

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 377**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

B01L 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.09.2014 PCT/EP2014/069963**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2015 WO15044040**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2014 E 14772105 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 3049186**

54 Título: **Unidad de análisis para llevar a cabo una reacción en cadena de la polimerasa, procedimiento para hacer funcionar una unidad de análisis de este tipo y procedimiento para la producción de una unidad de análisis de este tipo**

30 Prioridad:

27.09.2013 DE 102013219502

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

15.03.2018

73 Titular/es:

**ROBERT BOSCH GMBH (100.0%)
Postfach 30 02 20
70442 Stuttgart, DE**

72 Inventor/es:

**BRETTSCHNEIDER, THOMAS y
HOFFMANN, JOCHEN**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 659 377 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

Unidad de análisis para llevar a cabo una reacción en cadena de la polimerasa, procedimiento para hacer funcionar una unidad de análisis de este tipo y procedimiento para la producción de una unidad de análisis de este tipo

Estado de la técnica

5 La presente invención se refiere a una unidad de análisis para llevar a cabo una reacción en cadena de la polimerasa, a un procedimiento para hacer funcionar una unidad de análisis de este tipo y a un procedimiento para la producción de una unidad de análisis de este tipo.

10 La reacción en cadena de la polimerasa digital posibilita la detección de secuencias de ADN individuales en una matriz de cavidades. Para esto se distribuyen estadísticamente n moléculas de ADN junto con un sistema de amplificación bioquímico (reacción en cadena de la polimerasa, *Polymerase Chain Reaction*; PCR) en m microcavidades de un chip, siendo en el caso normal n menor que m. En cada cavidad en la que inicialmente había una molécula de ADN se generan millones de copias idénticas de la molécula de ADN y, al mismo tiempo, una señal detectable. Mediante el recuento de las señales, por tanto, se puede diferenciar "digitalmente" después de la reacción en cadena de la polimerasa entre cavidades vacías (= 0) y cavidades con una molécula de ADN (= 1).

15 En sistemas disponibles en el mercado para reacciones en cadena de la polimerasa digitales en primer lugar se disgrega una muestra biológica, después se purifica y se extrae el ADN.

20 Los sistemas de diagnóstico microfluídicos, tales como laboratorio en un chip (*Lab-on-a-Chip*) (LOC; "nanolaboratorio") permiten la realización miniaturizada e integrada de desarrollos complejos de trabajo, tales como por ejemplo una preparación completamente automatizada de la muestra. En tales sistemas de laboratorio en un chip se puede amplificar en primer lugar el material de muestra que se va a examinar mediante la reacción en cadena de la polimerasa y a continuación se puede analizar en una micromatriz. La vinculación de ambas operaciones y la realización en varias etapas del proceso dan lugar a un tiempo prolongado del proceso y a una realización compleja del proceso. Por el contrario, la reacción en cadena de la polimerasa digital permite amplificar y cuantificar moléculas de ADN específicamente en una etapa.

25 Divulgación de la invención

30 Ante este trasfondo, con la presente invención se propone una unidad de análisis para llevar a cabo una reacción en cadena de la polimerasa, un procedimiento para hacer funcionar una unidad de análisis de este tipo y un procedimiento para la producción de una unidad de análisis de este tipo de acuerdo con las reivindicaciones principales. Se desprenden configuraciones ventajosas de las respectivas reivindicaciones dependientes y de la siguiente descripción.

Se propone una unidad de análisis para llevar a cabo una reacción en cadena de la polimerasa, presentando la unidad de análisis las siguientes características:

un elemento de tapa;

35 un elemento de fondo con al menos una entalladura de fondo, presentando la entalladura de fondo una superficie de alojamiento de fluido y una disposición de microcavidades, estando dispuesta la entalladura de fondo opuesta al elemento de tapa;

al menos un canal de fluido que está configurado entre el elemento de tapa y el elemento de fondo para conducir un fluido sobre la superficie de alojamiento de fluido de la entalladura de fondo;

40 al menos un canal de presión que está configurado en el elemento de tapa para conducir una presión a una zona de la superficie de alojamiento de fluido; y

una lámina que está dispuesta en la zona de la entalladura de fondo entre el elemento de tapa y el elemento de fondo, estando configurada la lámina para deformarse, al conducir la presión a la zona de la superficie de alojamiento de fluido, por la presión de tal forma que el fluido se mueve de la superficie de alojamiento de fluido a la disposición de microcavidades.

45 Por un elemento de tapa y un elemento de fondo se puede entender en cada caso una capa que está fabricada por ejemplo a partir de un plástico, en particular a partir de un polímero. Por una entalladura de fondo se puede entender por ejemplo una concavidad en el elemento de fondo. Por una superficie de alojamiento de fluido se puede entender una superficie de la entalladura de fondo sobre la cual se puede aplicar un fluido. Por un fluido se puede entender un

5 líquido con material bioquímico tal como por ejemplo ácidos nucleicos. Por una microcavidad se puede entender una concavidad configurada en la entalladura de fondo para el alojamiento del fluido. Por ejemplo, el fluido se puede introducir en la microcavidad para llevar a cabo una reacción en cadena de la polimerasa. Por una lámina se puede entender un elemento flexible plano, tal como por ejemplo un estrato de plástico. La lámina a este respecto puede ser, por ejemplo, impermeable a fluido.

10 El presente enfoque se basa en el conocimiento de que es posible integrar una matriz de microcavidades para llevar a cabo análisis mediante la reacción en cadena de la polimerasa en un sistema de laboratorio en un chip. En el sistema de laboratorio en un chip se puede producir por ejemplo también una preparación de una solución de muestra que se va a analizar. Ventajosamente se puede usar una membrana del sistema de laboratorio en un chip para cargar la solución de muestra después de la preparación en las microcavidades. Para esto, la membrana se puede desviar mediante una presión, de tal modo que la solución de muestra se presiona al interior de las microcavidades.

15 Por el hecho de que la micromatriz se puede llenar de forma automática y controlada, un desarrollo del proceso en comparación con una transferencia manual de la solución de muestra se puede acelerar y simplificar claramente. Además, con ello se pueden descartar errores de manejo y se pueden ahorrar costes de personal con formación especializada. Finalmente, el presente enfoque ofrece la ventaja de un menor riesgo de contaminación.

20 De acuerdo con una forma de realización del presente enfoque, el canal de presión puede estar configurado como abertura de paso en el elemento de tapa. En este caso, la entalladura de fondo puede estar dispuesta de tal modo que la superficie de alojamiento de fluido se encuentre opuesta a la abertura de paso y la disposición de microcavidades esté desplazada lateralmente con respecto a la abertura de paso. Por ello se puede realizar, con costes reducidos, un control eficaz de la lámina.

25 De acuerdo con una forma de realización del presente enfoque, la lámina puede estar fijada al menos en una zona de la superficie de alojamiento de fluido y/o en la zona de la disposición de microcavidades de forma separable en el elemento de tapa. Por ello se puede conseguir que la lámina se abombe al aplicar la presión en la abertura de paso de forma continua desde la superficie de alojamiento de fluido en dirección a las microcavidades. Esto ofrece la ventaja de un llenado muy fiable de las microcavidades.

Además, la lámina puede estar configurada para que se deforme con la presión, de tal manera que la disposición de microcavidades se cierra de forma estanca a fluido. Por el hecho de que las microcavidades se rellenan y se cierran de forma estanca a fluido en una etapa, se puede evitar una evaporación prematura del fluido.

30 Entre la disposición de microcavidades y la superficie de alojamiento de fluido puede estar configurado además un elemento de separación para evitar un movimiento del fluido de la superficie de alojamiento de fluido a la disposición de microcavidades antes de la conducción de la presión a la zona de la superficie de alojamiento de fluido. Por un elemento de separación se puede entender, por ejemplo, una acanaladura que tiene un recorrido transversal a una dirección de movimiento del fluido en la entalladura de fondo o una tira aplicada sobre la entalladura de fondo de un material hidrófobo. Mediante un elemento de separación de este tipo, sencillo de realizar, el fluido se puede introducir de una forma rápida y controlada en la unidad de análisis.

40 De acuerdo con otra forma de realización del presente enfoque, la superficie de alojamiento de fluido puede estar cubierta al menos en parte con una capa de fibras compresible para el alojamiento y/o la emisión del fluido. Por una capa de fibras se puede entender una capa de un material que absorbe líquido, tal como por ejemplo no tejido. Por ejemplo, la capa de fibras puede estar configurada para absorber un volumen máximo predeterminado del fluido. Por tanto, no solo se puede evitar un movimiento no intencionado del fluido de la superficie de alojamiento de fluido a la disposición de microcavidades, sino que también se puede medir una cantidad del fluido.

45 Además, el elemento de fondo puede presentar en la zona de la disposición de microcavidades un espesor máximo predeterminado. Por ejemplo, un reducido espesor máximo ofrece la ventaja de que las microcavidades se pueden atemperar de forma rápida y eficiente para llevar a cabo una reacción en cadena de la polimerasa controlada por temperatura. Además se puede reducir una absorción de luz por el elemento de fondo en la zona de las microcavidades. Esto puede ser ventajoso en particular en el caso de la aplicación de procedimientos ópticos para analizar el fluido.

50 La lámina puede presentar al menos en la zona de la disposición de microcavidades una capa aislante y/o estar configurada como compuesto de varias capas para reducir una permeabilidad a vapor de la lámina. Por ello se pueden contrarrestar de forma eficaz las pérdidas por difusión y se puede garantizar una elevada fiabilidad de la unidad de análisis.

La capa aislante puede estar configurada, de acuerdo con otra forma de realización, en un lado de la lámina dirigido al elemento de tapa. En particular, en este caso, la capa aislante puede estar formada a partir de parafina. Al

presentar la parafina un estado de agregación sólido y no cambiando a un estado de agregación líquido por ejemplo hasta que se calienta la unidad de análisis, la capa aislante se puede aplicar durante la producción de la unidad de análisis de forma muy sencilla sobre la lámina.

5 De acuerdo con otra forma de realización del presente enfoque, un recipiente de fluido puede estar configurado como otra entalladura de fondo en el elemento de fondo. En este caso puede estar configurado al menos otro canal de presión en el elemento de tapa para conducir la presión al recipiente de fluido. Además, en el elemento de tapa puede estar configurado al menos un canal de unión para acoplar de forma fluida el recipiente de fluido y el canal de presión. El recipiente de fluido puede estar configurado para conducir la presión a través del canal de unión y el canal de presión a la zona de la superficie de alojamiento de fluido. Por un recipiente de fluido se puede entender por ejemplo una concavidad llena de un líquido en el elemento de fondo. En el caso del líquido se puede tratar en particular de agua. Al hacer el agua sobre la lámina desviada de una especie de barrera de difusión, se puede reducir una evaporación de un líquido que se encuentra en las microcavidades. Además, esta forma de realización ofrece la ventaja de una manipulación simplificada de la unidad de análisis, ya que no se tiene que suministrar ningún líquido desde el exterior.

15 De acuerdo con otra forma de realización, la lámina puede estar dispuesta también en la zona del recipiente de fluido para cerrar de forma estanca a fluido el recipiente de fluido. En este caso, la presión por una desviación de la lámina puede actuar sobre el líquido.

20 La unidad de análisis puede presentar, de acuerdo con otra forma de realización del presente enfoque, además un medio que está configurado para introducir una presión en el canal de presión y/o el otro canal de presión. Por un medio se puede entender por ejemplo una bomba, que está configurada para bombear un fluido al interior del canal de presión y/o del otro canal de presión. En el caso del fluido se puede tratar en particular de un líquido. Mediante el medio se puede facilitar de forma fiable una presión necesaria para desviar la lámina. Un uso del líquido ofrece la ventaja adicional de una reducción de la permeabilidad a vapor de la lámina, siempre que la lámina se cubra en la zona de las microcavidades por el líquido.

25 El presente enfoque crea además un procedimiento para hacer funcionar una unidad de análisis de acuerdo con una de las formas de realización que se han descrito anteriormente, comprendiendo el procedimiento las siguientes etapas:

aplicación de un fluido sobre la superficie de alojamiento de fluido; e

30 introducción de una presión en el canal de presión para mover el fluido desde la superficie de alojamiento de fluido a la disposición de microcavidades.

Finalmente, el presente enfoque crea un procedimiento para la producción de una unidad de análisis de acuerdo con una de las formas de realización que se han descrito anteriormente, comprendiendo el procedimiento las siguientes etapas:

35 facilitación de un elemento de fondo con al menos una entalladura de fondo, que presenta una superficie de alojamiento de fluido y una disposición de microcavidades, un elemento de tapa con al menos un canal de presión que está configurado para conducir una presión a la zona de la superficie de alojamiento de fluido, así como una lámina que está configurada para deformarse durante la conducción de la presión a la zona de la superficie de alojamiento de fluido por la presión de tal modo que se mueve un fluido de la superficie de alojamiento de fluido a la disposición de microcavidades;

40 unión del elemento de tapa, del elemento de fondo y de la lámina, realizándose la unión de tal modo que la entalladura de fondo se encuentra opuesta al elemento de tapa y la lámina está dispuesta en la zona de la entalladura de fondo entre el elemento de tapa y el elemento de fondo; y

formación de al menos un canal de fluido entre el elemento de tapa y el elemento de fondo para conducir el fluido sobre la superficie de alojamiento de fluido de la entalladura de fondo.

45 A continuación se explica la invención a modo de ejemplo con más detalle mediante los dibujos adjuntos. Muestran:

Las Figs. 1a, 1b, 1c representaciones del corte transversal de una unidad de análisis de acuerdo con un ejemplo de realización de la presente invención;

La Fig. 2 una representación de vista superior de una unidad de análisis de acuerdo con un ejemplo de realización de la presente invención;

- La Fig. 3 una representación de vista superior de una unidad de análisis de acuerdo con un ejemplo de realización de la presente invención;
- Las Figs. 4a, 4b representaciones del corte transversal de un elemento de fondo con un elemento de separación de acuerdo con distintos ejemplos de realización de la presente invención;
- 5 La Fig. 5 una representación del corte transversal de una unidad de análisis de acuerdo con un ejemplo de realización de la presente invención;
- La Fig. 6 una representación del corte transversal de una unidad de análisis de acuerdo con un ejemplo de realización de la presente invención;
- 10 Las Figs. 7a, 7b representaciones del corte transversal de una unidad de análisis de acuerdo con un ejemplo de realización de la presente invención;
- La Fig. 8 una representación del corte transversal de una unidad de análisis de acuerdo con un ejemplo de realización de la presente invención;
- La Fig. 9 una representación del corte transversal de una unidad de análisis de acuerdo con un ejemplo de realización de la presente invención;
- 15 La Fig. 10 un diagrama de desarrollo de un procedimiento para hacer funcionar una unidad de análisis de acuerdo con un ejemplo de realización de la presente invención; y
- La Fig. 11 un diagrama de desarrollo de un procedimiento para la producción de una unidad de análisis de acuerdo con un ejemplo de realización de la presente invención.

20 En la siguiente descripción de ejemplos de realización favorables de la presente invención se usan para los elementos representados en las distintas figuras y de acción similar referencias iguales o similares, prescindiéndose de una descripción reiterada de estos elementos.

25 Las Figuras 1a, 1b y 1c muestran representaciones del corte transversal de una unidad de análisis 100 de acuerdo con un ejemplo de realización de la presente invención. La unidad de análisis 100 comprende un elemento de tapa 105 con un canal de presión 110, un elemento de fondo 115 con una entalladura de fondo 120 así como una lámina 122. El canal de presión 110 está configurado de acuerdo con este ejemplo de realización como abertura de paso en el elemento de tapa 105. La entalladura de fondo 120 presenta una superficie de alojamiento de fluido 125 así como una disposición de microcavidades 130. La lámina 122 está dispuesta entre el elemento de tapa 105 y el elemento de fondo 150 en la zona de la entalladura de fondo 120. La entalladura de fondo 120 está dispuesta de tal modo que la superficie de alojamiento de fluido 125 se encuentra opuesta al canal de presión 110 y las microcavidades 130 están desplazadas lateralmente con respecto al canal de presión 110. Sobre la superficie de alojamiento de fluido 125 se encuentra un fluido 135, cuyo volumen rellena un espacio hueco entre la superficie de alojamiento de fluido 125 y la lámina 122. El fluido 135 se extiende además hasta una zona de borde, que limita con la disposición de microcavidades 130, de la superficie de alojamiento de fluido 125. Para conducir el fluido 135 sobre la superficie de alojamiento de fluido 125, entre el elemento de tapa 105 y el elemento de fondo 115 está configurado (no visible) un canal de fluido.

35 La lámina 122 está configurada para deformarse al aplicar una presión en el canal de presión 110 por la presión, de tal modo que se mueve el fluido 135 de la superficie de alojamiento de fluido 125 al interior de las microcavidades 130.

La Fig. 1a muestra la unidad de análisis 100 en un estado no activado.

40 La Fig. 1b muestra la unidad de análisis 100 al aplicar la presión al canal de presión 110. Una dirección de la presión está indicada con una flecha. La lámina 122 se abomba por la presión, de tal modo que queda apoyada sobre la superficie de alojamiento de fluido 125. En primer lugar, la lámina 122 se encuentra únicamente en la zona de la abertura de paso 110 sobre la superficie de alojamiento de fluido 125. Esto tiene como consecuencia que el fluido 135 es desplazado desde la superficie de alojamiento de fluido 125 en dirección de las microcavidades 130, de tal manera que algunas de las microcavidades 130 se llenan con el fluido 135. Una dirección del movimiento del fluido 135 está representada con otra flecha.

45 Gracias a la presión, la lámina 122 se abomba de forma continua en dirección de las microcavidades 130 hasta que está apoyada en toda la superficie sobre la superficie de alojamiento de fluido 125 y las microcavidades 130, tal como se muestra en la Fig. 1c.

La Fig. 1c muestra la unidad de análisis 100 en un estado completamente activado. En este caso, todas las microcavidades 130 están llenas de fluido 135 y cubiertas por la lámina 122.

5 La Fig. 2 muestra una representación de vista superior de una unidad de análisis 100 de acuerdo con un ejemplo de realización de la presente invención. El elemento de fondo 115 presenta un canal de fluido 200, que desemboca en la entalladura de fondo 120 y que está configurado para conducir el fluido sobre la superficie de alojamiento de fluido 125. Un eje de corte de las representaciones del corte transversal mostradas en las figuras 1a a 1c está indicado por una línea AA'.

10 De acuerdo con un ejemplo de realización de la presente invención, una estructura de capas de la unidad de análisis 100 se compone de un primer sustrato polimérico 105 con un orificio pasante 110, en cuyo lado inferior está colocada una membrana de polímero 122 que se puede desviar. Planoparalelo a esta estructura está dispuesto un segundo sustrato polimérico 115 que lleva una matriz de microcavidades 130. Gracias a esta disposición se realiza un canal microfluídico como canal de fluido 200, que se ensancha hasta dar una cámara plana 120 en la que se encuentra la matriz de cavidades, denominada también disposición de microcavidades 130.

15 El sustrato polimérico 105 se puede denominar también elemento de tapa 105, el orificio pasante 110 también canal de presión 110 o abertura de paso, el segundo sustrato polimérico 115 también elemento de fondo 115, la membrana de polímero 122 que se puede desviar también lámina 122 o membrana 122 y la cámara plana 120 también entalladura de fondo 120.

20 Para dejar que el proceso de desviación de la membrana de polímero 122 transcurra de forma controlada de izquierda a derecha es particularmente ventajoso generar entre la membrana de polímero 122 y el sustrato polimérico 105 una unión adherente que está realizada de tal modo que la unión se deshace por la exposición a presión en primer lugar en la zona del orificio pasante 110 y a continuación lentamente de izquierda a derecha. Una unión reversible de forma única de este tipo se puede realizar, por ejemplo, mediante soldadura por irradiación con láser.

25 De acuerdo con otro ejemplo de realización está integrada una matriz de cavidades 130 en una estructura de capas polimérica. La membrana 122 que se puede desviar de la estructura se usa para rellenar la matriz de cavidades con una solución de muestra 135 que se va a examinar y, al mismo tiempo, para cubrir la matriz y estanqueizar las cavidades de matriz 130. La solución de muestra 135 se puede denominar también fluido 135, volumen de muestra 135 o muestra 135. A este respecto, la matriz de cavidades se encuentra en el mismo plano que los canales 200 microfluídicos. La membrana 122 se encuentra por encima.

30 La solución de muestra 135 se conduce a través de un canal a un canto de la matriz y allí se detiene. Mediante desviación de la membrana 122 elástica, el menisco de la solución de muestra 135 se empuja de forma controlada sobre la matriz de cavidades, llenándose por capilaridad las cavidades 130, como se muestra a modo de ejemplo en las Figuras 1 b y 1c.

35 Durante la reacción en cadena de la polimerasa, la membrana 122 permanece desviada o descendida, por lo que se conserva una matriz de cavidades 130 para reacciones en cadena de la polimerasa independientes.

40 Otro ejemplo de realización de la presente invención prevé una inclusión de la matriz de cavidades en sistemas de laboratorio en un chip para la detección de ácidos nucleicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa digital. Un sistema de este tipo en forma de un chip microfluídico con matriz de cavidades integrada permite la realización de una preparación de muestra junto con una reacción en cadena de la polimerasa digital pospuesta en un sistema de varias capas de laboratorio en un chip polimérico.

Por ello se producen las siguientes ventajas:

Junto con una preparación de muestra realizada en el mismo sistema de laboratorio en un chip se da un sistema de diagnóstico completamente integrado, que puede detectar en concentraciones mínimas las moléculas de ADN.

45 La membrana de polímero 122 flexible de la estructura de varias capas permite un llenado controlado y automatizado de las cavidades 130. Así se descartan errores de manejo y se puede prescindir de personal con formación especializada para rellenar las cavidades 130.

50 Gracias a la sensibilidad de la reacción en cadena de la polimerasa digital se amplía el campo de aplicación de sistemas de laboratorio en un chip, por ejemplo, al diagnóstico prenatal no invasivo, la detección de células tumorales circulantes o ADN tumoral acelular, la detección de mutaciones puntuales para la medicina personalizada así como la detección de cambios mínimos en la expresión génica.

La combinación de la preparación de muestra y reacción en cadena de la polimerasa digital ahorra etapas manuales de manejo y tiempo.

Se puede reducir un riesgo de contaminación por productos arrastrados de la reacción en cadena de la polimerasa debido a que no se tienen que transferir manualmente productos purificados.

- 5 De acuerdo con el estado de la técnica se pueden detectar moléculas de ADN en un procedimiento de dos etapas de reacción en cadena de la polimerasa de punto final y posterior análisis de micromatriz. En comparación con esto, el procedimiento propuesto ofrece un desarrollo más rápido del proceso y una conducción simplificada del proceso.

10 La Fig. 3 muestra una representación de vista superior de una unidad de análisis 100 de acuerdo con un ejemplo de realización de la presente invención. A diferencia de la Fig. 2, la unidad de análisis 100 representada en la Fig. 3 presenta un elemento de separación 300 opcional. El elemento de separación 300 está dispuesto transversalmente con respecto a la línea AA'. De acuerdo con este ejemplo de realización, el elemento de separación 300 está configurado como acanaladura en el elemento de fondo 115, extendiéndose la acanaladura a lo largo de toda la anchura de la entalladura de fondo 120. Además, el elemento de separación 300 está dispuesto a lo largo de un canto adyacente a la superficie de alojamiento de fluido 125 de la disposición de microcavidades 130.

- 15 El elemento de separación 300 está configurado para evitar un movimiento del fluido de la superficie de alojamiento de fluido 125 a las microcavidades 130 antes de aplicar la presión en la abertura de paso.

Las Figuras 4a y 4b muestran representaciones del corte transversal de un elemento de fondo 115 con un elemento de separación 300 de acuerdo con distintos ejemplos de realización de la presente invención.

20 La Fig. 4a muestra un ejemplo de realización en el que el elemento de separación 300, tal como se muestra en la Fig. 3, está configurado como acanaladura o surco.

La Fig. 4b muestra un ejemplo de realización en el que el elemento de separación 300, a diferencia de las Figuras 3 y 4a, está aplicado como tira hidrófoba en una zona, adyacente a las microcavidades 130, de la superficie de alojamiento de fluido 125.

25 De acuerdo con distintos ejemplos de realización de la presente invención, un canto izquierdo de la matriz de cavidades presenta una característica como elemento de separación 300 que condiciona una detención definida del volumen de muestra. La característica puede estar realizada, por un lado, como elemento de detención hidrófobo, tal como se muestra en la Fig. 4b, por otro lado, como elemento de detención geométrico, por ejemplo como un surco mostrado en las Figuras 3 y 4a. Gracias a esta configuración se puede conseguir un punto de partida definido para la distribución del volumen de muestra sobre las cavidades 130.

30 La Fig. 5 muestra una representación del corte transversal de una unidad de análisis 100 de acuerdo con un ejemplo de realización de la presente invención. A diferencia de las Figuras 1a a 4b que se han descrito anteriormente, la superficie de alojamiento de fluido 125 mostrada en la Fig. 5 desde la zona del canal de presión 110 hasta la zona de borde de la superficie de alojamiento de fluido 125 está cubierta con una capa de fibras 500 compresible. La capa de fibras 500 está configurada para absorber el fluido y para ser comprimida al aplicar la presión en el canal de presión 110 por la lámina de tal modo que se vuelve a ceder el fluido en dirección de las microcavidades 130.

35 En otra forma de realización, partes del canal y de la cámara plana contienen un no tejido absorbente como capa de fibras 500, también denominado esponja. Esto tiene la ventaja de que la esponja puede absorber un volumen definido. Mediante accionamiento de la membrana de polímero se puede cargar el volumen que se encuentra el no tejido en la matriz de cavidades. Por ello se define no solo un punto de partida para el llenado, sino que se mide también simultáneamente un volumen de muestra.

40 La Fig. 6 muestra una representación del corte transversal de una unidad de análisis 100 de acuerdo con un ejemplo de realización de la presente invención. A diferencia de las figuras que se han descrito anteriormente, el elemento de fondo 115 mostrado en la Fig. 6 presenta en la zona de las microcavidades 130 un espesor de pared que es menor que un espesor de pared restante del elemento de fondo 115. Por ello se posibilita un acceso más sencillo a las microcavidades 130, por ejemplo para atemperar y/o analizar el fluido contenido en las microcavidades 130.

45 Opcionalmente está configurado un adelgazamiento como escotadura 600 del sustrato polimérico 115 por debajo de la matriz de cavidades. En primer lugar, por ello se puede aportar energía térmica para la realización de la reacción en cadena de la polimerasa controlada por temperatura rápidamente a la zona de la matriz de cavidades. En segundo lugar, por ello se puede colocar una óptica de lectura con una distancia física reducida con respecto a la matriz de cavidades, por lo que se reduce la proporción de absorción del sustrato polimérico 115.

Las Figuras 7a y 7b muestran representaciones del corte transversal de una unidad de análisis 100 de acuerdo con un ejemplo de realización de la presente invención. La lámina 122 representada en las Figuras 7a y 7b presenta, a diferencia de las figuras que se han descrito anteriormente, una capa aislante 700 adicional. De acuerdo con este ejemplo de realización, la capa aislante 700 está configurada entre la lámina 122 y el elemento de tapa 105. En este caso se extiende la capa aislante 700 desde la zona de la abertura de paso 110 hasta una zona de borde opuesta a la abertura de paso 110 de la disposición de microcavidades 130. La capa aislante 700 está configurada para reducir la permeabilidad a vapor de la lámina 122.

La Fig. 7a muestra la lámina 122 en un estado no desviado. La Fig. 7b muestra la lámina 122 en un estado desviado, como ya se ha descrito mediante las Figuras 1a a 1c.

Entre el sustrato polimérico 105 y la membrana de polímero 122 está configurada, adicionalmente o como alternativa, una delgada capa de parafina como capa aislante 700. Después de la desviación de la membrana 122 y la fusión de la capa de parafina, la membrana 122 desviada se recubre con la parafina, tal como se muestra en la Fig. 7b. La barrera de vapor realizada de este modo tiene la ventaja de que no necesita el uso de medios líquidos y se activa automáticamente cuando el sistema durante el funcionamiento se somete a temperatura. Esto además tiene la ventaja de que durante la producción la capa de parafina se puede incorporar como cuerpo sólido, por lo que se omite la dispensación de sustancias líquidas.

De acuerdo con otro ejemplo de realización, la superficie de la membrana de polímero 122 está revestida de tal modo que se reduce la permeabilidad a vapor. Aquí se pueden aplicar todas las técnicas conocidas por el estado de la técnica. Estas son por ejemplo procesos de la deposición química de vapor (*chemical vapour deposition*; CVD) o de la deposición física de vapor (*physical vapour deposition*; PVD).

Adicionalmente, la membrana de polímero 122 puede estar realizada como combinación de varias capas. Gracias a una selección y composición de materiales adecuados se puede reducir con ello la permeabilidad a vapor. Esta forma de realización tiene en particular la ventaja de que el contenido de las cavidades 130 se hermetiza aún mejor y con ello aumenta la fiabilidad del sistema.

La Fig. 8 muestra una representación del corte transversal de una unidad de análisis 100 de acuerdo con un ejemplo de realización de la presente invención. La lámina 122 está mostrada en la Fig. 8 en un estado desviado. En este sentido, las microcavidades 130 están cerradas de forma estanca a fluido por la lámina 122. De acuerdo con este ejemplo de realización, la unidad de análisis 100 está equipada con un medio no representado en el presente documento para la aplicación de una presión en el canal de presión 110. El medio está configurado para bombear un líquido 800 a través del canal de presión 110, de tal manera que se abomba la lámina 122 por la presión del líquido 800. Por ello, un espacio hueco que se produce por el abombamiento de la lámina 122 entre la lámina 122 y el elemento de tapa 105 en este caso se llena por el líquido 800.

Mediante un recubrimiento de la membrana de polímero 122 desviada con un medio 800 líquido, denominado también líquido 800, suministrado desde el exterior, se puede reducir adicionalmente la evaporación del volumen de muestra 135 que se encuentra en las cavidades 130. En esta forma de realización se puede prescindir de un revestimiento o de una estructura de capas especial de la membrana de polímero 122.

El medio líquido 800 puede ser por ejemplo agua. Con una naturaleza correspondiente de la membrana 122, en este caso es posible un intercambio de líquidos de agua a través de la membrana 122. Las cavidades 130 durante una reacción en cadena de la polimerasa no se secan, ya que se evita una pérdida de líquido por difusión de agua a través de la membrana 122.

El medio líquido 800 puede ser también aceite, barniz fotosensible o un adhesivo que se puede activar por UV o térmicamente. Mediante el recubrimiento de la membrana de polímero 122 desviada con el medio 800 se realiza una barrera líquida de difusión y se evita de este modo la pérdida de líquido.

La Fig. 9 es una representación del corte transversal de una unidad de análisis 100 de acuerdo con un ejemplo de realización de la presente invención. En este caso, la unidad de análisis 100 comprende un recipiente de fluido 900 como otra entalladura de fondo 905 en el elemento de fondo 115. Entre la otra entalladura de fondo 905 y el elemento de tapa 105 está dispuesta la lámina 122. El recipiente de fluido 900 está lleno de un líquido y está cerrado de forma estanca a fluido por la lámina 122. El elemento de tapa presenta en la zona del recipiente de fluido 900 otro canal de presión 910. De acuerdo con este ejemplo de realización, el otro canal de presión 910 está realizado como otra abertura de paso en el elemento de tapa 105. Además, en el elemento de tapa 105 está configurado un canal de unión 915 para acoplar de forma fluidica el recipiente de fluido 900 y el canal de presión 110.

Como se muestra en la Fig. 9, por el otro canal de presión 910 se puede ejercer por ejemplo mediante una bomba (no representada) una presión sobre la lámina 122, de tal manera que se desvía la lámina 122 en la zona del recipiente de fluido 900. Mediante el líquido se conduce la presión a través del canal de unión 915 y el canal de

presión 110 a una parte de la lámina 122 se encuentra en la zona de la entalladura de fondo 120, de tal manera que la lámina 122 se desvía también en esta zona. En este caso se presiona el fluido al interior de las microcavidades 130.

5 Un ejemplo de realización de la presente invención prevé una integración de un depósito como recipiente de fluido 900 para el medio líquido 800 descrito mediante la Fig. 8. Gracias a la exposición de este depósito a presión se conduce el medio 800 al canal de suministro 915, denominado también canal de unión 915. El medio 800 desvía entonces la membrana de polímero 122, por lo que se cierra a su vez de forma estanca a vapor la matriz de cavidades.

10 Esta realización tiene la ventaja de que el medio no se tiene que suministrar desde el exterior, lo que facilita la conducción del proceso. Ya que el medio 800 en esta forma de realización no tiene acceso directo al mundo exterior, además resulta la ventaja adicional de que el medio 800, incluso después del final del proceso, con la retirada de todas las presiones de accionamiento no puede salir y, por ejemplo, ensuciar una unidad de control externa.

15 La Fig. 10 muestra un diagrama de desarrollo de un procedimiento 1000 para hacer funcionar una unidad de análisis de acuerdo con un ejemplo de realización de la presente invención. En una etapa 1005 se aplica en primer lugar un fluido sobre la superficie de alojamiento de fluido. A continuación, en una etapa 1010 se realiza la aplicación de una presión en el canal de presión para mover el fluido desde la superficie de alojamiento de fluido a la disposición de microcavidades.

20 De acuerdo con un ejemplo de realización de la presente invención, el volumen de muestra 135 que se va a examinar se conduce al canal 200 y una parte de la cámara plana 120 y se detiene allí. Al orificio pasante 110 se aplica una sobrepresión, por lo que se desvía la membrana de polímero 122. A este respecto, la membrana de polímero 122 desciende de izquierda a derecha. Por ello se mueve el volumen de muestra 135 situado por debajo en dirección de la matriz de cavidades 130, tal como se representa en la Fig. 1b. En cuanto la membrana 122 ha descendido por completo, todas las cavidades 130 se han llenado por capilaridad con la muestra 135 (véase las Figuras 1c, 7b y 8). Durante la realización de la reacción en cadena de la polimerasa, la membrana 122 permanece descendida, por lo que quedan cerradas las cavidades 130.

30 La Fig. 11 muestra un diagrama de desarrollo de un procedimiento 1100 para la producción de una unidad de análisis de acuerdo con un ejemplo de realización de la presente invención. En una etapa 1105 se facilitan un elemento de fondo con al menos una entalladura de fondo, que presenta una superficie de alojamiento de fluido y una disposición de microcavidades, un elemento de tapa con al menos un canal de presión, que está configurado para conducir una presión a la zona de la superficie de alojamiento de fluido, así como una lámina. En este caso, la lámina está configurada para ser deformada al conducir la presión a la zona de la superficie de alojamiento de fluido por la presión de tal modo que un fluido se mueve de la superficie de alojamiento de fluido a la disposición de microcavidades.

35 En otra etapa 1110 se realiza la unión del elemento de tapa, del elemento de fondo y de la lámina. En este caso, la unión se realiza de tal modo que la entalladura de fondo se encuentra opuesta al elemento de tapa y la lámina está dispuesta en la zona de la entalladura de fondo entre el elemento de tapa y el elemento de fondo.

Finalmente, en una etapa 1115 se forma al menos un canal de fluido entre el elemento de tapa y el elemento de fondo para conducir el fluido sobre la superficie de alojamiento de fluido de la entalladura de fondo.

40 Las estructuras necesarias en los sustratos poliméricos 105, 115 se pueden generar, por ejemplo, mediante fresado, moldeo por inyección, gofrado en caliente o estructuración con láser. La matriz de cavidades puede estar conformada directamente en el polímero o introducirse como pieza de inserción, fabricada por ejemplo a partir de vidrio, en la estructura de capas de polímero.

45 Como ejemplos de material se pueden emplear para el sustrato polimérico termoplásticos, tales como por ejemplo policarbonato (PC), polipropileno (PP), polietileno (PE), polimetilmetacrilato (PMMA), polímero de ciclopolefina (COP) o copolímero de ciclopolefina (COC) y para la membrana de polímero elastómero, elastómero termoplástico a base de uretano (TPU), copolímeros de bloques de estireno (TPS), termoplásticos, láminas termoadhesivas o láminas de sellado para placas de microtitulación.

50 Como dimensiones ilustrativas de los ejemplos de realización, el espesor del sustrato polimérico puede ascender a de 0,5 a 5 mm, el diámetro de canal en los sustratos poliméricos de 10 μm a 3 mm, el espesor de la membrana de polímero de 5 a 500 μm y las dimensiones laterales de todo el ejemplo de realización a de 10 x 10 mm^2 a 200 x 200 mm^2 .

El volumen de las cavidades de la matriz puede ser de 1 fl a 100 μl .

La cantidad de las cavidades puede ascender por ejemplo a de 10^1 a 10^9 .

5 Los ejemplos de realización descritos y mostrados en las figuras están seleccionados solo a modo de ejemplo. Diferentes ejemplos de realización se pueden combinar por completo o en relación con características individuales entre sí. También se puede complementar un ejemplo de realización por características de otro ejemplo de realización.

Además, las etapas del procedimiento de acuerdo con la invención se pueden repetir y realizar en un orden diferente al descrito.

10 Si un ejemplo de realización comprende una conjunción "y/o" entre una primera característica y una segunda característica, esto se ha de leer de modo que el ejemplo de realización de acuerdo con una forma de realización presenta tanto la primera característica como la segunda característica y, de acuerdo con otra forma de realización, o bien solo la primera característica o bien solo la segunda característica.

REIVINDICACIONES

1. Unidad de análisis (100) para llevar a cabo una reacción en cadena de la polimerasa, presentando la unidad de análisis (100) las siguientes características:

un elemento de tapa (105);

5 un elemento de fondo (115) con al menos una entalladura de fondo (120), presentando la entalladura de fondo (120) una superficie de alojamiento de fluido (125) y una disposición de microcavidades (130), estando dispuesta la entalladura de fondo (120) opuesta al elemento de tapa (105);

al menos un canal de fluido (200) que está configurado entre el elemento de tapa (105) y el elemento de fondo (115) para conducir un fluido (135) sobre la superficie de alojamiento de fluido (125) de la entalladura de fondo (120);

10 al menos un canal de presión (110) que está configurado en el elemento de tapa (105) para conducir una presión a una zona de la superficie de alojamiento de fluido (125); y

15 una lámina (122) que está dispuesta en la zona de la entalladura de fondo (120) entre el elemento de tapa (105) y el elemento de fondo (115), estando configurada la lámina (122) para deformarse, al conducir la presión a la zona de la superficie de alojamiento de fluido (125), por la presión de tal forma que el fluido (135) se mueve de la superficie de alojamiento de fluido (125) a la disposición de microcavidades (130).

2. Unidad de análisis (100) de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** el canal de presión (110) está configurado como abertura de paso en el elemento de tapa (105), estando dispuesta la entalladura de fondo (120) de tal modo que la superficie de alojamiento de fluido (125) se encuentra opuesta a la abertura de paso y la disposición de microcavidades (130) está desplazada lateralmente con respecto a la abertura de paso.

20 3. Unidad de análisis (100) de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada por que** la lámina (122) está fijada al menos en la zona de la superficie de alojamiento de fluido (125) y/o en la zona de la disposición de microcavidades (130) de forma separable en el elemento de tapa (105).

25 4. Unidad de análisis (100) de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada por que** la lámina (122) está configurada además para ser deformada por la presión de tal manera que se cierra de forma estanca a fluido la disposición de microcavidades (130).

30 5. Unidad de análisis (100) de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada por que** entre la disposición de microcavidades (130) y la superficie de alojamiento de fluido (125) está configurado un elemento de separación (300) para evitar un movimiento del fluido (135) de la superficie de alojamiento de fluido (125) a la disposición de microcavidades (130) antes de la conducción de la presión a la zona de la superficie de alojamiento de fluido (125).

6. Unidad de análisis (100) de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada por que** la superficie de alojamiento de fluido (125) está cubierta al menos en parte con una capa de fibras (500) compresible para la absorción y/o la cesión del fluido (135).

35 7. Unidad de análisis (100) de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada por que** el elemento de fondo (115) presenta en la zona de la disposición de microcavidades (130) un espesor máximo predeterminado.

8. Unidad de análisis (100) de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada por que** la lámina (122) presenta al menos en la zona de la disposición de microcavidades (130) una capa aislante (700) y/o está configurada como compuesto de varias capas para reducir una permeabilidad a vapor de la lámina (122).

40 9. Unidad de análisis (100) de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizada por que** la capa aislante (700) está configurada en un lado de la lámina (122) dirigido al elemento de tapa (105), estando formada en particular la capa aislante (700) de parafina.

45 10. Unidad de análisis (100) de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada por que** un recipiente de fluido (900) está configurado como otra entalladura de fondo (905) en el elemento de fondo (115), estando configurado al menos otro canal de presión (910) en el elemento de tapa (105) para conducir una presión al recipiente de fluido (900), estando configurado al menos un canal de unión (915) en el elemento de tapa (105) para acoplar fluidicamente el recipiente de fluido (900) y el canal de presión (110), estando configurado el recipiente de fluido (900) para conducir la presión a través del canal de unión (915) y el canal de presión (110) a la zona de la

superficie de alojamiento del fluido (125).

11. Unidad de análisis (100) de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizada por** un medio que está configurado para aplicar una presión en el canal de presión (110) y/o el otro canal de presión (910).

5 12. Procedimiento (1000) para hacer funcionar una unidad de análisis (100) de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 11, comprendiendo el procedimiento (1000) las siguientes etapas:

aplicación (1005) de un fluido (135) sobre la superficie de alojamiento de fluido (125); e

introducción (1010) de una presión en el canal de presión (110) para mover el fluido (135) de la superficie de alojamiento de fluido (125) a la disposición de microcavidades (130).

10 13. Procedimiento (1100) para la producción de una unidad de análisis (100) de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 11, comprendiendo el procedimiento (1100) las siguientes etapas:

15 facilitación (1105) de un elemento de fondo (115) con al menos una entalladura de fondo (120), que presenta una superficie de alojamiento de fluido (125) y una disposición de microcavidades (130), un elemento de tapa (105) con al menos un canal de presión (110) que está configurado para conducir una presión a la zona de la superficie de alojamiento de fluido (125), así como una lámina (122) que está configurada para deformarse durante la conducción de la presión a la zona de la superficie de alojamiento de fluido (125) por la presión de tal modo que se mueve un fluido (135) de la superficie de alojamiento de fluido (125) a la disposición de microcavidades (130);

20 unión (1110) del elemento de tapa (105), del elemento de fondo (115) y de la lámina (122), realizándose la unión (1110) de tal modo que la entalladura de fondo (120) se encuentra opuesta al elemento de tapa (105) y la lámina (122) está dispuesta en la zona de la entalladura de fondo (120) entre el elemento de tapa (105) y el elemento de fondo (115); y

formación (1115) de al menos un canal de fluido (200) entre el elemento de tapa (105) y el elemento de fondo (115) para conducir el fluido (135) sobre la superficie de alojamiento de fluido (125) de la entalladura de fondo (120).

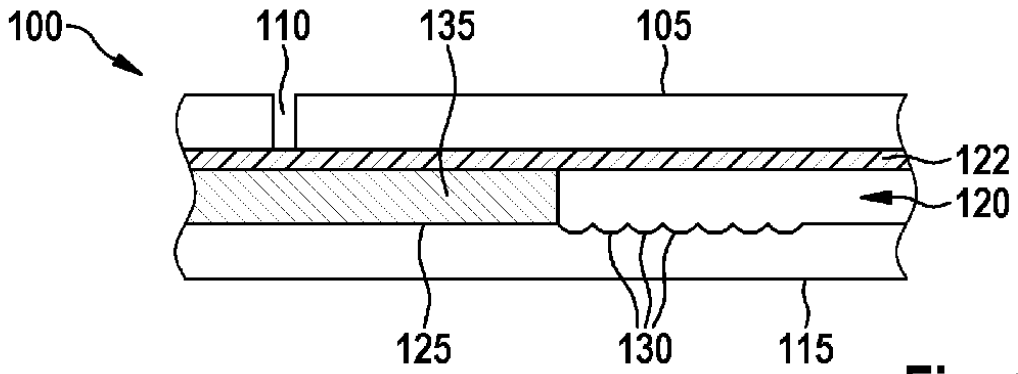


Fig. 1a

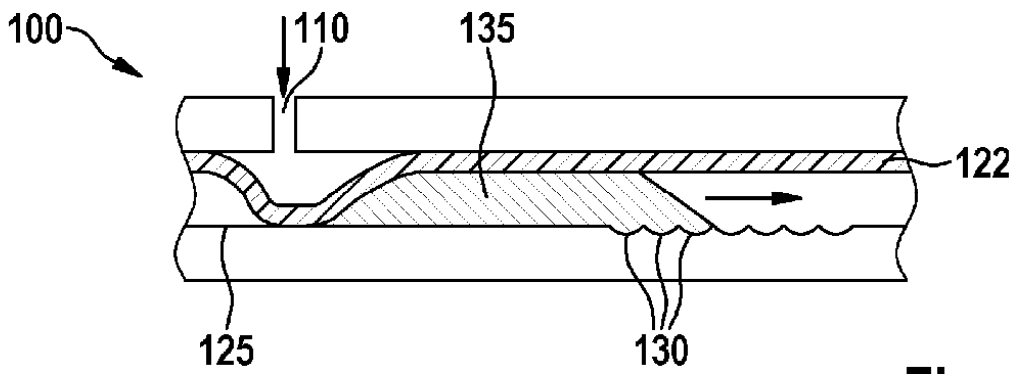


Fig. 1b

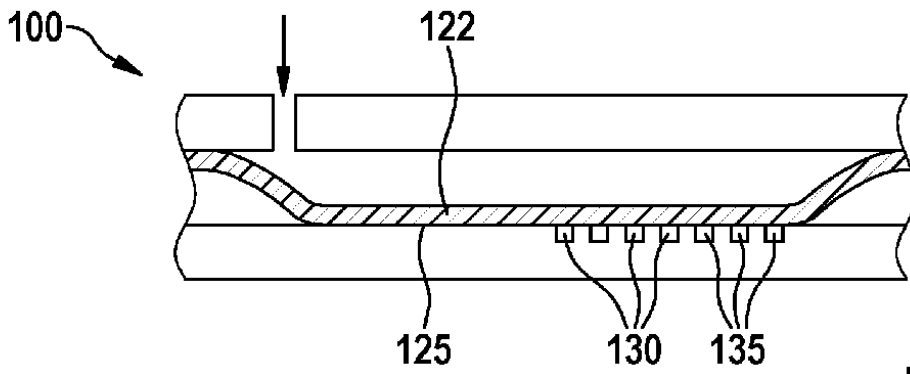


Fig. 1c

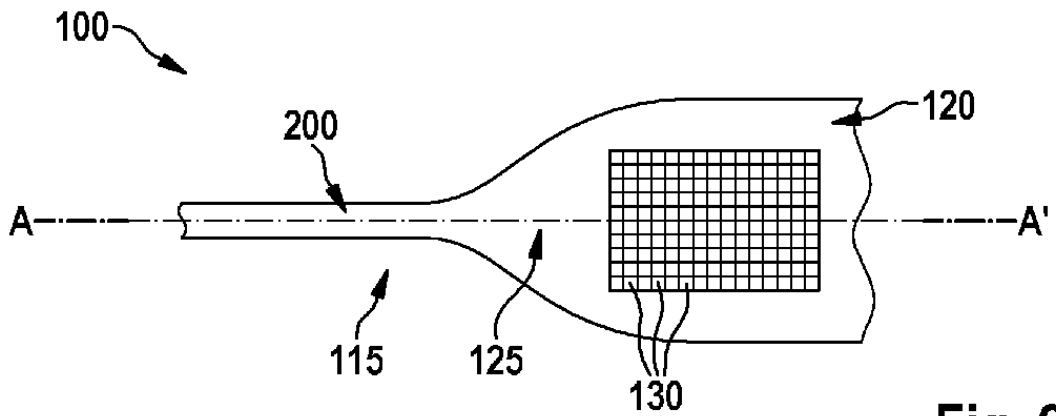


Fig. 2

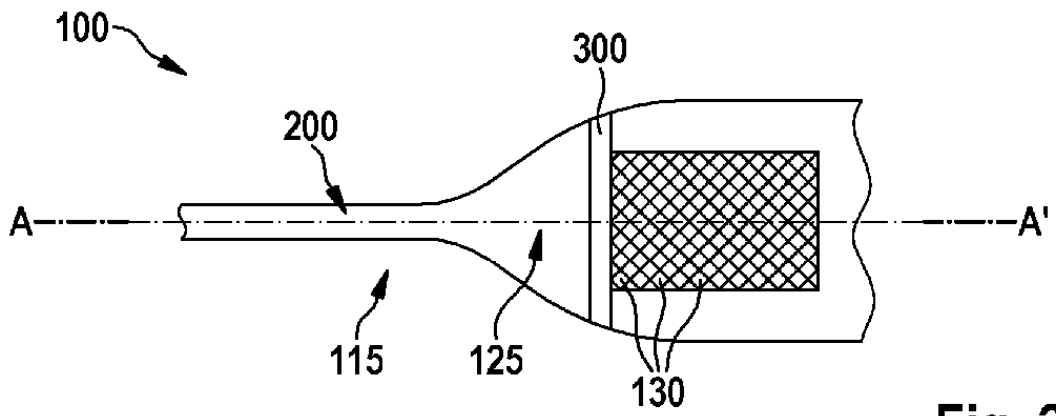


Fig. 3



Fig. 4a

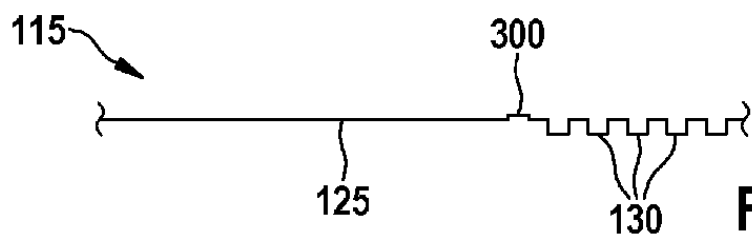


Fig. 4b

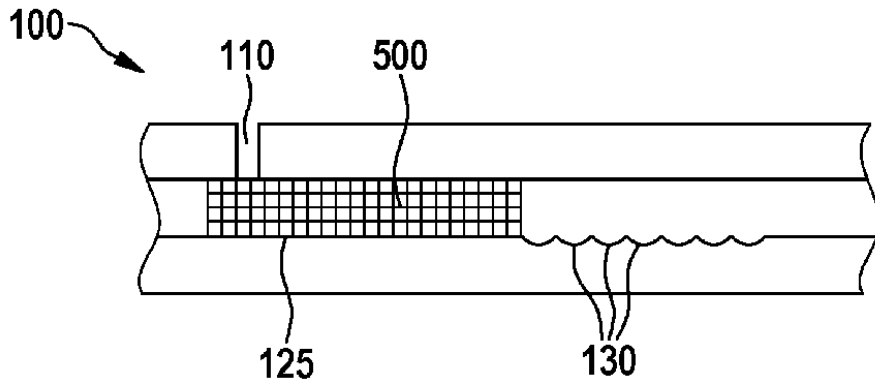


Fig. 5

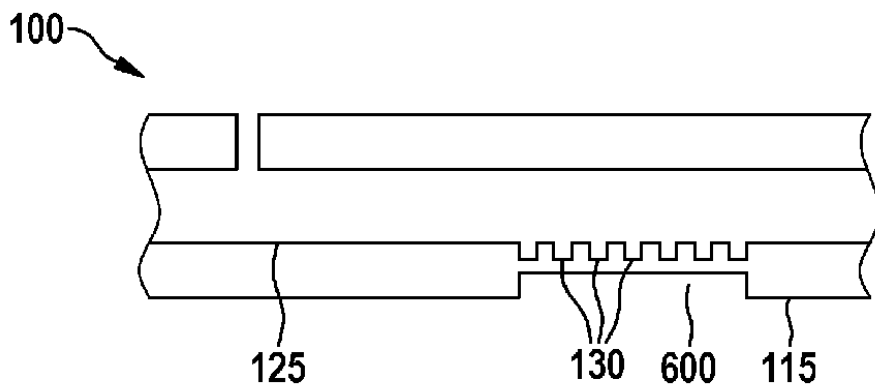


Fig. 6

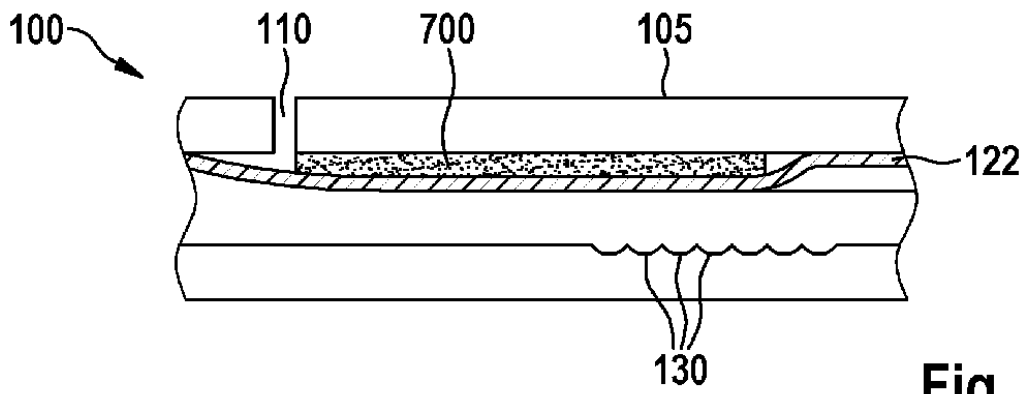
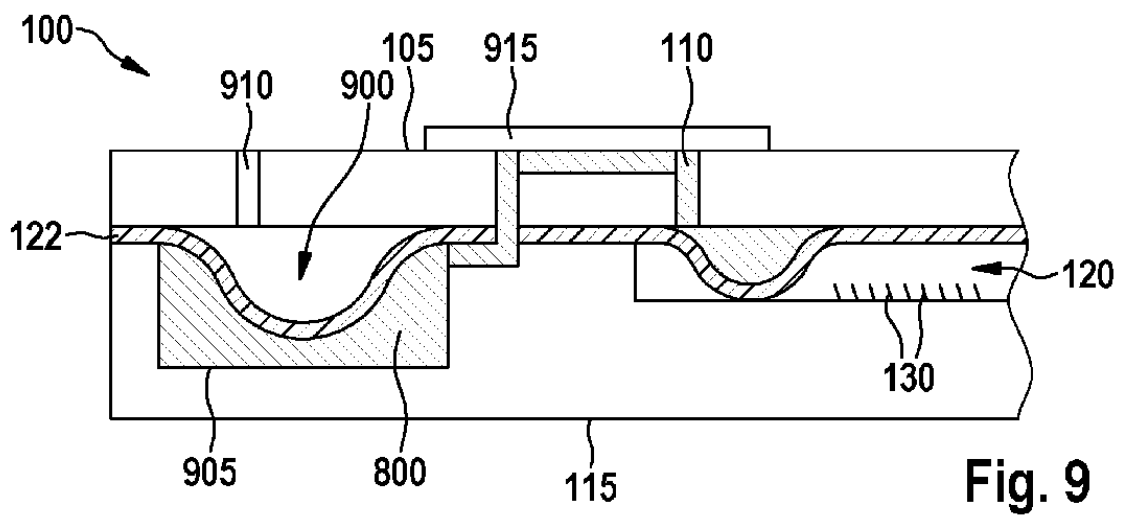
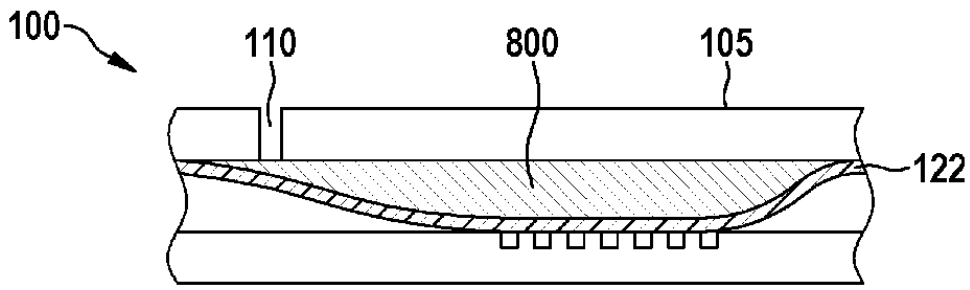
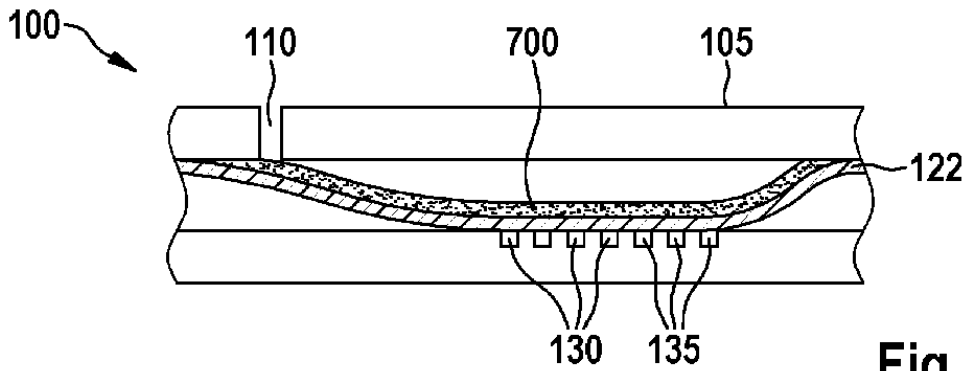


Fig. 7a



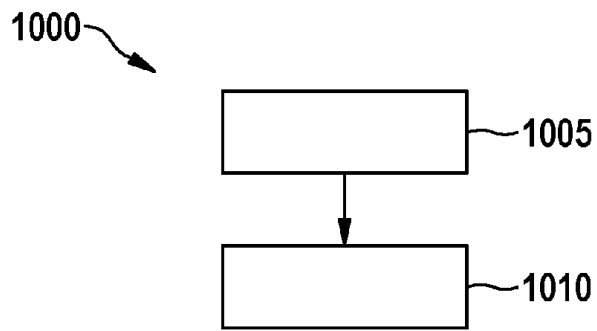


Fig. 10

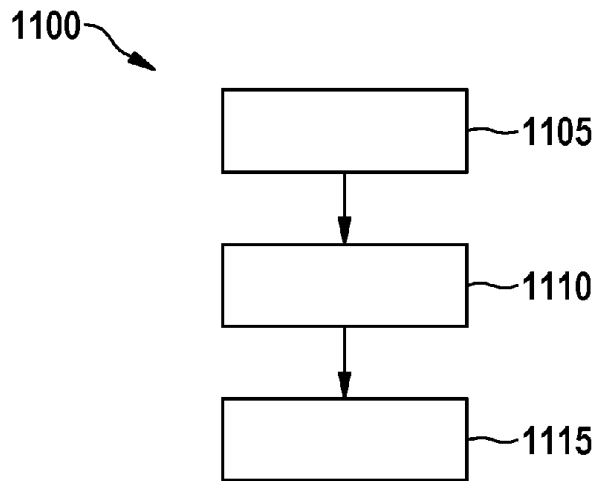


Fig. 11