron en 1 microlitro de glicerol al 5%, Tris 10 mM, pH 7,5.

(7) Se colocaron ocho chips de silicio sobre una cinta de doble cara unida sobre un portaobjetos de microscopio.

(8) Un volumen de 0,1 microlitros de la suspensión de partículas se pipeteó sobre cada uno de los chips en el área con 4.000 micropocillos.

(9) Un aplicador de algodón se lavó con agua de un frasco lavador.

(10) El aplicador de algodón húmedo se secó por soplado durante 30 segundos usando aire presurizado. El flujo de aire elimina el agua en exceso del algodón del aplicador. Además, el aire también sopla algunas fibras de la superficie, que hace la bola de algodón más acolchada.

(11) Debido a la evaporación de la suspensión de perlas en el aire y la naturaleza higroscópica del glicerol en la disolución, para cuando las etapas 9 y 10 se completaron (aproximadamente 1-2 minutos), el contenido de agua en la suspensión de la etapa 8 alcanzó el equilibrio. Debido al aumento de la viscosidad, la gotita se convirtió en una suspensión. Para ensamblar matrices de micropartículas, la suspensión de perlas se agitó suavemente varias veces con la punta del aplicador de algodón húmedo en un movimiento circular. Las fibras sueltas de la bola de algodón transportaron las perlas a los micropocillos sobre la superficie (Figura 3).

(12) La ocupación de las partículas de los micropocillos se examinó usando un microscopio fluorescente. Si la ocupación no es satisfactoria, la etapa 11 puede repetirse.

(13) Las partículas en exceso se retiraron suavemente del chip usando el aplicador de algodón. Para evitar agua en exceso sobre la superficie, el aplicador de algodón no se presionó contra el chip.

(14) El chip se secó soplando sobre la superficie del chip con nitrógeno comprimido.

(15) La micropartícula ensamblada preparada mediante este procedimiento puede usarse para ensayos o almacenarse en disolución a 4°C para uso posterior.

En este ejemplo, las micropartículas se suspenden en una pequeña cantidad de glicerol al 5%, disolución Tris 10

mM a pH 7,5 para la deposición directa de matrices de micropartículas sobre el chip de silicio. Sin embargo, mientras las partículas pueden suspenderse en otras disoluciones, si LEAPS se usa para ensamblar las perlas, la alta viscosidad o concentración iónica de la disolución puede interferir con LEAPS (por ejemplo, con el ensamblaje de partículas sobre áreas designadas de un sustrato tal como un electrodo modelado o iluminado). Por consiguiente, se recomienda que la concentración iónica de la suspensión sea de aproximadamente 1,0 mM o inferior, preferentemente entre aproximadamente 0,1 mM y 1,0 mM. Además, se recomienda que la viscosidad de la suspensión sea aproximadamente 100 cp o menos.

Además, ciertas sales, tales como fosfato de sodio y cloruro sódico, pueden formar cristales a las elevadas concentraciones que se producen durante la etapa 11. Tales cristales pueden interferir con biomoléculas sobre las superficies de las perlas. Por consiguiente, no se recomiendan para su uso en suspensiones de perlas.

Ejemplo 4: Deposición directa

El procedimiento de deposición directa desvelado en la presente solicitud es un simple enfoque para ensamblar eficazmente matrices de micropartículas sobre una superficie sólida. Por ejemplo, un volumen de 0,25 microlitros de disolución de micropartículas al 1% (10 mg/ml, que se corresponde con 168.000 perlas) es suficiente para el ensamblaje de matrices sobre un chip de silicio que contiene 4.000 micropocillos con más del 95% de ocupación. En otras palabras, se necesita aproximadamente el 2% de las perlas en suspensión para llenar los micropocillos en la superficie. Además, el procedimiento de ensamblaje se lleva a cabo en disolución de agua a pH neutro, a temperatura ambiente. Estas condiciones suaves aseguran que la reactividad de moléculas tales como ADN, ARN, péptidos y proteínas, cuando se inmovilizan sobre las partículas, permanezca invariable en el ensamblaje. De esta forma, las matrices de micropartículas ensambladas usando este procedimiento son compatibles con diversos ensayos bioquímicos. Además, el procedimiento de ensamblaje puede ampliarse del ensamblaje de un único chip al ensamblaje a escala de obleas y puede automatizarse para producir grandes números de matrices de micropartículas.

El procedimiento de deposición directa se ilustra adicionalmente por el siguiente ejemplo. Un volumen de 2 microlitros de una disolución de micropartículas al 1% (micropartículas de aproximadamente 3,5 micrómetros de diámetro) se añadieron a 100 microlitros de solución salina tamponada con fosfato (también conocida como PBS: NaCl 150 mM; NaP 100 mM, pH 7,2) para formar ocho matrices de micropartículas sobre chips de silicio (2,5 x 2,5 mm) con 4.000 micropocillos sobre cada chip. El procedimiento fue del siguiente modo:

(1) Se recogieron micropartículas de PBS en un tubo Eppendorf por centrifugación (14.000 g, 1 minuto). Pueden usarse otros medios de recogida.

(2) El sobrenadante se desechó por aspiración usando una pipeta de transferencia.

(3) Las partículas se resuspendieron en 5 microlitros de glicerol al 5% en Tris 10 mM a pH 7,5.

(4) Las partículas se recogieron de la disolución de glicerol por centrifugación. Pueden usarse otros medios de recogida.

(5) La disolución de glicerol se aspiró de los sedimentos de partículas.

(6) Los sedimentos se resuspendieron en 1 microlitro de disolución de glicerol al 5%, Tris 10 mM, pH 7,5.

(7) Ocho chips de silicio se colocaron sobre una cinta de doble cara unida a un portaobjeto de microscopio.

(8) Se pipeteó un volumen de 0,1 microlitros de la suspensión de partículas sobre cada uno de los chips en el área con 4.000 micropocillos.

(9) El aplicador de algodón se lavó con agua de un frasco lavador.

(10) El aplicador de algodón húmedo se secó por soplado durante 30 segundos usando aire presurizado. El flujo de aire elimina el agua en exceso del aplicador del algodón. Además, el aire también sopla algunas fibras de la superficie, que hace la bola de algodón más acolchada.

(11) Debido a la evaporación de la suspensión de perlas en el aire y la naturaleza higroscópica del glicerol en la disolución, para cuando las etapas 9 y 10 se terminaron (1-2 minutos), el contenido de agua en la suspensión de la etapa 8 alcanzó el equilibrio. Debido al aumento de la viscosidad, la gotita se convierte en una suspensión. Para ensamblar matrices de micropartículas, la suspensión de perlas se agitó suavemente varias veces con la punta del aplicador de algodón húmedo en un movimiento circular. Las fibras sueltas de la bola de algodón transportarán las perlas a los micropocillos sobre la superficie.

(12) La ocupación de las partículas de los micropocillos se examinó usando un microscopio fluorescente. La etapa

11 se repitió en casos en los que la ocupación no fue satisfactoria.

(13) Las partículas en exceso se retiraron suavemente del chip usando el aplicador de algodón. Para evitar agua en exceso sobre la superficie, el aplicador de algodón no se presionó contra el chip.

(14) Después de la etapa 13, las matrices de micropartículas ensambladas estuvieron listas para ensayos, o para almacenamiento en disolución a 4°C para uso posterior.

Para ensamblar matrices usando deposición directa es útil usar micropartículas suspendidas en una pequeña cantidad de glicerol al 5%, disolución Tris 10 mM a pH 7,5: El uso de glicerol concentrado (es decir, superior al 5%) puede aumentar la viscosidad de la suspensión de perlas, y la gravedad específica de la disolución en la gotita sobre el chip (etapa 11). A su vez, esto puede comprender la eficacia del ensamblaje. Aunque la disolución usada para el procedimiento de deposición directa no se limita a Tris 10 mM, pH 7,5, debe observarse que ciertas sales, tales como fosfato de sodio y cloruro sódico, tienden a formar cristales en concentraciones elevadas tales como en la etapa 11. Los cristales de sales no sólo sirven para reducir la ocupación de las micropartículas en los pocillos, sino que también pueden dañar moléculas sobre la superficie durante el ensamblaje.

También se recomienda almacenar los chips ensamblados u obleas que comprenden chips en una cámara húmeda durante un corto periodo de tiempo (por ejemplo 30 min) para permitir que las perlas sedimenten en las cavidades por gravedad antes de usarse en un ensayo. La centrifugación de matrices ensambladas unidas a un portaobjetos de vidrio puede facilitar el procedimiento de sedimentación. Los parámetros recomendados para la centrifugación son del siguiente modo:

Centrífuga:	Centrífuga Sorvall modelo RT6000B
Rotor:	Cubeta oscilante Sorvall modelo H1000B
Velocidad:	2000 rpm
Tiempo:	5 min
Nota de operación:	Poner la centrífuga en modo refrigerado a 10°C Poner el freno en modo apagado Ralentizar la rampa hasta la velocidad de 0 a 2000 en los primeros 2 mM seguido de centrifugación a 2000 rpm durante 5 min adicionales Pueden usarse equipo y parámetros equivalentes para este procedimiento.

Los medios de inmersión viscosos son útiles para montar los chips sobre el portaobjetos para examen en microscopio. Un ejemplo es usar medios de montaje que contienen cloruro de tetraetilamonio 2,25 M, Tris 37,5 mM, pH 8,0, glicerol al 25%.

Ejemplo 5: Ensamblaje en paralelo de matrices de biochips

Se proporcionan procedimientos para el ensamblaje en paralelo de matrices de biochips. En esta realización, las matrices de biochips se forman a partir de chips que se originan a partir de diferentes obleas. Un ejemplo no limitante se ilustra por la figura 9, que muestra cuatro obleas diferentes que dan lugar a cuatro tipos de chips: A, B, C y D. Las filas o columnas de chips pueden combinarse en cualquier geometría para formar una matriz de chips intermedia. En realizaciones preferidas, los chips tienen una forma geométrica regular (por ejemplo, un cuadrado o rectángulo) y la matriz de chips intermedia correspondiente también tiene una forma geométrica regular. Entonces, las filas o columnas se sacan de la matriz de chips intermedia, de forma que las filas o columnas comprendan diferentes tipos de chips. Dependiendo de la aplicación, las filas o columnas mezcladas pueden contener más de una copia de un cierto tipo de biochip. Las filas y/o columnas mezcladas formadas en estas realizaciones pueden incorporarse en matrices de biochips para bioensayos. En realizaciones preferidas, el equipo de manejo de chips semiconductores se usa para ensamblar la matriz de chips intermedia y para extraer las filas o columnas mezcladas. Usando filas o columnas largas de chips para formar la matriz de chips intermedia es posible generar simultáneamente muchas filas o columnas mezcladas. De esta forma, es posible producir a gran escala las filas o columnas mezcladas.

Ejemplo 6: Protección de biochips por recubrimiento de sacáridos

Se ensamblaron perlas funcionalizadas sobre un chip usando procedimientos convencionales. Tras el ensamblaje, la superficie del chip se limpió, y 2-4 µl de disolución de trehalosa al 1% (alfa-D-glucopiranosil-alfa-D-glucopiranosido, un disacárido formador de vidrio que se produce naturalmente) en agua DI se dispensaron sobre el chip (dimensión superficial: 1,75 x 1,75 mm) y se dejó que se secaran bajo condiciones ambientales. En el secado se formó una película vítrea sobre el sustrato y encapsuló las perlas ensambladas. Aunque la película es estable incluso bajo condiciones de alta humedad, la exposición a agua líquida disuelve la película al instante.

Para evaluar el efecto de la formación de película sobre la actividad de las partículas funcionalizadas, partículas

funcionalizadas con neutravidina se ensamblaron sobre biochips. Algunos biochips se pasivaron con disolución de trehalosa como se ha descrito anteriormente y se sometieron a condiciones ambientales normales mientras que otros biochips no se recubrieron con disolución de trehalosa pero, en su lugar, se almacenaron a 4°C durante 2 semanas. Se encontró que la bioactividad de los chips biorrecubiertos fue similar a la de los biochips no recubiertos mantenidos a 4°C.

Ejemplo 7: Hidrogeles como agentes multifuncionales en la limpieza, almacenamiento de obleas y recuperación de partículas

Puede emplearse hidrogel de agarosa como agente de desprendimiento para eliminar las partículas de un chip de un modo que permita recuperarlas después. El hidrogel también puede usarse como material de almacenamiento para prevenir la deshidratación y el polvo de la oblea y partículas.

Las partículas funcionalizadas se ensamblaron sobre una oblea de 6 pulgadas (15,24 cm) comprendida por chips. Para limpiar las partículas que quedan sobre la superficie, una disolución de agarosa al 1% a 55°C (punto de fusión 95°C, temperatura de gelación 50°C) se vertió sobre la oblea, y se mantuvo bajo condiciones ambientales o a 4°C hasta que se produjo la gelación. Los geles con diferente espesor, de micrómetros a milímetros, pueden producirse usando separadores de diferente espesor. Los separadores proporcionan una barrera en el borde de la oblea para prevenir que la disolución de agarosa se vierta del borde. Las perlas localizadas sobre la superficie de la oblea, en vez de dentro de las cavidades, se incorporarán en el gel. Después de solidificarse completamente la disolución, la película de gel, además de las perlas incorporadas, puede desprenderse fácilmente. Entonces se aplica inmediatamente una corriente de nitrógeno comprimido para secar por soplado la pequeña cantidad de residuo de agua sobre la superficie. De esta forma, la superficie de la oblea permanece limpia.

Para evaluar el efecto del procedimiento de desprendimiento sobre la ocupación, además del efecto de la película del gel de agarosa sobre la actividad de las partículas funcionalizadas, las partículas se ensamblaron sobre los chips y los chips se sometieron luego a análisis de descodificación y ensayos de extensión. La Figura 12 mostró que los procedimientos de desprendimiento no disminuyeron la ocupación (es decir, no se extrajeron partículas de las cavidades). Se cree que la viscosidad de la disolución de gel desempeña una función en el mantenimiento de las partículas dentro de los orificios. Con mayores viscosidades de la disolución de gel, la tendencia de la disolución a ir a la cavidad antes de la gelación disminuye, por lo que hay menor probabilidad de que la ocupación se afecte. Un ensayo de SSP sobre chip indicó que la señal y CV fueron comparables (figura 13ab), que indica que el gel no afecta la sensibilidad del ensayo.

El gel de agarosa es un hidrogel físicamente reticulado termorreversible. Con el fin de la recuperación de partículas debe usarse agarosa con punto de fusión ultra bajo (p.f. < 50°C, temperatura de gelación, 8-17°C). Posteriormente, el gel de agarosa puede volver a fundirse a 50-55°C, y las partículas incorporadas pueden recuperarse. Las actividades biológicas de biomoléculas sobre las partículas se retienen bajo estas condiciones.

Tales hidrogeles hidrófilos no sólo pueden usarse como agente de desprendimiento, sino también como agente de almacenamiento para prevenir la deshidratación, polvo y daño físico de partículas/obleas durante el almacenamiento y el transporte.

EJEMPLO 8: Recubrimiento de polímero

Un lote pequeño de chips individuales limpiados [aproximadamente de 5 a 20 en número] se colocaron en un recipiente de teflón pequeño (volumen ~5 ml) llenado con 1 ml de una disolución de clorhidrato de polialilamina (PM ~15.000) al 1% (1 mg/ml) o una disolución de polilisina al 0,1% (Sigma Aldrich). Los chips se incubaron durante 1-2 h con agitación suave a temperatura ambiente. Después se sacaron de la disolución de polímero y se secaron durante ~1 h en el intervalo de temperatura de 50-70°C. Este tratamiento normalmente deja una película de recubrimiento gruesa e irregular del polímero sobre la superficie del chip. Estos chips modificados se usaron para ensamblar perlas usando protocolos convencionales. La etapa de limpieza de la superficie al final del procedimiento de ensamblaje eliminó la mayoría del polímero en exceso junto con las perlas en exceso. La presencia del recubrimiento de polímero mejoró la adhesión de las perlas a la superficie del chip y la retención de las perlas en las cavidades mejoró considerablemente después de un tratamiento tal.

Ejemplo 9: Empaquetamiento de biochips para formar soportes de múltiples chips para ensayos biológicos y adición a matrices de perlas y procedimientos de preparación de los mismos

El tipo de empaquetamiento elegido para un biochip particular depende de la aplicación. Normalmente, uno o más biochips se fijan sobre un soporte de chip por comodidad. Los soportes pueden ser tan simples como portaobjetos de vidrio, o pueden ser complicados cartuchos con manejo fluido, control de temperatura, registro de señales y otras funciones. Los biochips pueden unirse al soporte permanentemente por pegamento o unirse reversiblemente por diversos medios tales como fuerzas magnéticas o mecánicas.

Ejemplo 9A – Un soporte de múltiples chips hecho de un portaobjetos de vidrio: Para preparar el portaobjetos como

un soporte, un recubrimiento de teflón se aplica de tal forma que deje aberturas o pocillos circulares (es decir, áreas de vidrio sin ninguna cubierta de teflón). Cada pocillo es un círculo con 6,5 mm de diámetro. Uno o más chips pueden unirse a la superficie de vidrio dentro de un pocillo. Un portaobjetos de vidrio típico tiene 25 x 75 mm y 1 mm de espesor, con una matriz 2 x 5 de pocillos. Con tamaños de chips típicos de 1,75 x 1,75 mm, hasta cuatro chips pueden unirse a la superficie de vidrio en cada pocillo. Cada chip en el mismo pocillo puede tener distintos grupos de perlas que se ensamblaron antes de la unión al soporte. Por ejemplo, si cada chip tiene una matriz que contiene 39 tipos de grupos de perlas, un pocillo con 4 chips distintos tendría un total de $4 \times 39 = 156$ tipos de perlas. Por otra parte, para chips más grandes (por ejemplo, un cuadrado de 4,5 x 4,5 mm), un pocillo entero es ocupado por un único chip. Para las dimensiones de pocillos descritas en el presente documento, cada pocillo puede contener hasta 40 μl de líquido (normalmente una disolución acuosa). Típicamente, un volumen de 20 μl de disolución de muestra se añade a cada pocillo para reacciones biológicas, de forma que cada chip se cubra totalmente por la disolución de muestra. Debido a que el recubrimiento de teflón fuera de los pocillos es hidrófobo, las muestras acuosas no se vierten. El formato de un portaobjetos de soporte puede diseñarse para ajustarse a ciertas aplicaciones. Por ejemplo, una única fila de 8 pocillos sobre un portaobjetos puede usarse para analizar 8 muestras. Además, puede usarse una matriz 4 x 8 de pocillos para analizar 32 muestras. Similarmente, pueden disponerse más pocillos (por ejemplo, 96, 384 y 1536) sobre un único portaobjetos para analizar más muestras.

Ejemplo 9B - Soporte de chips móvil: En ciertas realizaciones de un soporte de chips móvil, los chips están unidos a un sustrato tal como vidrio, acero inoxidable, materiales plásticos, semiconductores o materiales cerámicos. La unidad de soporte completa es móvil y puede transportarse durante el procesamiento para exponer los chips a diferentes medios de reacción, tales como cámaras de reacción, cámaras de lavado y etapas de lectura de señales (véase la figura 14 para una realización).

En otras realizaciones, el soporte de chips móvil comprende una cámara o cámaras en las que los chips están unidos. Alojando los chips dentro del soporte de chips móvil puede minimizarse la contaminación durante el transporte. En ciertas realizaciones, la(s) cámara(s) del soporte de chips móvil también sirven de entorno de procesamiento. Pueden admitirse gases reactivos o disoluciones líquidas para diversos fines, tales como realizar un bioensayo o limpiar los chips, en el soporte de chips móvil y posteriormente evacuarse, si se desea. Adicionalmente, el soporte de chips móvil puede poseer medios para cambiar las propiedades termodinámicas de la cámara tales como la presión o temperatura de la cámara.

Ejemplo 10: Ensamblaje de matrices codificadas de chips por embaldosado al azar

Puede producirse una multiplicidad de chips por el ensamblaje de matrices codificadas al azar de sondas que se presentan sobre perlas. Cada chip puede incluir una o más matrices de perlas codificadas al azar y puede cortarse a partir de una oblea únicamente identificada. Como se ilustra en la figura 15 (a, b, c y d), una matriz codificada al azar de chips puede producirse en un procedimiento de embaldosado. Este procedimiento puede facilitarse por una elección de una forma de chip apropiada con el fin de facilitar el alineamiento y de maximizar la ubicación de interconexión para reducir la distancia matriz a matriz.

REIVINDICACIONES

1. Un biochip, que comprende:
 - 5 un sustrato de oblea de semiconductor (L1) que tiene al menos una matriz de perlas dentro de regiones de chip delineadas respectivas situadas sobre el mismo y que tiene límites de separación entre dichas regiones de chip delineadas,
 - 10 en el que dicha al menos una matriz de perlas comprende un conjunto de perlas biofuncionalizadas aseguradas sobre la superficie del sustrato de oblea de semiconductor (L1) mediante estructuras superficiales elevadas o rebajadas, y
 - 15 en el que las perlas biofuncionalizadas están ópticamente codificadas,
 - en el que las estructuras superficiales elevadas o rebajadas están dimensionadas cada una para acomodar no más de una perla.
2. El biochip de la reivindicación 1, en el que los límites de separación para delinear dichas regiones de chip comprenden líneas de trazado.
- 20 3. El biochip de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2, en el que las perlas biofuncionalizadas comprenden una o más biomoléculas seleccionadas del grupo que consiste en oligonucleótidos, fragmentos de ácido nucleico, proteínas, oligopéptidos, ligandos, receptores, antígenos, anticuerpos, miembros individuales de pares de unión biológica.
- 25 4. El biochip de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en el que las estructuras superficiales elevadas o rebajadas están sustancialmente ocupadas por perlas biofuncionalizadas.
5. El biochip de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en el que las estructuras superficiales elevadas o rebajadas comprenden cavidades, postes, bloques, bultos o indentaciones.
- 30 6. El biochip de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en el que las estructuras superficiales elevadas o rebajadas son cavidades que tienen formas triangular, rectangular, pentagonal, hexagonal o circular.
- 35 7. El biochip de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en el que las estructuras superficiales elevadas o rebajadas son cavidades que tienen una profundidad de aproximadamente 0,5 a 1,5 veces el diámetro de las perlas.
- 40 8. El biochip de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 7, en el que cada matriz de perlas comprende el mismo conjunto de perlas biofuncionalizadas.
9. El biochip de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 8, en el que cada región de chip delineada presenta una etiqueta descodificable que identifica el sustrato de oblea de semiconductor.
- 45 10. El biochip de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 9, en el que las perlas biofuncionalizadas están fijadas al sustrato por enlaces covalentes, fuerzas de van der Waals, fuerzas electrostáticas, fuerzas gravitacionales, fuerzas magnéticas o una combinación de las mismas.
- 50 11. El biochip de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 10, en el que una composición de las perlas biofuncionalizadas comprende perlas de plástico, cerámicas o vidrio.
12. El biochip de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 11, en el que las perlas biofuncionalizadas tienen diámetros de desde aproximadamente 0,2 micrómetros a aproximadamente 200 micrómetros.
- 55 13. El biochip de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 12, en el que las perlas ópticamente codificadas tienen etiquetas ópticamente distinguibles espectralmente distinguibles por longitud de onda de excitación, longitud de onda de emisión, vida del estado excitado o intensidad de emisión.
- 60 14. El biochip de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 13, que comprende además un recubrimiento protector extraíble que protege la al menos una matriz de perlas.
15. El biochip de la reivindicación 14, en el que el recubrimiento protector extraíble comprende un azúcar no reductor inerte o un hidrogel.
- 65 16. Una pluralidad de chips preparados mediante singulación del biochip de cualquiera de las reivindicaciones 1-15 a lo largo de los límites de separación entre dichas regiones de chip.

17. Un ensamblaje de múltiples chips que comprende un sustrato sobre el que dos o más chips de la reivindicación 16 forman una disposición predeterminada.

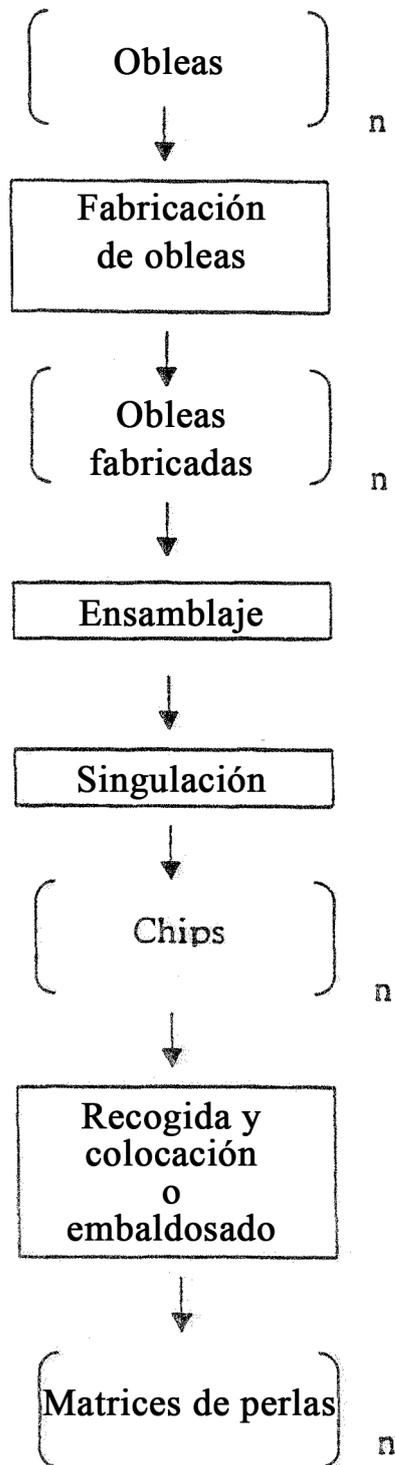


Fig. 1(a)

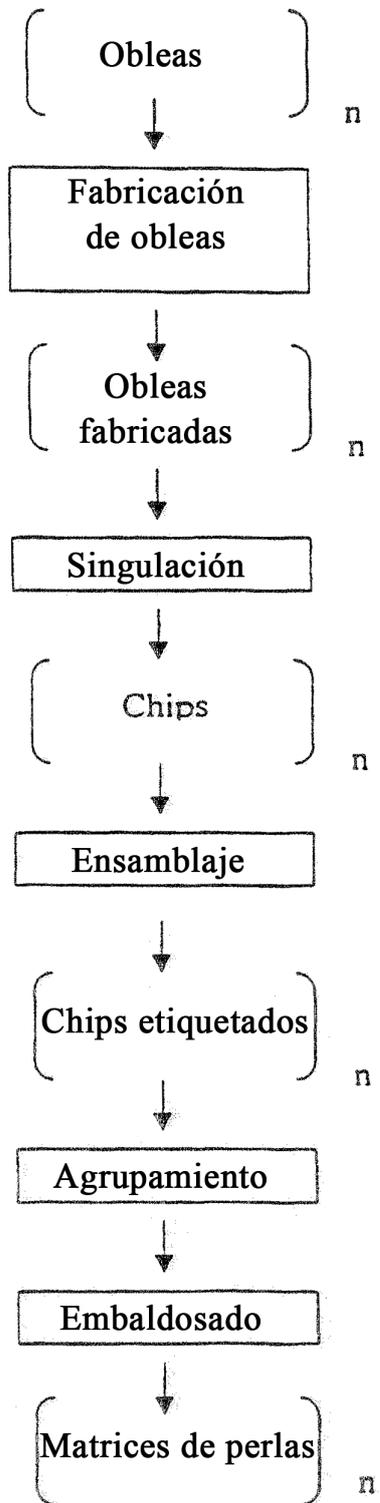


Fig. 1(b)

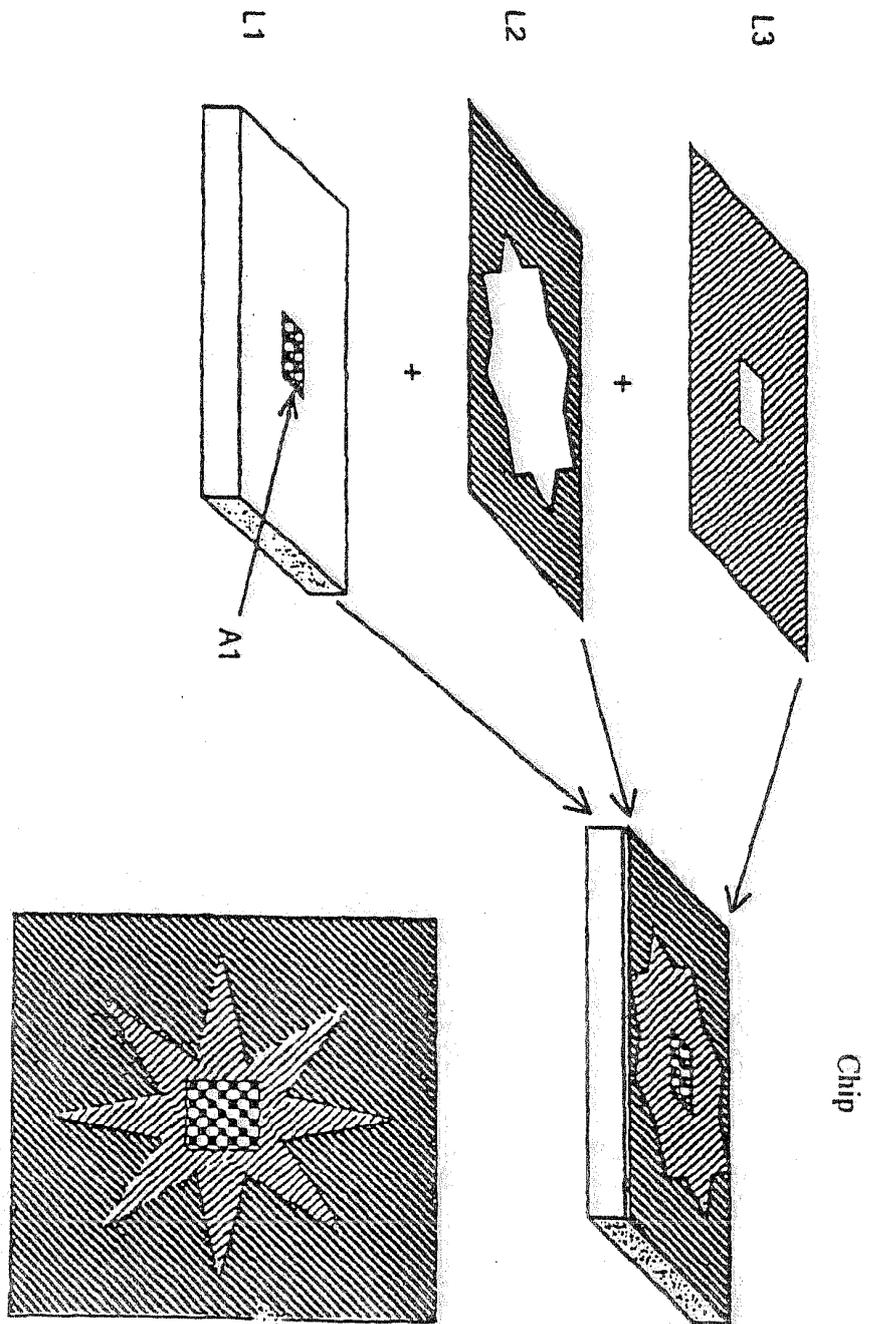


Fig. 2

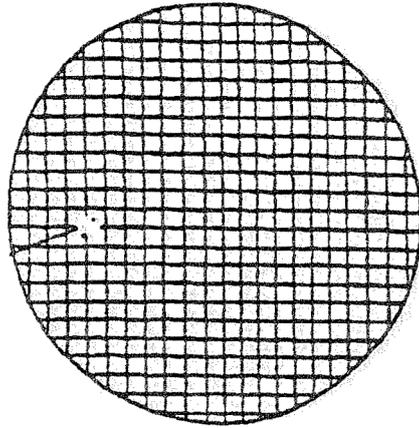
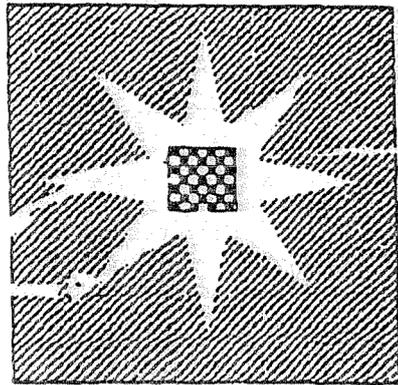
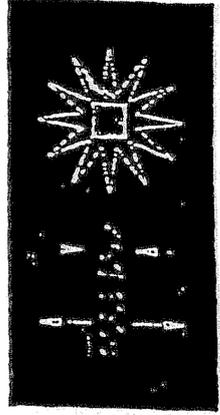


Fig. 3



1. Patrón superficial



2. La matriz está compuesta por 4012 sitios hexagonales con dimensiones detalladas del siguiente modo:

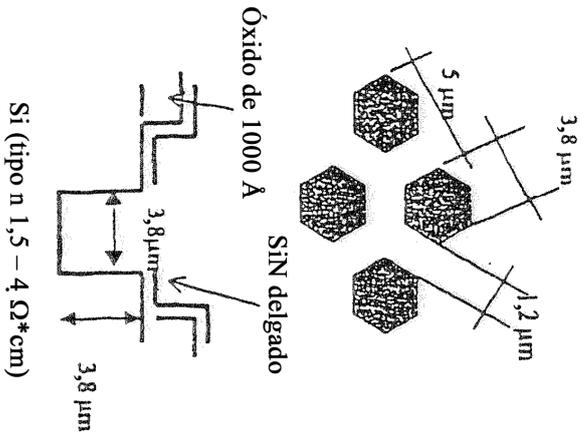


Fig. 4

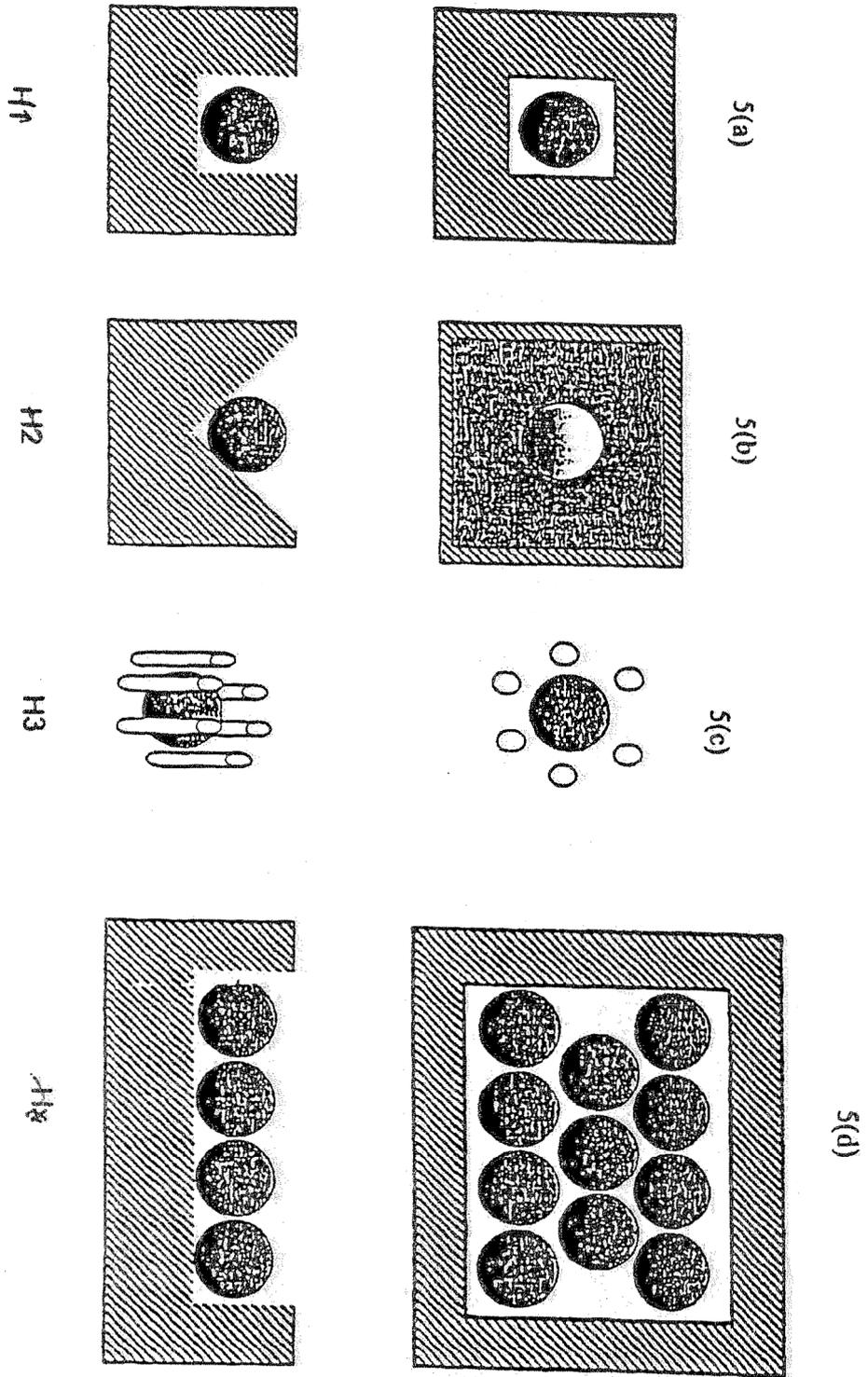


Fig. 5

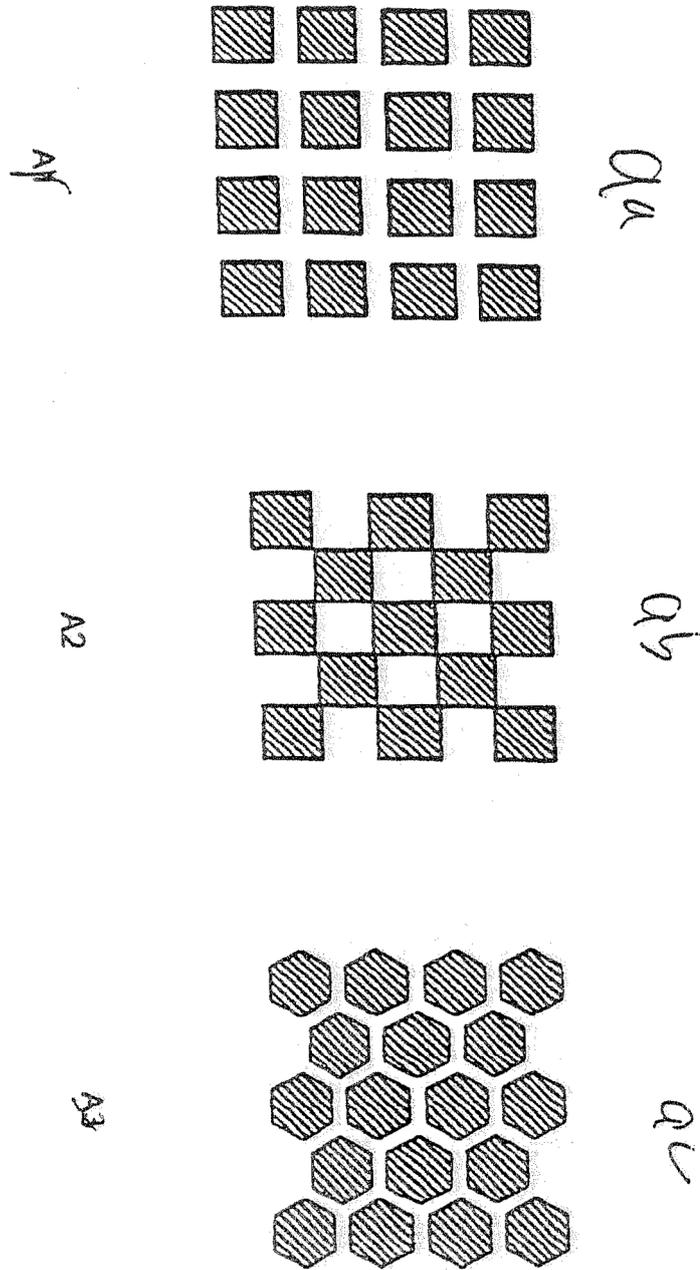


Fig. 6

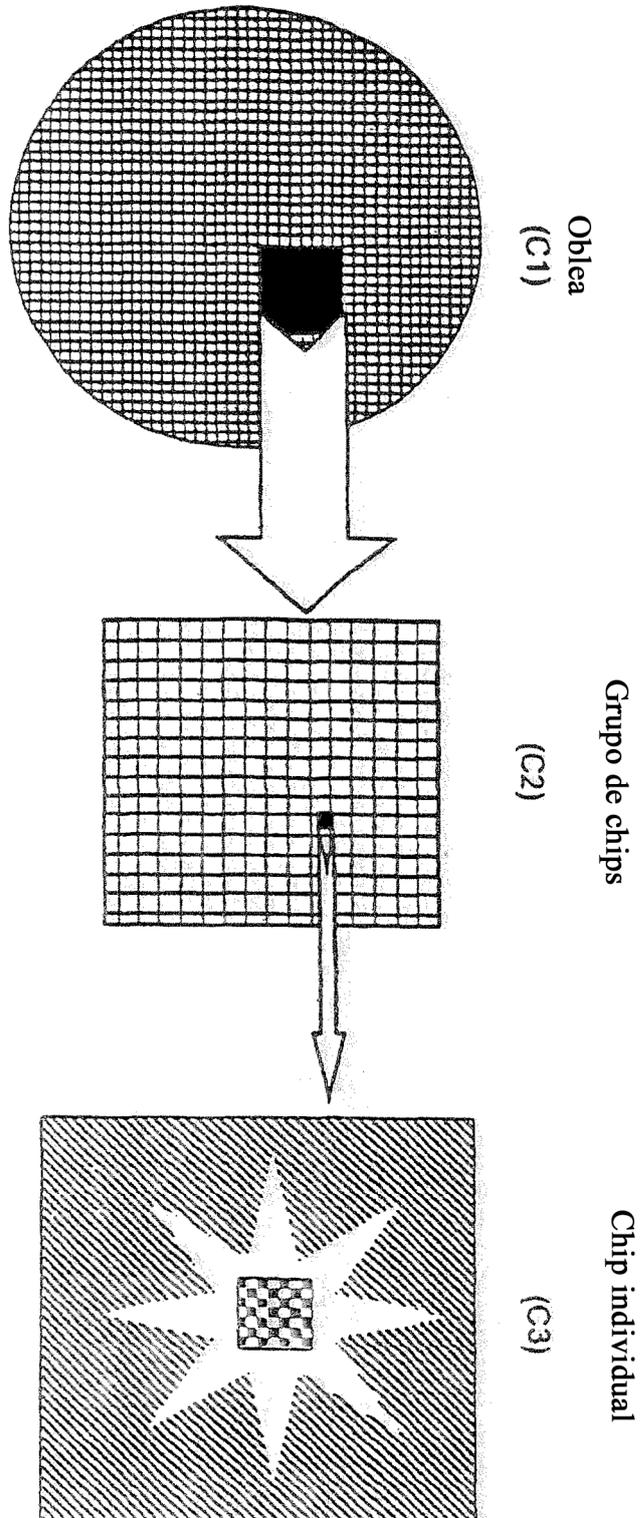
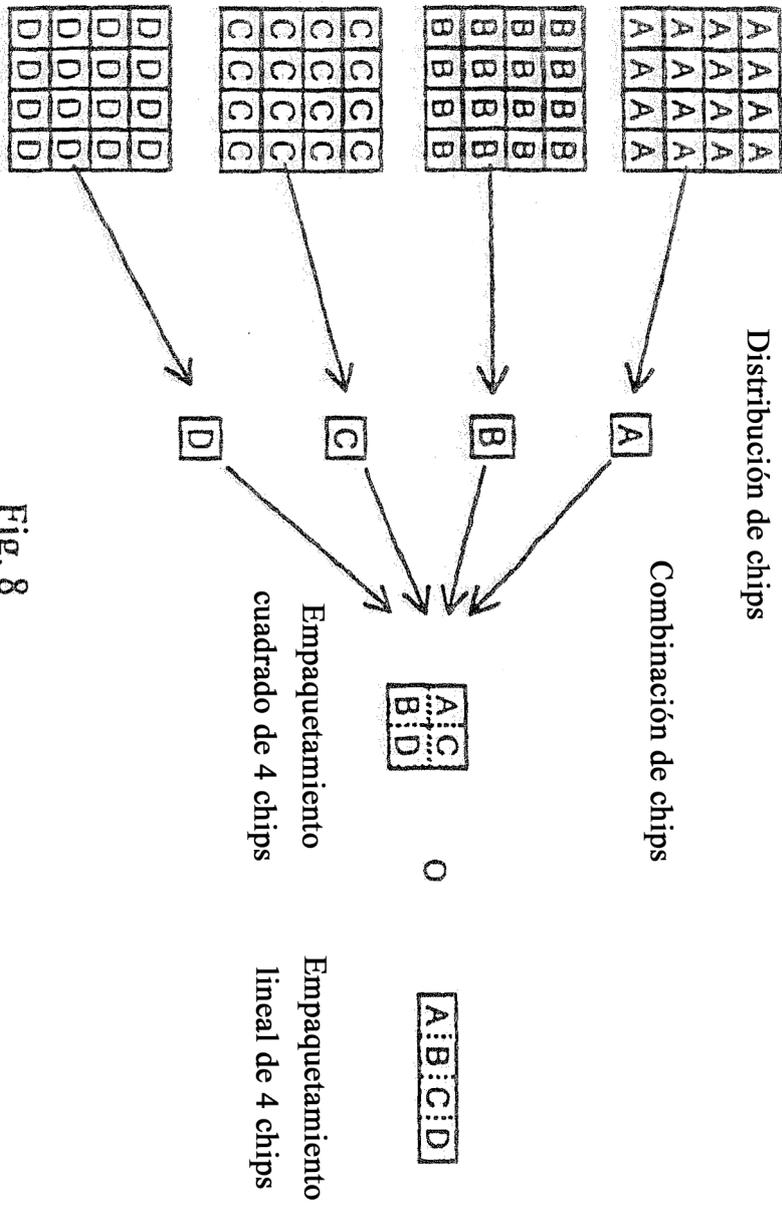


Fig. 7

4 grupos de chips distintos



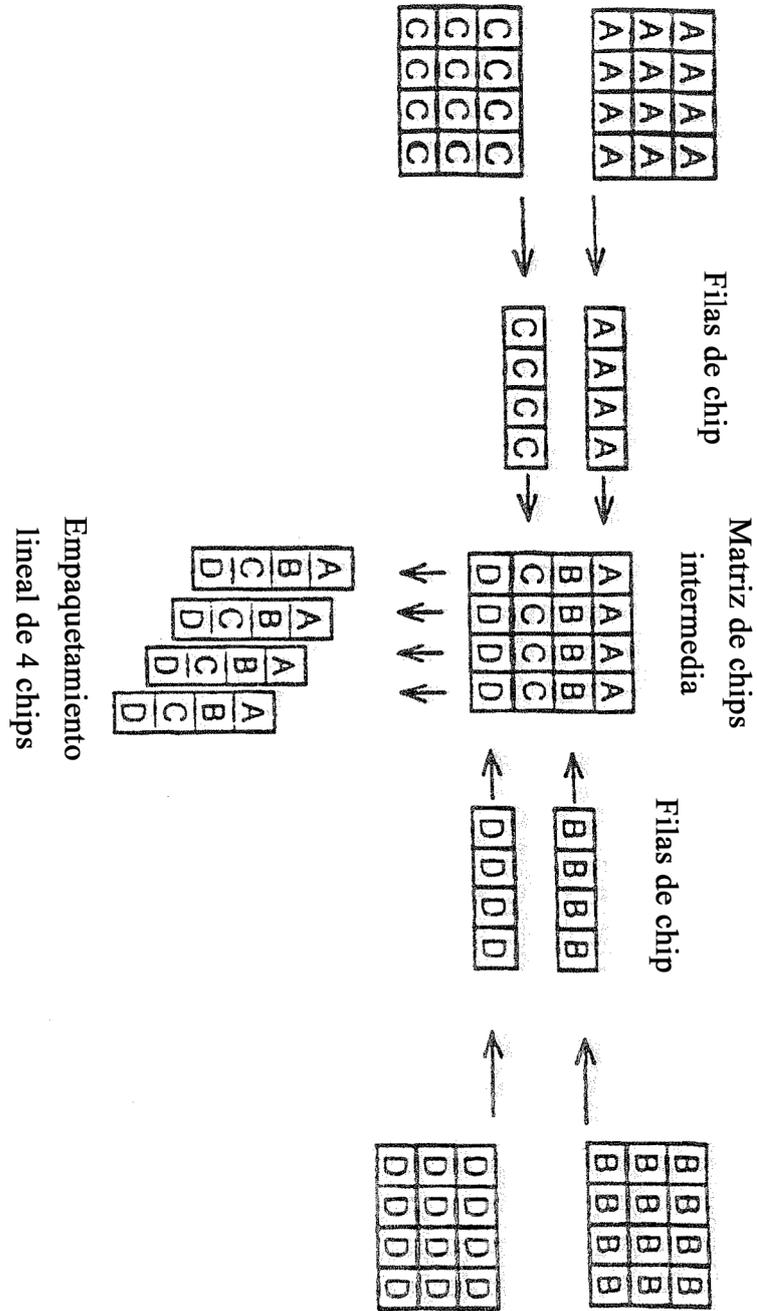
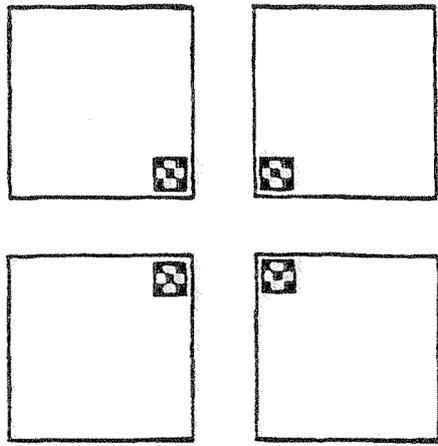
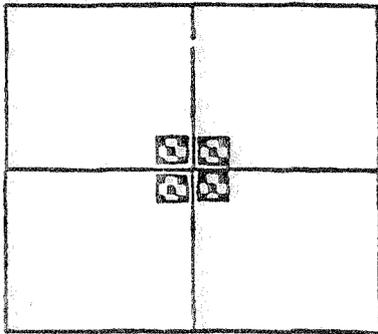


Fig. 9



Chip con matriz
sobre la esquina

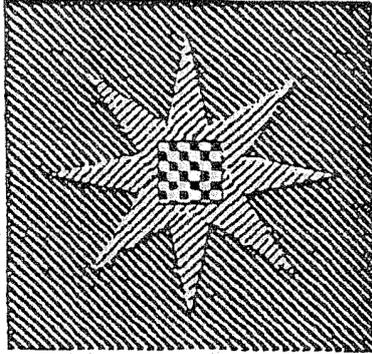
El empaquetamiento
combina 4 chips



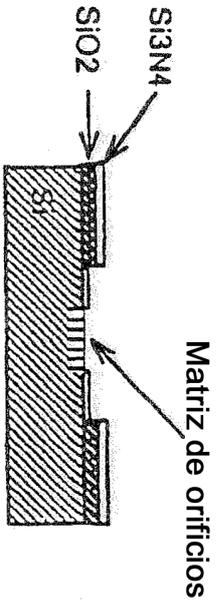
Chip con matriz
grande

Fig. 10

Vista desde arriba del chip



Vista lateral del chip



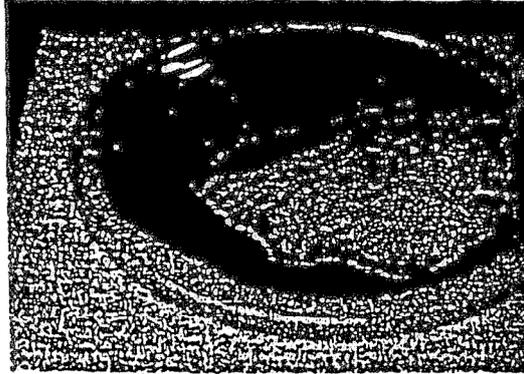
Procedimiento de fabricación



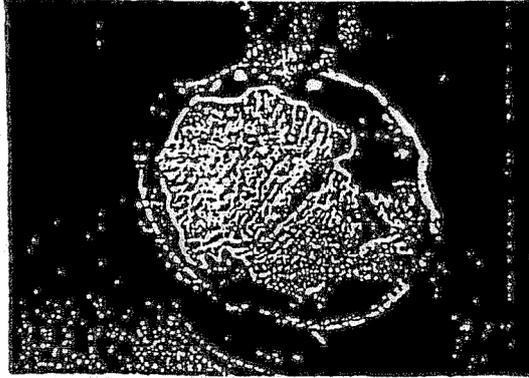
- Crecimiento/deposición de SiO₂
- Fotolitografía y grabado de SiO₂ para modelar SiO₂
- Deposición de Si₃N₄
- Fotolitografía para definir los orificios de la matriz
- Grabado con iones reactivos Si₃N₄
- Grabado con silicio en masa para producir la matriz de orificios

Fig. 11

a) Gel formado sobre la oblea



b) Gel desprendido de la oblea



c) Oblea limpiada

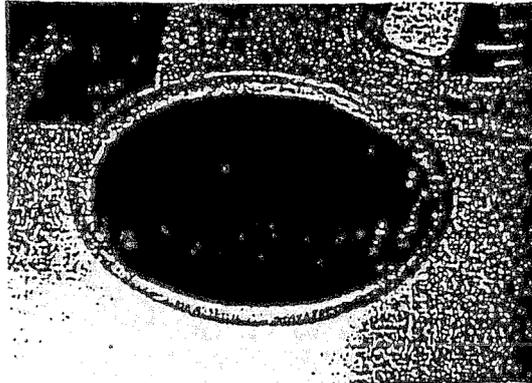


Fig. 12

Imagen de perlas sobre un chip antes de la formación de gel

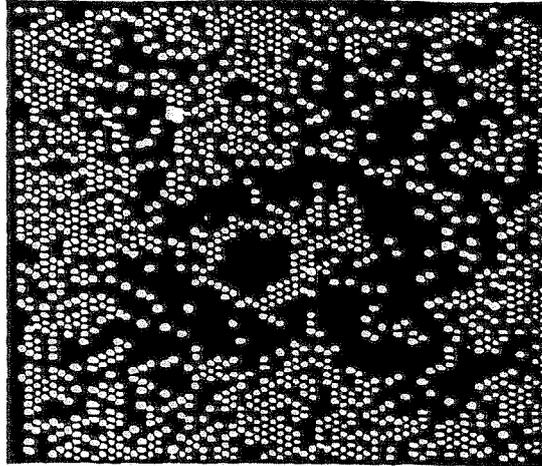


Imagen de perlas sobre el chip después de desprender el gel

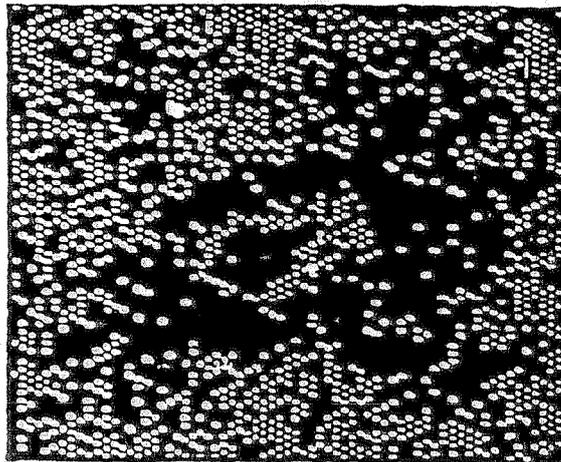
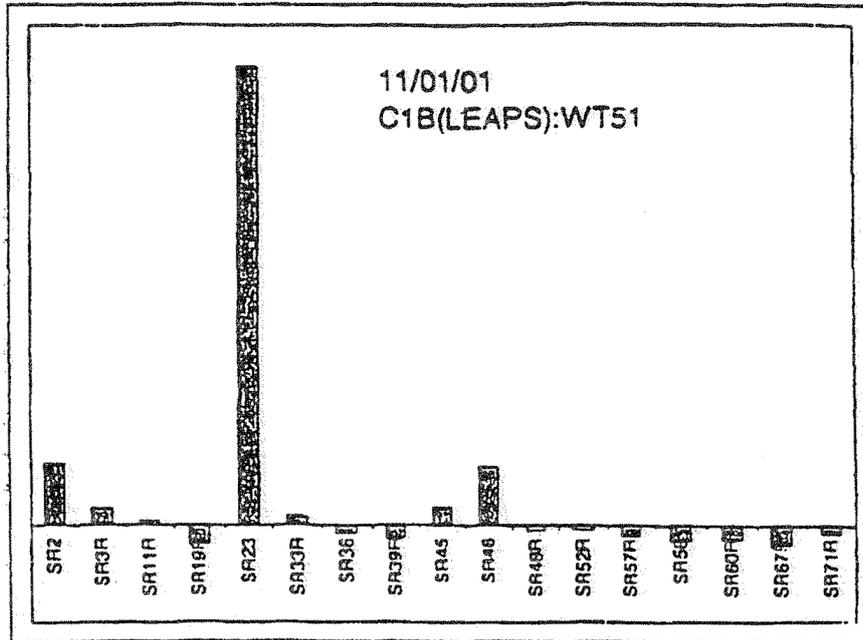


Fig. 13(a)

(1) Señal de ensayo sobre el chip sin tratamiento de hidrogel



(2) Señal de ensayo sobre el chip con tratamiento de hidrogel

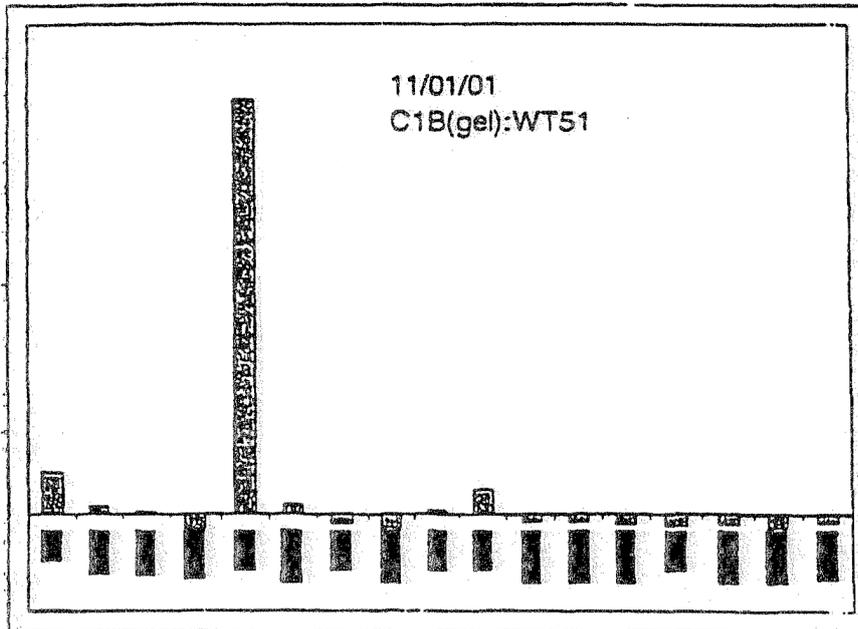


Fig. 13(b)

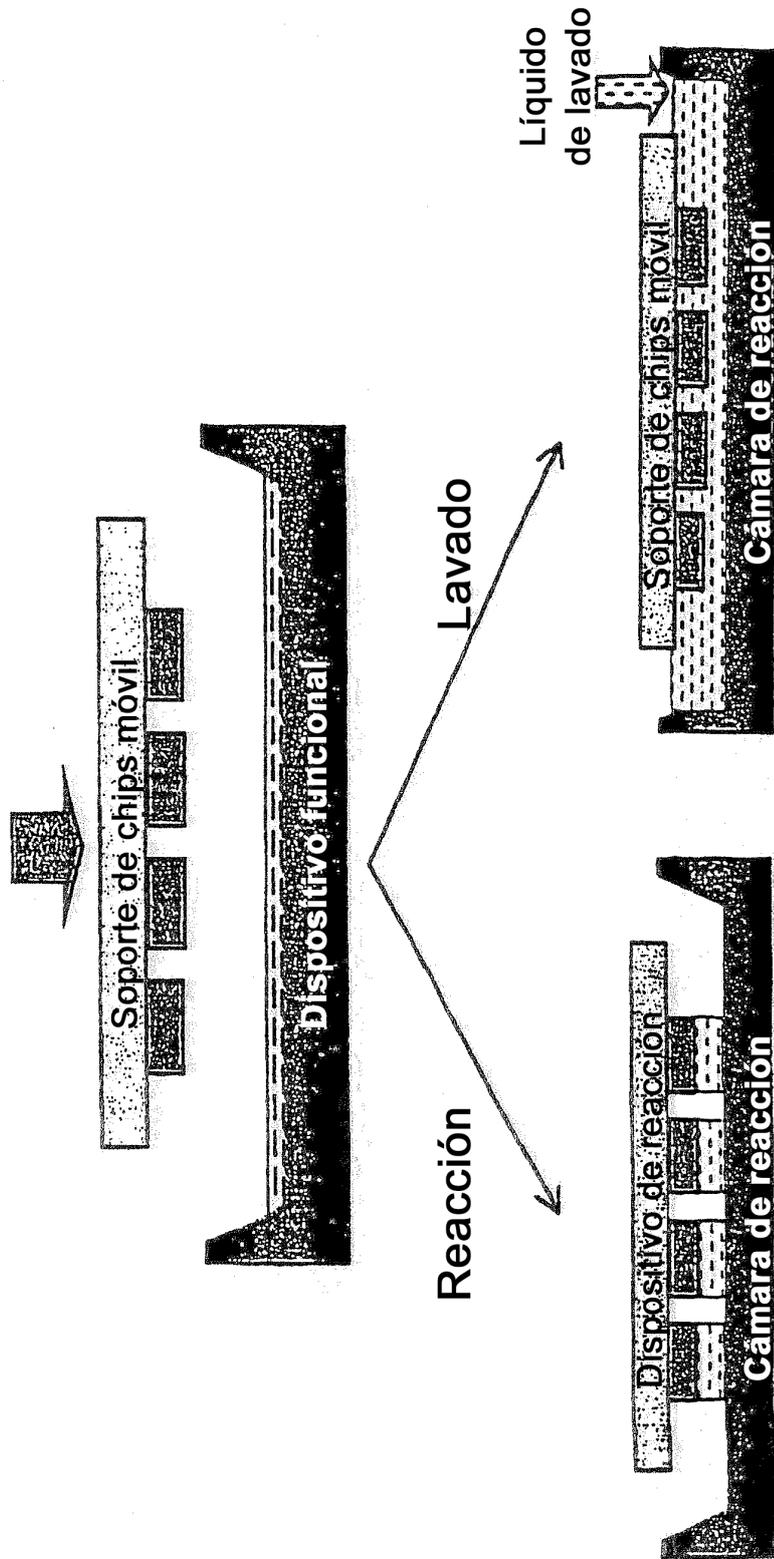


Fig. 14

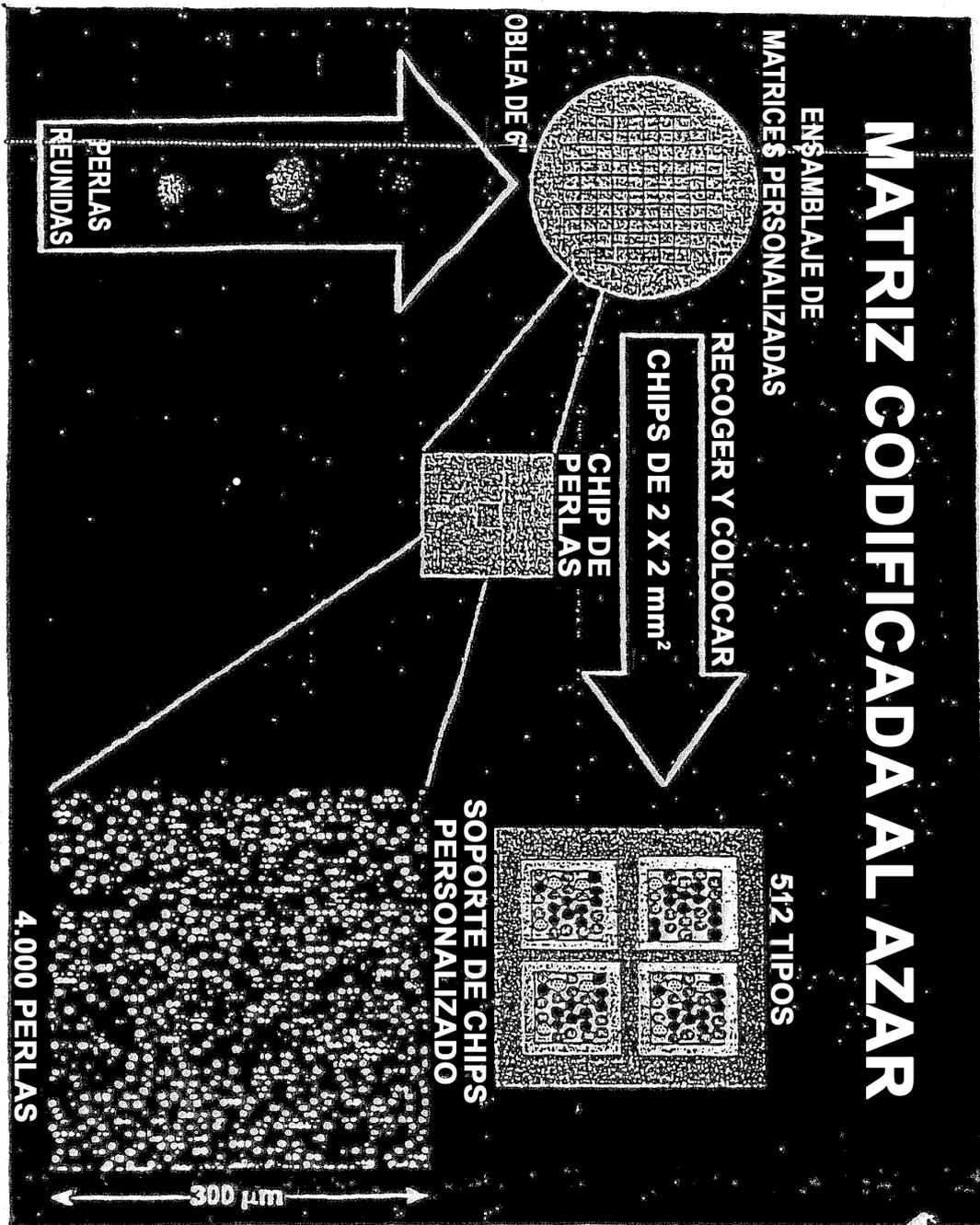


Fig. 15(a)

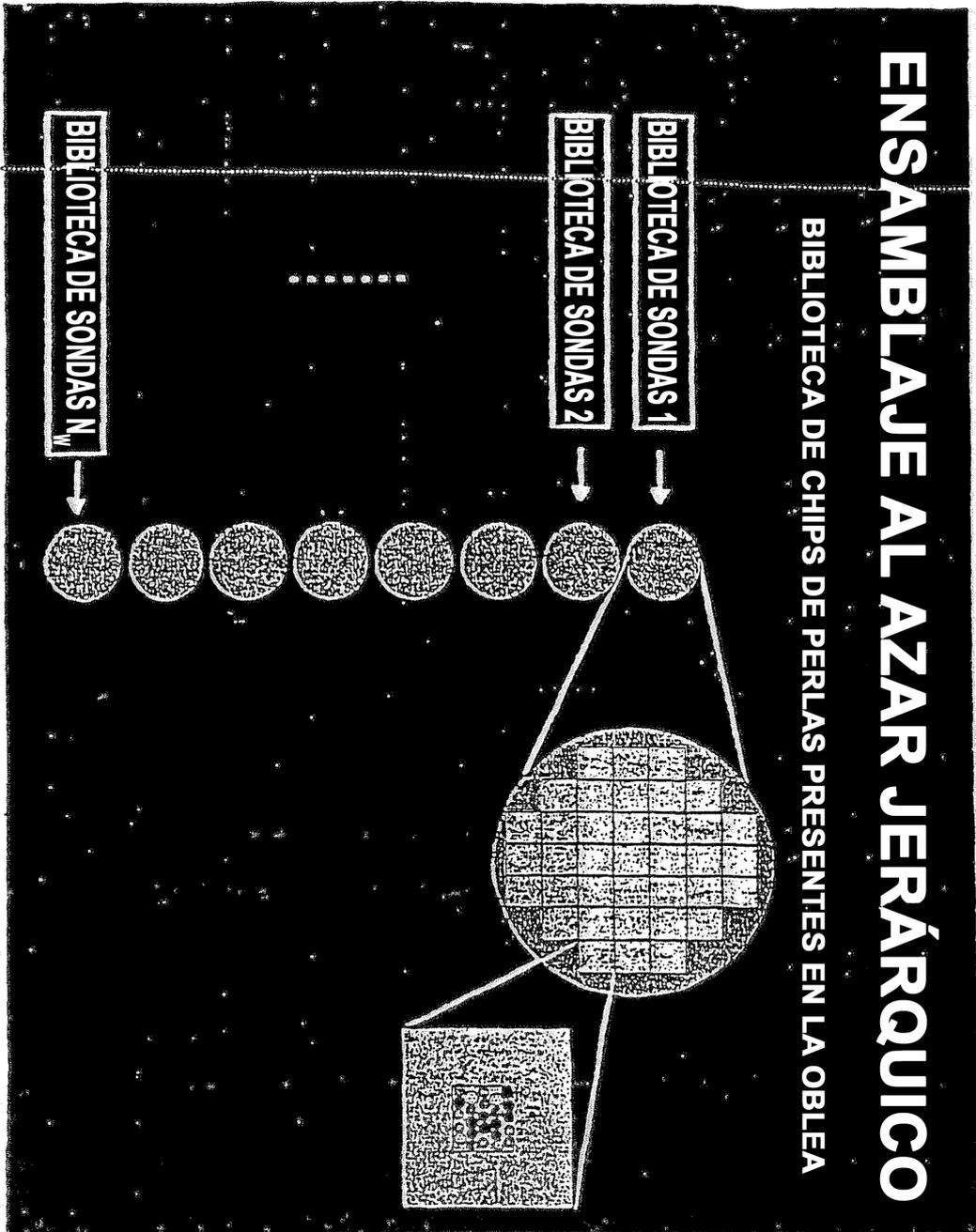


Fig. 15(b)

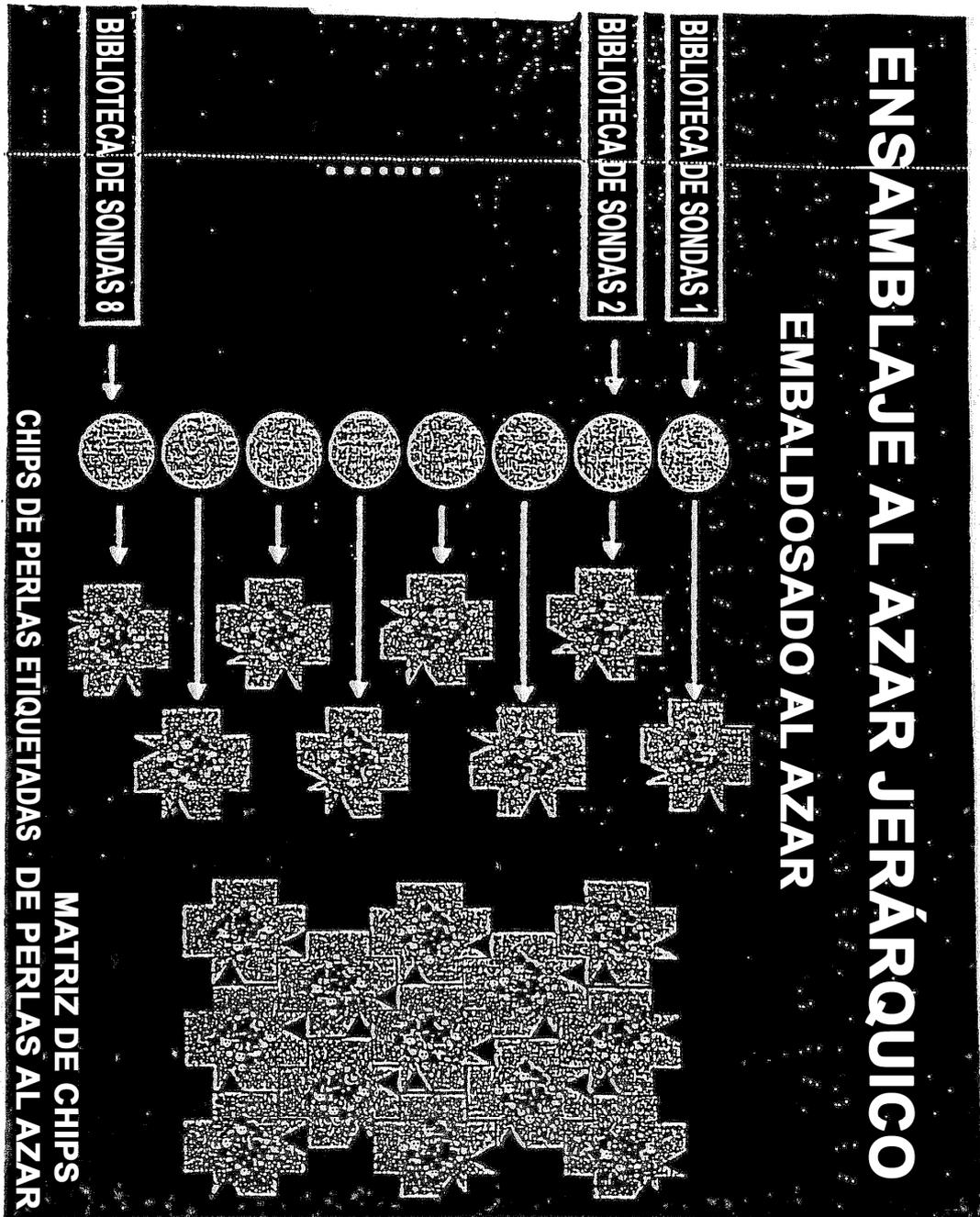


Fig. 15(c)

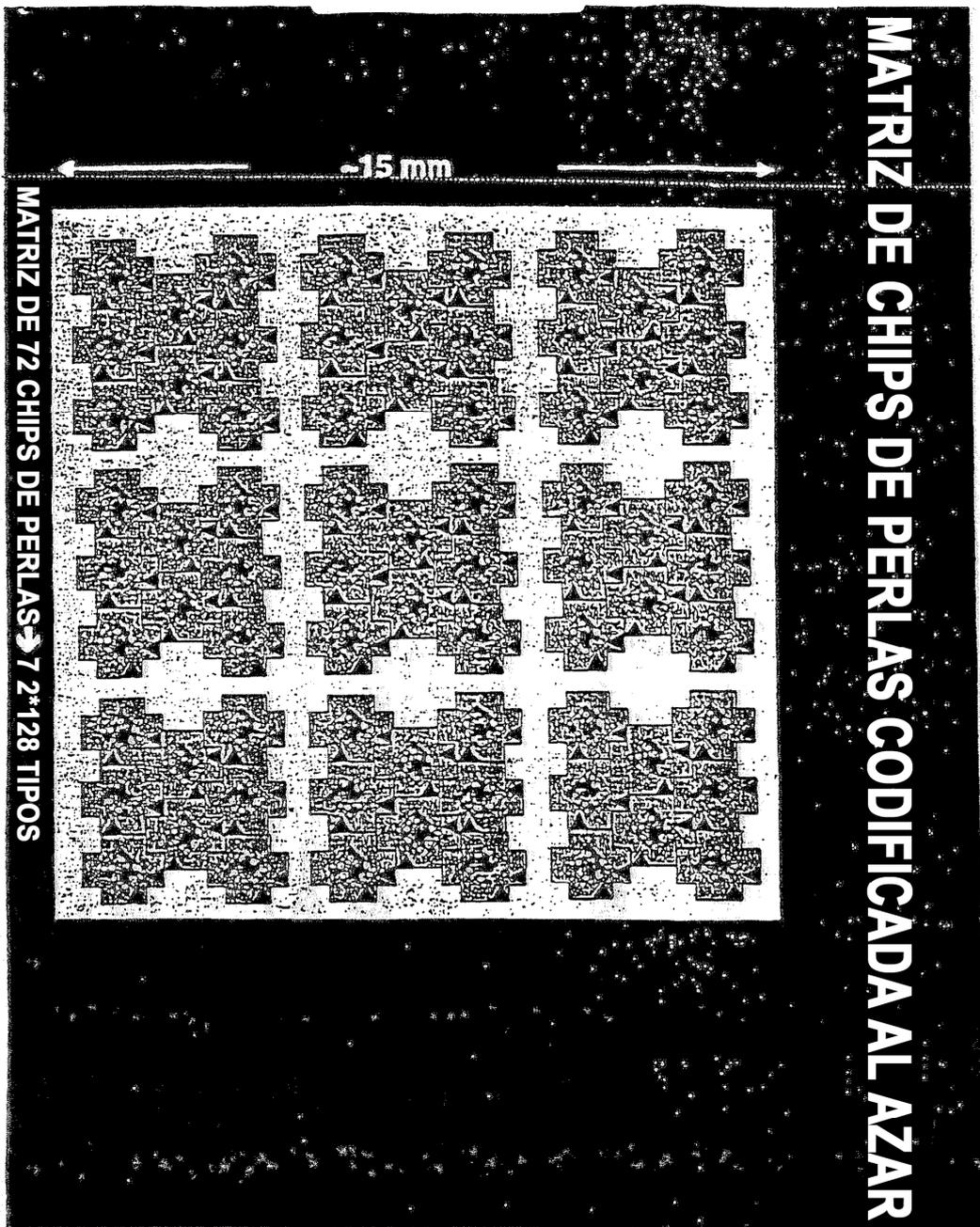
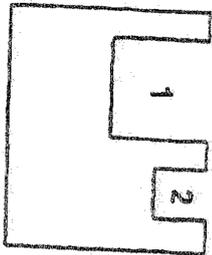
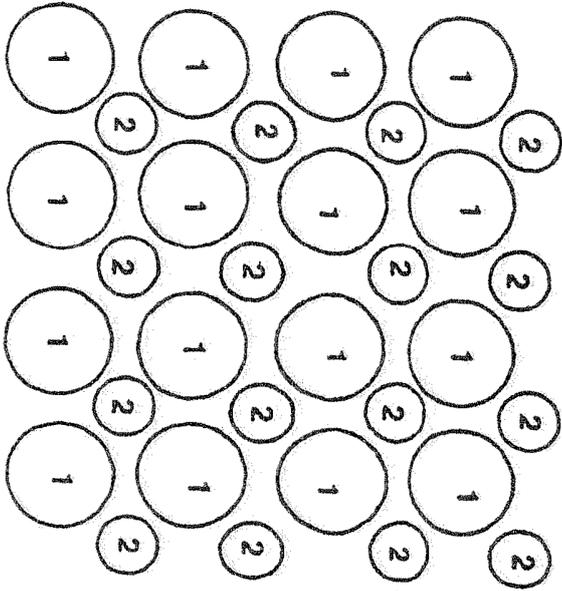


Fig. 15(d)

2 tipos de cavidades en una matriz



2 tipos de cavidades (1 y 2 se diferencian en el tamaño o forma) en la misma matriz

Fig. 16

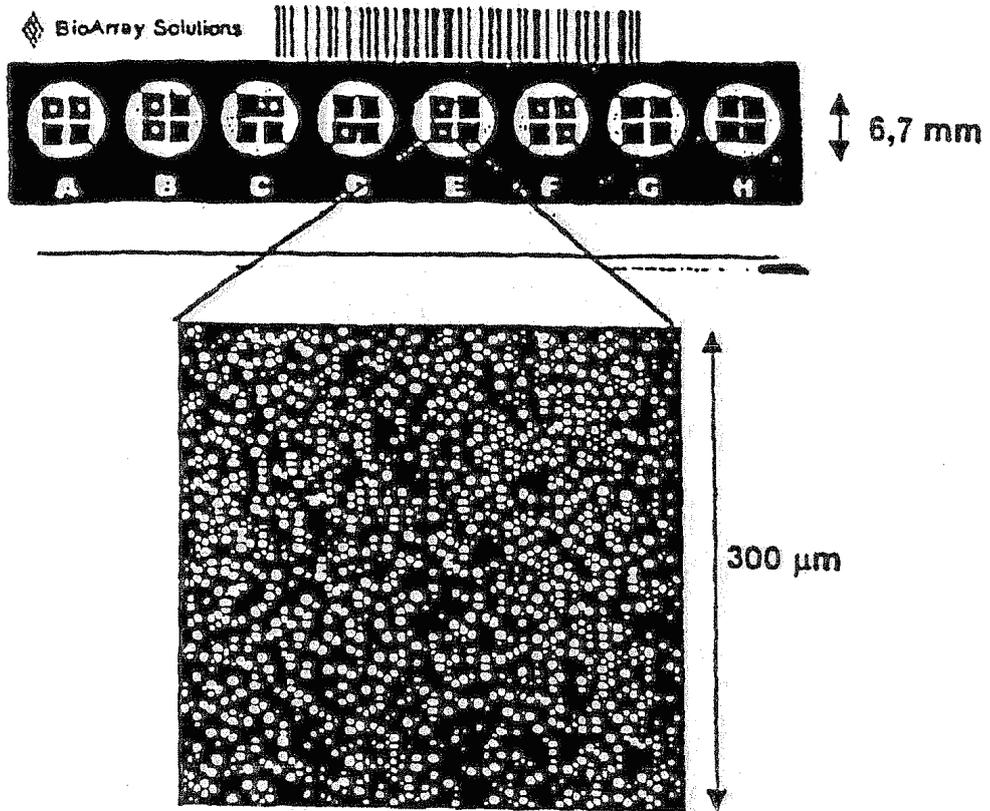


Fig. 17