

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 475**

51 Int. Cl.:

**B01L 3/00** (2006.01)

**B01F 5/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2013 PCT/GB2013/050832**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13144643**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2013 E 13717299 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2830766**

54 Título: **Dispositivo y sistema biosensor**

30 Prioridad:

**28.03.2012 GB 201205497**

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

**18.05.2018**

73 Titular/es:

**DNAE GROUP HOLDINGS LIMITED (100.0%)  
Ugli Campus Block C, 56 Wood Lane  
London W12 7SB, GB**

72 Inventor/es:

**ATHANASIOU, PANTELEIMON;  
PATEL, ALPESH;  
WHITAKER, DAVID;  
BAI, HUA;  
PALMER-FELGATE, JOHN;  
COOMBER-ALFORD, DANIEL;  
REED, SAM;  
FISHER, JESSICA;  
SCHNEIDER, CHAD;  
FLAMM, ALEX y  
LANE, BEN**

74 Agente/Representante:

**RIZZO, Sergio**

ES 2 668 475 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

Dispositivo y sistema biosensor

## CAMPO DE LA INVENCION

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a un método, dispositivo y sistema para tratar una muestra de fluido que va a analizarse con un biosensor. La invención es especialmente relevante para fluido corporal animal y muestras de plantas para su uso en análisis y diagnóstico de ácido nucleico.

## ANTECEDENTES

- 10 **[0002]** El análisis de muestras biológicas es normalmente un proceso que consta de varias fases que se lleva a cabo en el laboratorio por técnicos expertos. El siguiente proceso de trabajo contempla una prueba de ADN para un paciente humano. La muestra biológica debe primero extraerse del donante empleando un hisopo o un vial de muestreo. El hisopo para extraer tejido bucal es una espuma de célula abierta que atrapa las células del donante entre las células de la espuma. La espuma se sumerge entonces y se agita en un fluido para liberar las células biológicas. Se añade una serie de reactivos\* para (a) romper las células y liberar el ADN; (b) purificar el ADN liberado y (c) mezclar el ADN con reactivos para su amplificación (pH, soluciones tampón, agentes estabilizadores, polimerasa, cebadores, sondas, gotas, nucleótidos, etc.). Estos reactivos se añaden por pipeteo manual o bien en un proceso automatizado en ensayos de lotes. En un momento determinado, es conveniente separar las partículas no deseadas (alimentos, restos celulares, etc.). Esto puede llevarse a cabo mediante un tamiz mecánico o por centrifugación. A continuación, el ADN puede analizarse empleando técnicas conocidas como la secuenciación de Sanger, la secuenciación por síntesis o la PCR en tiempo real. El proceso completo es bastante complejo y requiere la participación de expertos que utilicen equipos caros para proporcionar un resultado, que normalmente tarda de horas a días en remitirse a la persona que ha solicitado la prueba.

**[0003]** En el documento EP0347579 se describen dispositivos para tratar una muestra de fluido que será analizada con un biosensor.

- 25 **[0004]** Los autores observaron que era conveniente sustituir el sistema de análisis anterior por un dispositivo simple y barato que no necesita las habilidades de un especialista para su funcionamiento o interpretación. Por tanto, han diseñado un dispositivo que se describe a continuación que pueden utilizar manualmente usuarios no profesionales.

## SUMARIO DE LA INVENCION

- 30 **[0005]** De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un cartucho para detectar muestras biológicas y que está configurado para interactuar con un dispositivo externo, comprendiendo el cartucho: una carcasa; un chip semiconductor con un conjunto de sensores integrados en el mismo; un bloque de sellado separado del chip para formar un espacio entre ellos; un conjunto de pocillos abiertos por un lado para recibir las muestras, donde el bloque de sellado y el chip

- 35 están dispuestos para desplazarse uno con respecto al otro entre una posición de no sellado y una posición de sellado para cerrar el espacio con el fin de aislar los pocillos entre sí; y caracterizado por un activador dispuesto para desplazar el bloque de sellado a la posición de sellado mientras se elimina el cartucho del dispositivo externo.

**[0006]** El cartucho puede comprender un conjunto de electrodos expuestos hacia los pocillos.

**[0007]** El cartucho puede comprender sistemas de inclinación para separar el bloque de sellado del chip semiconductor en la posición de no sellado.

- 40 **[0008]** El cartucho puede comprender un disipador de calor conectado al chip semiconductor.

**[0009]** El cartucho puede comprender un puerto en la carcasa para recibir una muestra de fluido.

**[0010]** El cartucho puede comprender un puerto en la carcasa para recibir y dirigir flujo de aire al chip semiconductor y/o a un disipador de calor.

**[0011]** El cartucho puede comprender un conector mecánico para conectar el cartucho al dispositivo externo.

- 45 **[0012]** El cartucho puede comprender un conector eléctrico (83) para conectar el chip semiconductor a un circuito externo.

**[0013]** El espacio puede establecerse para proporcionar una fuerza capilar para contener el fluido sobre los sensores.

**[0014]** El cartucho puede comprender una falda flexible que rodea al menos parte del chip semiconductor para contener el exceso de fluido.

5 **[0015]** El conjunto de pocillos para microfluidos puede estar provisto de aberturas en un sustrato plano, preferentemente donde el sustrato comprende una placa de circuito impreso (PCB, por sus siglas en inglés), más preferentemente una PCB flexible.

**[0016]** El cartucho puede comprender un agente humectante que recubre una superficie de los pocillos.

**[0017]** Cada pocillo puede comprender un reactivo cubierto por o fijado en una sustancia fundible, preferentemente donde la sustancia fundible es una cera.

**[0018]** El cartucho puede comprender un calentador para proporcionar calor a la sustancia fundible.

10 **[0019]** De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un método para detectar muestras biológicas que comprende: proporcionar un dispositivo de preparación de muestras unido a un cartucho sensor; poner en funcionamiento el dispositivo de preparación de muestras para dispensar la muestra de fluido en el cartucho sensor; y retirar el cartucho sensor del dispositivo de preparación de muestras, desplazando en este paso el bloque de sellado y el chip, uno con respecto al otro, entre una posición de no sellado y una posición de sellado  
15 con el fin de cerrar el espacio para aislar los pocillos entre sí.

**[0020]** El método puede comprender la etapa de conexión del cartucho sensor a un analizador para recibir señales de los sensores y determinar una propiedad de la muestra.

Breve descripción de las imágenes

20 **[0021]** A continuación se describirán formas de realización concretas de la invención a modo de ejemplo y únicamente con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

La figura 1 muestra una vista de despiece de componentes de un sistema preferido;

La figura 2 muestra una vista de sección de un hisopo (a) con un cuello deslizante y (b) que es acogido por un embudo;

La figura 3 muestra una vista de sección de un hisopo en una posición comprimida;

25 La figura 4 muestra una vista de sección de un dispensador de fluido en una posición inicial;

La figura 5 es una imagen que representa una pluralidad de émbolos y cilindros;

La figura 6 es una imagen que representa émbolos y levas;

La figura 7 muestra una imagen de un conjunto de pistas de leva;

La figura 8 muestra una vista de sección de un émbolo y de un extremo de émbolo en cámaras;

30 La figura 9 muestra una vista de sección de una base con canales de fluido;

La figura 10 es una imagen de una base alternativa con canales de fluido;

La figura 11 es una imagen de cámaras de microfluidos expuestas a electrodos;

La figura 12 es una imagen de una estructura laminar comprendida en un chip sensor;

La figura 13 muestra una vista de sección de un dispositivo de preparación de muestras con un cartucho unido;

35 La figura 14 muestra una imagen de un dispositivo de preparación de muestras con un cartucho parcialmente unido;

La figura 15 muestra una imagen de un cartucho;

La figura 16 muestra una imagen de sección de un cartucho antes del accionamiento;

La figura 17 muestra una vista de sección de un cartucho durante el accionamiento;

40 La figura 18 muestra una vista de sección de un cartucho tras el accionamiento;

La figura 19 es un diagrama de flujo con los pasos para la extracción y el análisis de ácidos nucleicos a partir de tejidos o células;

La figura 20 muestra una imagen de una reacción química en la que participa una proteína;

La figura 21 muestra un cartucho unido a un analizador; y

La figura 22 muestra una vista de sección de un cartucho y un analizador.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

5 **[0022]** El sistema comprende un hisopo, un dispositivo de preparación de muestras, un cartucho sensor y un analizador.

#### RESUMEN DEL SISTEMA

10 **[0023]** En la figura 1 se muestra un sistema para extraer una muestra biológica. Este sistema ejemplar comprende un hisopo 1 para extraer una muestra de un animal (p. ej., humanos u otros mamíferos, incluyendo muestras que contienen patógenos); un dispositivo de preparación de muestras 70 para proporcionar la muestra en un formato utilizable; un cartucho sensor 80 para detectar propiedades de la muestra; y un analizador 110 que procesa las señales del sensor para proporcionar una salida al usuario o a otros dispositivos conectados.

15 **[0024]** El sistema puede ser flexible para funcionar con diversos tipos de muestras, reactivos, disposiciones de sensores, y analizadores de forma que se pueden obtener varias pruebas y diagnósticos a partir de diversas fuentes biológicas. Por ejemplo, puede tratarse de una muestra de varios fluidos corporales que contienen células o células raspadas de un órgano o de una infección, la cual, al mezclarse con los reactivos apropiados, proporciona ADN o ARN en un fluido en condiciones de uso (concentración, pH, tampón, etc.) para ser detectada por uno o varios sensores, preferentemente un conjunto de sensores, sensibles a una o varias propiedades. Algunos de los reactivos pueden ser reactivos analíticos específicos aislados entre sí mediante pocillos para microfluidos expuestos a sensores, para determinar las identidades de una pluralidad de bases de ácido nucleico del ADN o  
20 ARN. Para identificar las muestras, también pueden utilizarse otros reactivos específicos distintos de los ácidos nucleicos, como proteínas.

25 **[0025]** Los ácidos nucleicos, como ADN o ARN, pueden aislarse de tejido o células animales, tejido o células vegetales, células bacterianas, partículas virales o células infectadas con virus. La muestra puede adquirirse a partir de distintas fuentes, como sangre, saliva, materia fecal, disco de hoja o tierra. Se pueden adoptar métodos de extracción de ácidos nucleicos a partir de muestras no procesadas dependiendo de la fuente de la muestra y de si se necesita una etapa previa al procesamiento, como corte mecánico, sonicación o filtración de material insoluble. Los ácidos nucleicos extraídos pueden utilizarse para varias aplicaciones posteriores, como amplificación de ácido nucleico, secuenciación de ADN o cuantificación de ácido nucleico.

30 **[0026]** En la figura 19 se representan los pasos para la extracción y análisis de ácidos nucleicos a partir de tejidos o células. En ciertas aplicaciones, se pueden combinar algunas de las etapas. La primera etapa requiere lisar tejidos o células empleando medios químicos o enzimáticos (1). La lisis óptima se consigue mediante la combinación de una cantidad de muestra con tampón de lisis en una proporción óptima. Posteriormente, se puede añadir un estabilizador a la mezcla para prevenir la degradación de los ácidos nucleicos y proteger la integridad general del ácido nucleico (2). De forma alternativa, si es compatible, el estabilizador puede incorporarse al tampón de lisis. Dependiendo de la aplicación posterior, puede ser necesario aumentar la pureza de la mezcla de ácidos nucleicos mediante la eliminación de ácidos nucleicos no diana para alcanzar las condiciones de ensayo óptimas para las aplicaciones posteriores (3). Se puede aumentar la pureza de la mezcla de ácidos nucleicos mediante digestión enzimática, quelación y/o filtración de sustancias no deseadas/interferentes. Además, la mezcla de ácido nucleico resultante puede concentrarse o diluirse (4) y posteriormente combinarse con los reactivos de reacción apropiada (5) para aplicaciones posteriores (6) y para la detección (7). En una forma de realización, se pueden aislar otras biomoléculas, como proteínas, y analizarse empleando etapas similares a las del método descrito para el análisis de ácido nucleico.

45 **[0027]** Los métodos y los componentes de los tampones de lisis, estabilizadores, técnicas de purificación y reactivos de reacción variarán dependiendo de la fuente de las muestras, de las biomoléculas que se vayan a analizar (ADN, ARN o proteína) y de las aplicaciones posteriores. En la figura 19 se muestran los pasos para la extracción y análisis de ácidos nucleicos a partir de tejidos o células. Preferentemente, los primeros cuatro pasos se llevan a cabo en un dispositivo de preparación de muestras, y los dos últimos tienen lugar en un cartucho sensor. A continuación, se describe un ejemplo de un método de extracción de ADN a partir de saliva humana para una prueba de diagnóstico genético.

50 **[0028]** Se mezcla una cantidad de saliva con un tampón de lisis alcalina en una proporción predeterminada para obtener la lisis óptima en un pH favorable. El tampón de lisis alcalina comprende una base alcalina; un quelante de metal, como EDTA; y puede incluir uno o más detergentes no iónicos, como Triton-X 100. La base alcalina del tampón de lisis alcalina se utiliza para alterar la membrana celular, desnaturalizar proteínas, así como para ajustar el fluido de saliva extraído para obtener un pH óptimo para la amplificación y detección de ácido nucleico. La escala preferida de pH del tampón de lisis alcalina está entre pH 10-14.  
55

**[0029]** Para la amplificación de ácido nucleico, como amplificación de PCR o isotérmica como TMA, SDA, HDA, RPA, NASBA o LAMP, se combina una parte específica de la mezcla de saliva/tampón de lisis con una solución de reactivo de amplificación para facilitar la amplificación de ácido nucleico. La solución de reactivos de amplificación comprende componentes necesarios para la amplificación de ADN eficiente como dNPT, polimerasa, MgSO<sub>4</sub> y NH<sub>4</sub>Cl; pero excluyendo cebadores o sondas de secuencia específica, que se almacenan en el cartucho sensor.

**[0030]** Para iniciar la reacción de amplificación de ácido nucleico, la mezcla de saliva-tampón de lisis se combina con los reactivos de amplificación, que ajustan el pH final, con anterioridad a la amplificación, a una escala óptima para la reacción bioquímica y detección concretas. Por lo general, el pH final óptimo estará en una escala de 6,0-9,5 y depende de las propiedades físico-químicas de las polimerasas, la eficiencia de amplificación y la detección.

**[0031]** En la siguiente descripción, se describe un dispositivo portátil sencillo de acción manual con referencia a las formas de realización preferidas. Se recoge una muestra de un donante y el dispositivo es accionado por un usuario. En algunos casos, el donante será también el usuario.

#### EXTRACCIÓN DE FLUIDO BIOLÓGICO

**[0032]** Las muestras, incluyendo saliva, sangre y orina, se pueden introducir directamente en el dispositivo para su preparación y acondicionamiento. De forma alternativa, se puede usar un hisopo para atrapar células. Puede tratarse de un hisopo bucal, hisopos nasofaríngeos, hisopos faríngeos, hisopos para oídos, hisopos genitales, hisopos para heridas, hisopos de una superficie contaminada, u otro tipo de hisopo, utilizado sin procesar o con una preparación mínima. El material de hisopo puede ser una espuma de célula abierta, una espuma de célula cerrada, poliéster tejido, o fibra de borra. En una forma de realización preferida para la aplicación de la detección de ácido nucleico en el animal huésped, la muestra es saliva recogida con un hisopo que presenta un material fabricado a partir de una espuma de célula cerrada sujeta en el extremo de un palo que actúa como mango. De forma ventajosa, un material de hisopo de espuma de célula cerrada no atrapa células biológicas y, por tanto, este sistema no necesita la agitación mecánica o por parte del usuario para liberarlas.

**[0033]** De forma alternativa, se puede utilizar un material distinto a la espuma mediante el cual la muestra se coloca únicamente en la superficie del hisopo. En cualquier caso, el material será compatible, de forma que la superficie efectiva puede ser inicialmente grande para absorber o adsorber la muestra y después puede comprimirse para reducir la superficie efectiva y/o el volumen, de forma que se expulse la muestra. La superficie efectiva es la cantidad de superficie con la que se puede adsorber la muestra. Ésta se reduce cuando la forma del material varía, el volumen se comprime o la superficie se pliega sobre sí misma.

**[0034]** Preferentemente, la superficie o la forma del hisopo está dispuesta para aumentar al máximo la capacidad para la muestra. Esto se puede conseguir añadiendo surcos, ondulaciones, nervaduras, aletas, orificios (ciegos o de paso), etc. El material debería ser un material biocompatible, siendo no lixivante y estable, como PP, PEAD o PEBD de grado médico.

**[0035]** En la figura 2a se muestra un ejemplo de un dispositivo de extracción de muestras 1 que presenta un hisopo 5 para recoger fluido, un mango 2 y un cuello 3. El usuario aplica el hisopo 5 a un tejido para recoger una muestra de fluido y puede frotar el hisopo sobre el tejido para eliminar células sueltas. De forma ventajosa, la superficie del hisopo puede ser abrasiva para soltar células del tejido. Estas células se adhieren a la superficie por tensión superficial del fluido y también están contenidas holgadamente en los pliegues de la espuma de célula cerrada.

**[0036]** Como se observa en la figura 3, el hisopo se inserta en un embudo 12 del dispositivo de preparación de muestras 70. A continuación, el cuello 3 se desliza con respecto al mango para interferir con el hisopo 5 a través de una garganta 6. La entrada está biselada para conducir al hisopo hacia el interior de la garganta de estrechamiento. Por lo tanto, el material de hisopo se comprime para liberar la muestra en la posición deseada. De forma alternativa, el cuello puede comprimir el hisopo 5 en una dirección longitudinal (con respecto al mango) contra una base del dispositivo de preparación de muestras para liberar la muestra. En la figura 4 se muestra el cuello en una posición de compresión.

**[0037]** Como alternativa al ejemplo de la figura 2a, la figura 2b presenta un cuello 3 fijado en el mango 2 para actuar como una tapa. El hisopo se inserta en el dispositivo de preparación de muestras e interfiere con una cámara, como un embudo 12, para comprimir el hisopo, siendo la salida del embudo la que proporciona el puerto de entrada de la muestra. La cámara puede ser un embudo, siendo la sección transversal que se estrecha desde la entrada más grande que el hisopo hasta una dimensión de sección transversal que maximiza la compresión del hisopo (p. ej., fundamentalmente equivalente a la sección transversal del hisopo al comprimirse o del hisopo al comprimirse con el mango). La cámara puede presentar una sección transversal fundamentalmente equivalente al hisopo cuando no está comprimido, y puede tener una base que actúa en el hisopo para comprimirlo de forma longitudinal cuando se inserta el dispositivo de extracción. Al insertar completamente el hisopo, la tapa 3 previene la entrada de contaminantes o la salida de fluido del dispositivo 70.

5 **[0038]** En cualquier ejemplo, el dispositivo de extracción 1 y el dispositivo de preparación de muestras 70 están ajustados en esta posición de compresión mediante un dispositivo de frenado que comprende una porción sobresaliente 8 y hueca 11 (del dispositivo de extracción (en el cuello o en el mango) o bien el dispositivo de extracción de muestras puede presentar la porción sobresaliente o hueca). Así, el usuario no puede acceder al fluido una vez se haya unido y, por lo tanto, no puede desactivarse sin el uso de excesiva fuerza. Este hecho resulta ventajoso en pruebas de diagnóstico para separar la muestra del entorno del usuario. Mediante el acto de insertar el hisopo en el dispositivo de preparación de muestras se logra tanto la compresión del hisopo como su sujeción en esta posición.

10 **[0039]** El volumen del hisopo y su nivel de compresión determinan la cantidad de fluido transferido desde el material al dispositivo de preparación de muestras. Preferentemente, el volumen de muestra liberado por el hisopo es superior a 50 ul, superior a 100 ul, superior a 200 ul, o superior a 400 ul. Preferentemente, el volumen de muestra que atrapa el hisopo es inferior a 2000 ul, inferior a 1500 ul, o inferior a 1000 ul.

15 **[0040]** Al exprimir el hisopo, se llena un cilindro abierto en el dispositivo de preparación de muestras, y cualquier exceso de fluido circula por la parte superior del cilindro abierto. Como se observa en la figura 4, el fluido viaja desde el hisopo 5 a lo largo de un canal 22 que presenta una inclinación para llenar el cilindro 25. El ángulo de la inclinación debería ser mayor de 25° con respecto a la horizontal, preferentemente mayor de 45°, para favorecer el flujo y evitar cualquier influencia del dispositivo que se mantiene en una posición ligeramente desviada de la vertical.

#### PREPARACIÓN DEL DONANTE

20 **[0041]** El fluido de saliva recogido de un donante puede contener sustancia(s) que interfiere(n) con pruebas posteriores de diagnóstico genético y/o de proteínas (p. ej., reacción de amplificación de ácido nucleico, secuenciación de ADN). Por ejemplo, en una reacción de amplificación de ácido nucleico, la(s) sustancia(s) que interfiere(n) puede(n) inhibir la amplificación de ácido nucleico, disminuir la eficiencia de amplificación y/o aumentar la amplificación inespecífica. Como medida adicional para minimizar o en algunos casos eliminar la(s) sustancia(s) indeseable(s) en el fluido de saliva, se puede llevar a cabo un procedimiento de enjuague bucal con anterioridad a la recogida de saliva. El procedimiento de enjuague bucal se puede llevar a cabo inmediatamente después de cepillarse los dientes, comer, beber, etc., sin un período de espera adicional antes de la recogida de muestra de saliva. En el procedimiento de enjuague bucal, un individuo se enjuaga la boca con un enjuague bucal durante una cantidad de tiempo determinada, preferentemente entre diez segundos y dos minutos, más preferentemente entre 25 veinte y cincuenta segundos, antes de expulsar el enjuague bucal de la boca. A continuación, se aclara la boca con agua al menos dos veces, preferentemente al menos cinco veces, para eliminar o reducir la cantidad de enjuague bucal residual en la saliva con anterioridad a la recogida del fluido de saliva. El fluido de saliva puede recogerse con un hisopo.

**[0042]** A continuación se describe un ejemplo de protocolo de enjuague bucal:

- 35 1) Enjuagar la boca con 10-30 ml de Listerine Zero™ (p. ej., de medio tapón a un tapón entero de botella de Listerine) durante 20-30 segundos;
- 2) Expulsar el enjuague bucal de la boca;
- 3) Aclarar la boca con 10-30 ml de agua;
- 4) Repetir el paso 3 cinco veces más;
- 40 5) Esperar de 1 a 2 minutos antes de la recogida de saliva;
- 6) Recoger saliva escupiendo la saliva dentro de un recipiente de recogida.

**[0043]** Normalmente, un enjuague bucal es una solución que posee propiedades antisépticas y/o antimicrobianas. El enjuague bucal puede ser hecho en casa, o ser de origen orgánico o comercial. No obstante, no es conveniente una solución consistente únicamente en sal y agua.

45 **[0044]** El enjuague bucal puede contener alcohol. Preferentemente, si se usa un enjuague bucal que contiene alcohol, se establecen etapas adicionales de enjuague con agua para eliminar o minimizar la cantidad de alcohol residual en la saliva con anterioridad a la recogida de saliva. Esto se debe a que el alcohol residual en la muestra de saliva puede interferir en pruebas de diagnóstico posteriores. Preferentemente, el enjuague bucal no contiene alcohol.

50 **[0045]** El enjuague bucal de origen comercial puede ser: Colgate Plax™ (con o sin alcohol), Listerine™ (con o sin alcohol), Corsodyl™, Dentyl pH™, Oral-B™, Scope™, Astring-O-Sol™, Cepacol™, Sarkan™, Tantum verde™ y Organic pharmacy™.

**[0046]** En un ejemplo, el sistema, preferentemente el dispositivo de preparación de muestras, comprende un contenedor de enjuague bucal.

#### DISPOSITIVO DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS

5 **[0047]** El dispositivo de preparación de muestras 70 comprende una carcasa dentro de la cual se encuentran varios dispensadores y receptáculos de fluido para contener y/o mezclar fluidos. Los dispensadores y/o receptáculos pueden estar provistos de cilindros 25, 50, 46, 52, 26 y émbolos 29, 33, 30, 35, 36. En la figura 4 se muestran los dispensadores en la posición inicial. Los émbolos se desplazan hacia abajo hasta alcanzar una posición final dispensada. El émbolo 29, conectado al tapón 23, se introduce en el cilindro 25 para dispensar el fluido a través del puerto de salida 27. El émbolo 30, conectado al tapón 24, se introduce en el cilindro 26 para dispensar el fluido a través del puerto de salida 28.

10 **[0048]** Hay dispuestos conjuntos de émbolos que se mueven de forma simultánea para dispensar fluidos separados en un receptáculo para mezclar estos fluidos. Posteriormente, otro conjunto de émbolos se puede mover de forma simultánea para dispensar el fluido mezclado y otro fluido en otro receptáculo para mezclar dichos fluidos. Esta combinación de dispensación anterior y simultánea puede repetirse para permitir etapas de mezclado adicionales en un proceso de preparación de muestra. Existe un canal de microfluidos 62 que comunica entre dos o más dispensadores y el receptáculo, proporcionando preferentemente el canal un camino tortuoso para aumentar el mezclado. El canal puede seguir un camino serpenteante, presentar restricciones de canal, y/o poseer una superficie rugosa para crear turbulencia en el fluido y aumentar la longitud efectiva en comparación con la distancia entre puertos. La sección transversal del canal puede ser relativamente pequeña para aumentar la velocidad del fluido y sus efectos delimitadores, fomentando de esta forma el mezclado. Preferentemente, la sección transversal es inferior a 1 mm<sup>2</sup>, inferior a 500 μm<sup>2</sup>, o inferior a 200 μm<sup>2</sup>.

15 **[0049]** Las figuras 9 y 10 son ejemplos alternativos que muestran la parte inferior de base 21 presentando canales 62 formados en la misma. Las flechas indican la dirección del flujo de fluido. Los canales permiten que el fluido salga de los puertos 51 y 27 para que fluya y se mezcle antes de entrar en el puerto 55. Del mismo modo, los puertos 55 y 53 fluyen hacia el puerto 28.

20 **[0050]** El dispositivo permite que una pluralidad de fluidos inicialmente separados se mezcle entre sí y fluyan juntos a lo largo del canal 62. La carrera de cada émbolo y la sección transversal del cilindro determinan de forma precisa el volumen de fluido dispensado. Un cilindro puede presentar un orificio de purga para permitir la salida de aire o fluido a través del mismo en lugar de por el extremo del cilindro, en cuyo caso el volumen depende del acceso de la carrera del émbolo tras la posición del orificio de purga.

25 **[0051]** El accionamiento de los émbolos puede realizarse de diversas maneras. Se pueden emplear medios automatizados para accionar los dispensadores utilizando sistemas hidráulicos, abrazaderas, interruptores, solenoides y/o motores para convertir la cómoda acción del usuario en un movimiento controlado y efectivo. Sin embargo, para reducir costes y evitar la necesidad de presentar un instrumento con alimentación, preferentemente un usuario acciona el dispositivo utilizando medios mecánicos simples, como un seguidor de leva.

30 **[0052]** Una leva es un dispositivo mecánico que presenta una forma o un perfil que se une a un seguidor para proporcionar un movimiento de salida preestablecido en el seguidor. Por tanto, el movimiento constante de la leva puede producir un movimiento variable, casi arbitrario, deseado en el seguidor. En un ejemplo de una leva que se muestra en la figura 7, se observan pistas semicirculares, situada cada una en un radio fijo con respecto al centro de rotación, que proporcionan una superficie de leva cuya distancia con respecto a una superficie 9 determina el desplazamiento de un seguidor. Como se observa en la figura 6, el seguidor 45 circula por la superficie de esta pista de leva 41 y se ve obligado a desplazarse en una dirección ortogonal con respecto al plano de la superficie 9.

35 **[0053]** En un ejemplo preferido, el usuario rota una tapa giratoria 10 conectada a la superficie 9, la cual desplaza conjuntos de émbolos a lo largo de las pistas de leva circulares concéntricas. Las pistas de leva traducen el movimiento rotatorio de la tapa 10 en movimiento secuencial y simultáneo para los émbolos. El accionamiento manual mediante rotación y el engranaje que presentan las tapas proporciona de forma ventajosa una velocidad de movimiento suave y constante en comparación con el movimiento lineal manual, como en un mecanismo de tirar o empujar.

40 **[0054]** Como se observa en la figura 7, las partes inclinadas 42 traducen el movimiento rotatorio en movimiento vertical. Las partes planas 43, 44 proporcionan períodos de espera durante los cuales la rotación de la tapa no se traduce en movimiento vertical. El movimiento de los émbolos está diseñado para ser irreversible o unidireccional, lo que significa que revertir el movimiento del usuario no resulta en una retracción del fluido dispensado. La leva no se une de forma positiva al seguidor, por lo que la leva sólo puede empujar al seguidor y no tirar de él. Una única pista de leva puede contar con tres porciones secuenciales (i) una primera porción de espera 43 antes de que se mueva el émbolo (ii) una porción de inclinación 42 durante la cual se desplaza el émbolo y (iii) una segunda porción de espera 44 durante la cual el émbolo está bloqueado en el cilindro. La porción de inclinación sirve de transición entre la primera y la segunda posición de espera. Así, una vez accionados, los émbolos se mantienen

en la posición dispensada, lo que previene el flujo de retorno de fluidos tras posteriores accionamientos del émbolo. Además, esto impide la reutilización del dispositivo, lo cual cobra importancia desde un punto de vista sanitario y de cuarentena.

- 5 **[0055]** Para prevenir la rotación inversa de la tapa 10 y proporcionar respuesta audible por el usuario, se puede emplear un trinquete entre la tapa 10 y la carcasa. La acción del trinquete puede ser continua a lo largo de la rotación o puede darse en etapas clave del proceso. Se puede proporcionar un trinquete mediante un hueco en una de entre la tapa y carcasa que coopera con una protuberancia en la otra de entre la tapa y carcasa. La geometría de las superficies del hueco y de la protuberancia están dispuestas para que se deslicen una sobre la otra en una dirección, pero para quedar bloqueadas en la otra dirección.
- 10 **[0056]** Un primer tipo de dispensador, que se ilustra en la figura 8, puede comprender un primer tipo de cilindro 50, un tapón 49, sellado perforable a través del cilindro, y un émbolo 33 que presenta un filo cortante 48. El cilindro sellado proporciona un recipiente sellado para el almacenamiento de un fluido. El émbolo actúa sobre el tapón para desplazar el fluido. La figura 8 muestra la posición inicial del dispensador donde el tapón se sitúa dentro del cilindro, separado del émbolo por el sellado.
- 15 **[0057]** El sellado perforable establece una barrera para conservar los fluidos contenidos dentro durante el transporte o el almacenamiento y para evitar las pérdidas por transmisión o evaporación antes del accionamiento, y para asegurar así proporciones de mezcla adecuadas.
- 20 **[0058]** El primer tipo de cilindro se llena previamente con un fluido (p. ej., tampón de lisis, reactivos para reacciones de ácido nucleico). El cilindro queda sellado en ambos extremos para prevenir la contaminación, la degradación y el escape de fluido. En un primer extremo, el cilindro se sella con una membrana, como una lámina, que se puede perforar con un filo cortante 48 en el extremo del émbolo unido a ese primer extremo del cilindro. En un segundo extremo, el cilindro está acoplado en una base 21 y cuenta con un puerto de salida de fluido. Inicialmente, el puerto de salida está sellado con una membrana que cubre la parte inferior de la base. Preferentemente, esta membrana está acoplada a la base mediante un adhesivo. La membrana puede ser una lámina o junta termosellada o un adhesivo sensible a la presión.
- 25 **[0059]** Durante su uso, el émbolo se desplaza hacia el primer extremo del cilindro, perfora la membrana y desplaza el fluido en una cantidad predeterminada. La presión del fluido rompe el sello del segundo extremo del cilindro de forma que el fluido circula libremente a través el canal.
- 30 **[0060]** El tapón y el émbolo desempeñan la función de un émbolo o pistón, pero su fabricación por separado permite la disposición de un extremo lo suficientemente suave para sellarse contra las paredes del cilindro, al mismo tiempo que es lo suficientemente duro como para perforar la membrana al ser empujado. El tapón puede tener bordes de sellado 47 para estar en contacto de manera deformable con la pared del cilindro. Se puede crear un émbolo con un tapón integrado utilizando un proceso de inyección de dos partes, donde se añaden dos materiales por separado para proporcionar las dos funciones de resistencia y sellado.
- 35 **[0061]** En un ejemplo, la base 21 del dispositivo de preparación de muestras se utiliza para definir un conjunto de canales de microfluidos, puertos microfluídicos y cámaras de microfluidos. Los canales y cámaras se definen durante el moldeo por inyección o la inyección con máquina en la base dejando un lado de los canales y las cámaras abierto. Se fija una membrana flexible a la base para cubrir el lado abierto de la cámara y los canales y para cubrir los puertos para aislar del entorno los reactivos en los dispensadores.
- 40 **[0062]** Las paredes (66, 61) actúan como una presa entre el puerto del dispensador y el canal y previenen la exposición al entorno de los reactivos en los dispensadores (como lisis o enzimas). Con presión hidráulica en el puerto, la membrana se dobla en un punto en una superficie de la pared en contacto con la membrana para permitir que el fluido salga por los puertos.
- 45 **[0063]** En un ejemplo, que se muestra en la figura 9, un volumen/hueco 66 rodea considerablemente las paredes 67 que rodean el puerto 53 de forma que, sin importar el punto de flexión cercano al puerto, el fluido continuará circulando hacia un canal en lugar de filtrarse a través de la superficie de la base y contaminando otras zonas. El hueco puede ser una parte del canal. Preferentemente, las paredes y el hueco son anulares. Puede haber uno o varios conjuntos de paredes y huecos rodeando concéntricamente un puerto con al menos una pared en contacto con la membrana. Las paredes y huecos están dispuestos de forma que preferentemente el fluido llena sustancialmente un hueco antes de circular por una pared hacia el siguiente hueco. Preferentemente, las paredes están formadas íntegramente en la base 21. Como alternativa, las paredes pueden ser flexibles, doblarse o desintegrarse frágilmente con la presión del fluido. Por ejemplo, se puede colocar una pared de silicona alrededor del puerto.
- 50 **[0064]** En otro ejemplo, que se muestra en la figura 10, el puerto está separado de los canales 62 únicamente mediante una presa 61 en un único punto, que puede estar situado dentro del canal 62. La membrana flexible se dobla por encima de la presa para permitir que el fluido circule sobre la presa y prosiga a lo largo del canal.
- 55

**[0065]** La acción por parte del usuario de presurizar el fluido puede derivar en una mayor incertidumbre en el ritmo del fluido. Por ejemplo, las variaciones en las partes del seguidor de leva, la fuerza del usuario y la adhesión de la membrana a la base quieren decir que el punto de flexión puede variar, lo cual modifica a su vez el punto en el que el fluido pasa a una posición o se mezcla con un segundo fluido que se está dispensando. La membrana puede desplazarse pronto con una baja velocidad de fluido o moverse tarde con velocidad alta. Asimismo, con una velocidad alta es más probable que se arrastren burbujas de aire en el flujo.

**[0066]** Así, además de las paredes 67 y el hueco 66, el puerto 53 puede estar separado del canal 62 conectando el canal 63, el depósito 64 y la ranura de salida 65. Estos componentes microfluidicos tienen como efecto la eliminación de variaciones en el ritmo y velocidad del fluido al salir del puerto 53 para proporcionar un flujo suave y acompasado de forma precisa al entrar en el canal 62. Un depósito puede ser un hueco 66 suficientemente grande o una cámara separada 64, como se muestra en la figura 9. Los volúmenes de los componentes microfluidicos (como depósito, hueco y canales) se eligen para medir la salida de fluido para mezclarse con otro fluido en el canal 62.

**[0067]** Al permitir que el fluido que sale precipitadamente desemboque en un depósito 64, que puede llenarse pronto y lento, o tarde y rápido, llenando de cualquier forma el depósito por completo, se asegura que la salida del depósito sucede en un momento más predecible que el propio estallido inicial. El flujo del fluido se determina por la tensión superficial en lugar de por la gravedad o el posicionamiento. El depósito y la salida del depósito están configurados de forma que se asegura que el fluido llena completamente el depósito y que el aire sale del depósito antes de que salga el fluido. Las dimensiones de la salida son más pequeñas que las del depósito. Así, el fluido humedece todo el depósito antes de salir. Preferentemente, el área del puerto de salida es inferior al 20 % de la superficie del depósito, más preferentemente inferior al 10 %. Preferentemente, en la sección transversal, la anchura o el diámetro del puerto de salida es inferior al 20 % del perímetro del depósito, más preferentemente inferior al 10 %. El experto podrá apreciar cómo las dimensiones relativas se pueden diseñar en base a las propiedades de fluidos.

**[0068]** Un segundo tipo de dispensador está inicialmente vacío. Como se muestra en la figura 4 (lado derecho), este dispensador puede comprender un segundo tipo de cilindro 26 que presenta un émbolo 30 unido a un primer extremo y un segundo extremo fijado en una base con un puerto de fluido 28. Dos o más fluidos, que se han mezclado en un primer canal conectado al puerto de fluido, se introducen en el segundo tipo de cilindro para llenar una porción del mismo. El exceso de fluido y aire puede salir a través de un orificio de purga 32 situado en la pared lateral del cilindro. Cuando el émbolo se introduce en el cilindro, expulsa primero el aire restante a través del orificio de purga y posteriormente expulsa el fluido a través del puerto de fluido en el segundo extremo del cilindro. De forma alternativa, el émbolo puede detenerse antes del extremo del cilindro de forma que el aire contenido dentro del cilindro no se expulsa al canal. El fluido se desplaza a lo largo de un canal de microfluidos distinto del primer canal que introdujo el fluido en el cilindro. El fluido no puede retroceder a través del primer canal porque el fluido (incompresible) queda bloqueado en un extremo por el émbolo del cilindro anterior, que está fijado de por sí en su posición por la parte plana 44 de la pista de leva.

**[0069]** El fluido mezclado en el segundo canal puede introducirse en otro receptáculo para mezclarse con otro fluido o fluir hacia un sensor para que lo detecte.

**[0070]** Se proporciona un tercer tipo de dispensador para recibir la muestra biológica, ya sea del hisopo según se ha descrito anteriormente, o de una jeringuilla o utilizando un vial de muestreo con forma incrustado en el dispositivo de preparación de muestras. Según se ilustra en la figura 4, el dispensador puede comprender un tercer tipo de cilindro 25 que presenta una abertura en un primer extremo para recibir un émbolo y un puerto de salida 27 en un segundo extremo fijado a la base 21. La muestra se mueve por efecto de la gravedad a lo largo del canal inclinado 22 para introducirse en el cilindro a través de la primera abertura o a través de un puerto en la pared del cilindro 25. Un primer accionamiento del usuario une el émbolo 29 al cilindro 25. Un orificio de purga o una porción que falta de la pared del primer cilindro permite que el fluido se escape hasta una posición inicial predeterminada. La posterior carrera del émbolo desde la posición inicial hasta la posición final determina que un volumen conocido salga del cilindro.

**[0071]** El émbolo 29 puede estar inicialmente separado del cilindro 25 y desplazarse tras el accionamiento para unirse al cilindro 25. La parte superior del cilindro 25 puede ser ahusada, de forma que el émbolo presente algo de tolerancia lateral antes de unirse y sellarse contra los lados del cilindro.

**[0072]** En un ejemplo, un fluido del tercer tipo de dispensador se mezcla con fluido de un primer tipo de dispensador para introducirse en el segundo tipo de dispensador. En un ejemplo, que se muestra en las figuras 5 y 9, hay 5 cilindros/émbolos: un primer cilindro/émbolo para recibir la muestra de fluido; un segundo cilindro/émbolo para contener un tampón de lisis; un tercer cilindro/émbolo para recibir y mezclar el tampón de lisis y la muestra; un cuarto cilindro/émbolo para contener reactivos para una reacción de ácido nucleico; y un quinto cilindro/émbolo para recibir y mezclar la mezcla de tampón de lisis/muestra con los reactivos para obtener una reacción de ácido nucleico. El segundo y el tercer cilindro que se muestran son ejemplos del primer tipo de cilindro. El tercer y el quinto cilindro que se muestran son ejemplos del segundo tipo de cilindro. La figura 9 muestra una acción de torsión

en la tapa 10, que rota las pistas de leva y desplaza los émbolos. Preferentemente, la tapa presenta características de textura de superficie 40 para mejorar la sujeción, como una superficie estriada o muescas.

- 5 **[0073]** En un ejemplo, se disponen pares de émbolos para desplazarse juntos, con el fin de permitir la expulsión simultánea de fluidos desde los cilindros y, por consiguiente, permitir que se mezclen durante el flujo. Preferentemente, los pares se forman juntos, más preferentemente como una parte moldeada por inyección integrada.

#### CARTUCHO SENSOR

- 10 **[0074]** Una vez preparada la muestra de fluido, se transporta al cartucho sensor 80, que cuenta con chip sensor 100 situado dentro de una carcasa. El fluido final mezclado circula a lo largo del canal y se introduce en la carcasa del cartucho sensor a través de una boquilla (véase figura 9).

- 15 **[0075]** El cartucho puede ser desechable, en cuyo caso: únicamente se necesita que haya suficientes reactivos para una reacción; no es necesario que el interior sea accesible o utilizable por el usuario; y no es necesario que el sistema posea dispositivos periféricos para limpiar o renovar los cartuchos. En formas de realización preferidas, al principio la carcasa del cartucho sensor se sitúa al menos parcialmente dentro o adyacente al dispositivo de preparación de muestras. En la figura 13, se muestra el dispositivo de preparación de muestras con el cartucho sensor unido. En la figura 14, se muestra el cartucho sensor parcialmente extraído.

- 20 **[0076]** El cartucho sensor se muestra en la figura 15 en sección, presentando un puerto de muestra de fluido 84, puerto de aire 85, conector eléctrico 83, bloque de sellado 87, contenedores microfluídicos 101, dissipador de calor 105, y cuña de sellado 86, todo ello dentro de la carcasa. El puerto 84 está definido mediante un orificio a través de una o más capas, proporcionando estas capas una función absorbente o de sellado. Preferentemente, para prevenir el derramamiento de fluido durante la transferencia, una capa es una junta dispuesta para sellar alrededor de la boquilla 59 y otra capa es un material absorbente.

- 25 **[0077]** Una vez dentro del cartucho sensor, el fluido circula a través del chip sensor. Se proporciona una pluralidad de contenedores microfluídicos 101 para recibir el fluido, cada uno de ellos expuesto a uno o más sensores. La parte superior del contenedor puede estar inicialmente abierta para que el fluido pueda desembocar en ella, sellándose antes de la monitorización con el sensor. Para asegurar una distribución suficiente y uniforme del fluido, hay una superficie por encima de la superficie del sensor que crea un espacio para que circule el fluido. La altura del espacio está diseñada para proporcionar una acción de capilaridad a lo largo de la superficie del chip. El espacio debería estar diseñado de forma que la fuerza capilar del fluido debería ser mayor que la fuerza gravitatoria. El espacio puede ser considerablemente constante o verse reducido hacia el extremo distal desde el puerto de entrada (para proporcionar una acción de capilaridad continua conforme el fluido se recoge en los pocillos). La altura óptima dependerá de varios factores, como los materiales utilizados, la viscosidad del fluido y el volumen del fluido. En formas de realización preferidas, la altura del espacio es mayor de 100  $\mu\text{m}$ , mayor de 300  $\mu\text{m}$ , o mayor de 700  $\mu\text{m}$  y menor de 3 mm, menor de 2 mm, o menor de 1 mm. En formas de realización preferidas, para mejorar el flujo se cubre la superficie de los pocillos y/o chips con tensoactivos como Triton, Siloxane, BSA, CHAPS, etc.
- 30
- 35

**[0078]** Un volumen de microfluidos o contenedor de microfluidos se refiere a una estructura de dimensiones micrométricas diseñada para recibir y contener un fluido. Por ejemplo, volúmenes de microfluidos pueden ser un canal, cámara o pocillo.

- 40 **[0079]** En la forma de realización que se representa en las figuras 16-18, se muestra un bloque de sellado en diversos estados, de no sellado a sellado. El bloque se acciona mediante una cuña 86 para unir la parte superior de los volúmenes microfluídicos 101 para sellarlos ante el flujo transversal del fluido y las fugas de fluido al exterior. Este aislamiento previene la contaminación de reactivos específicos de cámara y subproductos de reacción entre cámaras vecinas y también asegura el aislamiento eléctrico entre cámaras. Durante el sellado, algún fluido se extenderá a cámaras sin llenar y algún fluido circulará por el chip hacia cámaras de desbordamiento. De forma alternativa, puede no haber ninguna cámara de desbordamiento y en su lugar el exceso de fluido se puede recoger dentro de la carcasa. En algunas formas de realización, se proporciona una falda alrededor del chip sensor para contener fluido. La falda puede estar conectada al bloque de sellado 87 y a la PCB 83 para adecuar el espacio en la posición no sellada y después doblarse cuando el bloque está en una posición de sellado.
- 45

- 50 **[0080]** La combinación de bloque 87 y chip sensor 100 proporciona una estructura para contener un fluido, medios para desplazar el bloque y el chip sensor para sellar y aislar cámaras, un electrodo que proporciona un electrodo de referencia, reactivos expuestos a cada cámara, una pluralidad de sensores, y un conector a un analizador.

- 55 **[0081]** En una forma de realización, se utiliza una pluralidad de tipos de sensor para determinar una pluralidad de propiedades del fluido. Por ejemplo, se puede utilizar la temperatura, quimioluminiscencia, fluorescencia, pH,  $[\text{Na}^+]$ ,  $[\text{K}^+]$ , y otros sensores de concentración de iones. En una segunda forma de realización, se utiliza una variedad de sensores del mismo tipo de sensor para analizar el fluido mediante reacción de la muestra con un reactivo diferente o una mezcla de reactivos en cada cámara. Por tanto, aunque el fluido que circula hacia las cámaras es

considerablemente idéntico, se puede determinar una pluralidad de propiedades añadiendo una pluralidad de reactivos analíticos específicos (ASR) para determinar si cada analito está presente. Los ASR pueden ser cebadores de secuencia específica o alelo-específicos, anticuerpos antígeno-específicos, u otro reactivo elegido para reaccionar químicamente con una diana en la muestra.

5 **[0082]** A partir de un conocimiento de los posibles componentes de una muestra, como bases de un ácido nucleico, tipos de proteínas, o moléculas y sus subproductos (incluido el caso en el que haya subproductos no válidos) de estos componentes con un reactivo dado, se puede identificar el componente. La precisión de la identidad depende de la especificidad del reactivo y de la gama de posibles componentes. Por ejemplo, un anticuerpo policlonal indicaría simplemente si la muestra contenía un miembro de una clase de proteína, mientras que un anticuerpo monoclonal podría identificar la proteína específica. En el primer caso, la proteína específica se conocería si la muestra únicamente pudiera contener un miembro de esa clase. Del mismo modo, un cebador de secuencia específica indicaría si el ácido nucleico de muestra contenía una secuencia que era complementaria al cebador. La secuencia en cuestión puede ser un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), en cuyo caso el cebador puede ser un cebador alelo-específico para identificar una única base del ácido nucleico de la muestra biológica. Se puede emplear la monitorización de las salidas de los sensores que detectan los subproductos para determinar la diferencia del cambio de señales entre dos cámaras. El cambio de señal puede ser el que se calcula como el cambio en la señal desde el inicio hasta el final de la reacción o en tiempo real conforme progresa la reacción. La reacción puede ser una única reacción (incorporación de nucleótido en una plantilla de ácido nucleico), una reacción en desarrollo (amplificación isotérmica de ADN), o una reacción cíclica (amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa). Para más detalles, se pueden consultar los documentos US7686929 y US7888015. Las reacciones de proteína quinasa se pueden llevar a cabo y monitorizar como se describe a continuación. Las quinasas son enzimas que transfieren fosfato, las cuales catalizan la transferencia del fosfato gamma del ATP a los grupos libres de hidroxilo de aminoácidos selectivos 131 como serina, treonina y tirosina; estos aminoácidos se denominan aceptores de fosfato. La hidrólisis del ATP durante la reacción de transferencia de fosfato provoca la liberación de iones libres de hidrógeno. Los sustratos de proteínas quinasas pueden ser proteínas, así como péptidos de 18 a 20 aminoácidos de longitud. Normalmente, los péptidos se reconocen por la capacidad del lugar activo de la proteína quinasa para acoplar sustratos análogos. Dependiendo del tipo de proteína quinasa, se puede obtener una parte de la especificidad a través de la secuencia de aminoácidos que rodean el aminoácido aceptor de fosfato. Así, las secuencias específicas de péptidos pueden utilizarse para monitorizar la actividad quinasa *in vitro*.

15 **[0083]** Los péptidos son fragmentos pequeños de proteínas que contienen por lo general de 18 a 20 aminoácidos de longitud. Los péptidos tienden a carecer de las estructuras secundarias y terciarias que conforman en conjunto las propiedades físico-químicas de la proteína correspondiente, lo cual provoca que sean más fáciles de manipular. Por ejemplo, se pueden inmovilizar péptidos en cada cámara de microfluidos. Cada cámara individual contiene péptidos de secuencia específica que pueden ser reconocidos por una quinasa o tipo de quinasas particular. Las quinasas se pueden introducir en las cámaras en forma de: lisados celulares; proteínas recombinantes o nativas purificadas solubles; inmovilizadas en microesferas mediante anticuerpos o marcaje de afinidad conjugado con las microesferas. Las quinasas inmovilizadas pueden liberarse por medio de escisión enzimática u otro medio alternativo.

20 **[0084]** Para iniciar la reacción, se liberan los péptidos. Si la secuencia que rodea al aminoácido aceptor de fosfato complementa a la quinasa correspondiente, puede tener lugar una reacción de fosforilación, donde un fosfato, hidrolizado a partir de un ATP, se transfiere a un péptido mediante la quinasa. La reacción bioquímica descrita genera un subproducto de ion hidrógeno, que puede ser detectado a continuación por el sensor. La reacción se representa en la figura 20 (véase referencia Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, Biochemistry, 5.ª edición, 2002).

25 **[0085]** Los ASR y otros reactivos se pueden añadir en cada cámara antes o después de incorporar el fluido que va a ser analizado. Por ejemplo, la superficie del chip, las paredes de la cámara o el bloque de sellado pueden identificarse con un volumen de microlitro que contiene reactivos, que a continuación se secan para su almacenamiento a corto o a largo plazo con anterioridad al uso del cartucho sensor para el análisis. Los reactivos pueden identificarse empleando equipo de deposición disponible comercialmente que incluye impresoras de chorro de tinta (accionadas de forma térmica o piezoeléctrica), serigrafía y pipetas microdispensadoras. Una vez el fluido se encuentra sellado en una cámara y los reactivos se han disuelto en el fluido, tiene lugar una reacción si el analito diana está presente, cuyos subproductos son detectados por el/los sensor/es. El subproducto puede ser una propiedad química, iónica o física, como calor.

30 **[0086]** Después de secarse, los reactivos se pueden cubrir con o fijarse en una sustancia (como cera) para liberarse tras fundirse en el fluido que va a ser analizado. Por consiguiente, se puede asegurar que la reacción no sucede antes de que el fluido se separe en cámaras o de que los sensores se conecten al circuito de detección. En el sistema preferido que se muestra en la figura 1, el cartucho sensor 80 está conectado al dispositivo de preparación de muestras 70 para recibir fluidos y después se extrae para conectarse al analizador 110. En una aplicación accionada por el usuario, no se sabrá con certeza cuándo desplaza el usuario el cartucho, por lo que es importante controlar el ritmo de la reacción.

**[0087]** Los reactivos pueden depositarse primero en cámaras y después cubrirse con la sustancia. De forma alternativa, los reactivos pueden mezclarse con la cera y la combinación puede depositarse en cámaras.

5 **[0088]** Preferentemente, la sustancia tiene un punto de fusión por debajo de la temperatura de funcionamiento del chip y por encima de la temperatura ambiente. La sustancia es preferentemente inerte con respecto a la reacción en la cámara e insoluble en la muestra de fluido.

10 **[0089]** Una cera es un compuesto que es normalmente insoluble en agua, maleable aproximadamente a temperatura ambiente, y que se funde a una temperatura relativamente baja (p. ej., por encima de 40 °C). En formas de realización preferidas, en condiciones iniciales, la cera es considerablemente insoluble en el fluido proporcionado en el volumen. En la práctica, este hecho quiere decir que menos del 5 % de los reactivos se disuelven en el fluido antes de que se selle el volumen y se encienda el calentador. La cera puede ser parafina.

15 **[0090]** Preferentemente, hay calentadores y sensores de temperatura en la carcasa conectados a un regulador. Cuando el fluido se ha transferido a los volúmenes de microfluidos, sellados y aislados entre sí, el regulador puede encender el calentador para controlar el ritmo de la reacción entre reactivos en la cera y el fluido. El calentador y el sensor de temperatura pueden estar integrados en el chip semiconductor 112, en la PCB 116 o en el bloque de sellado 87.

#### MICROFLUIDOS

20 **[0091]** Las cámaras de microfluidos pueden presentar una fina membrana que tiene porciones eliminadas de los sensores en el chip semiconductor. La membrana proporciona una capa económica en la que se realizan orificios para proporcionar los lados de las cámaras. La superficie del sensor proporciona la parte inferior de la cámara. La membrana comprende una superficie que se ajusta a la superficie del sensor para proporcionar sellado. Los orificios se pueden crear mediante corte láser, chorro de agua, ranurado, perforado, o troquelado. Existen procesos comerciales para cortar la membrana y proporcionar volúmenes del orden de microlitros. En una forma de realización preferida, el volumen es menor de 10 ul, menor de 5 ul, menor de 1 ul, o menor de 0,2 ul. La membrana puede ser un adhesivo sensible a la presión, una PCB flexible, una PCB rígida, una junta con adhesivo, subllenado  
25 epoxi, o una lámina de BondPly que es una capa de acrílico que proporciona una capa adhesiva al calentarse. La membrana puede comprender una PCB para proporcionar estructura laminar 116 como se muestra en la figura 12.

30 **[0092]** Como se muestra en la forma de realización preferida de la figura 12, el chip sensor 100 comprende un chip semiconductor 112 que integra una variedad de sensores, calentadores, sensores de temperatura, circuitos de control, y una estructura laminar 116 que contiene cámaras de microfluidos 101 superpuestas en los sensores. En una forma de realización preferida, los sensores son transistores de efecto de campo sensibles a iones (ISFET, por sus siglas en inglés), que detectan protones liberados o absorbidos durante una reacción de hidrólisis. Preferentemente, el chip semiconductor se realiza en un proceso de CMOS estándar para reducir los costes de fabricación y aumentar la fiabilidad. La estructura laminar puede comprender una placa de circuito impreso (PCB) que establece una conexión eléctrica 83 entre el chip semiconductor y un analizador 110. Un borde de la PCB o  
35 un conector de la PCB se conecta en el analizador 110, estableciendo tanto una conexión mecánica como eléctrica. La figura 12 muestra una estructura laminar que crea una placa de circuito de doble cara 116 que presenta:

- material del núcleo 125 que puede ser una estructura flexible hecha de poliimida (100-150 um de grosor);
- capas de protección 121, 123, 127 que proporcionan aislamiento entre capas cercanas (20-50 um de grosor);
- 40 • revestimiento conductor 124, 126 que está fresado para proporcionar pistas de circuito (20-50 um de grosor). El chip semiconductor 112 está conectado eléctricamente a la PCB mediante zonas de soldadura alineadas 129 en el chip y una capa de revestimiento 126;
- tinta de plata/cloruro de plata 122 que se imprime para proporcionar electrodos (1-10 um de grosor); y
- 45 • adhesivo sensible a la presión 128 que proporciona una conexión mecánica con el chip semiconductor con sellado entre cámaras (30-80 um de grosor).
- Parte de estas capas se puede eliminar de forma selectiva para proporcionar las rutas eléctricas deseadas o para permitir el acceso a capas anteriores.

50 **[0093]** Como primera alternativa a la membrana descrita anteriormente, las estructuras de microfluidos se pueden proporcionar directamente en el chip semiconductor utilizando técnicas MEMS. Se pueden utilizar etapas de procesamiento post-CMOS como fotolitografía para desarrollar capa(s) de poliimida, SU-8 y/o SiO<sub>2</sub>, delimitando la(s) capa(s) pocillos para microfluidos. Tales técnicas son conocidas para expertos en la materia, dependiendo la elección de estructura, proceso y material de la aplicación.

**[0094]** Como segunda alternativa, se puede formar una estructura de microfluidos como parte del bloque de sellado. Los pocillos pueden formarse durante el moldeo por inyección del bloque o mediante troquelado en caliente u otra técnica adecuada para un alto volumen de fabricación.

- 5 **[0095]** En cualquier caso, se proporcionan estructuras de microfluidos mediante la combinación de estructura de detección, superficie de bloque y una estructura que delimita las paredes para cada volumen. La combinación se dispone de forma que el fluido puede circular a través de un espacio entre superficies hacia pocillos abiertos, siendo desplazable la combinación para cerrar el espacio y aislar las cámaras de reacción individuales.

#### ELECTRODOS

- 10 **[0096]** El chip sensor comprende un electrodo expuesto a cada cámara. Durante el uso, los electrodos proporcionan una tensión de referencia al fluido que permite que el sistema de detección establezca la tensión umbral del transistor. El electrodo 92, 93, 122 puede ser por ejemplo de plata/cloruro de plata, oro o platino.

- 15 **[0097]** El electrodo 122 puede estar serigrafiado en la superficie del chip sensor o en una superficie de la PCB acoplada al chip sensor. El electrodo puede ser de composición de plata/cloruro de plata 5874 de DuPont. De forma alternativa, el electrodo se proporciona mediante las pistas del circuito en la PCB. En la figura 11 se representan dos trayectorias de electrodo 92, 93 expuestas al borde de las cámaras de microfluidos 101. Las trayectorias de electrodo están en contacto con cámaras alternativas de forma que las cámaras cercanas están expuestas a distintas trayectorias de electrodos. De este modo, se pueden detectar fugas con anterioridad al análisis empleando diferentes potenciales de referencia V1, V2 para cada trayectoria de electrodo y empleando sensores en cada cámara para determinar si el potencial de una cámara cercana está presente en una cámara en particular. Por ejemplo, se puede establecer un potencial de trayectoria de electrodo en 0 V y el otro en 3 V. Únicamente los sensores expuestos a los electrodos que presentan un potencial de 3 V deberían indicarlo; la detección de este potencial en cámaras/sensores cercanos indicaría una fuga de fluido entre cámaras. Se podría informar de este error al usuario, analizador 110 u ordenador externo.

- 20 **[0098]** Según se utiliza en el presente documento, «externo» hace referencia a características relacionadas pero que no forman parte necesariamente del dispositivo o método descrito o reivindicado.

- 25 **[0099]** El electrodo puede formar parte de la estructura laminar 116, según se muestra en la figura 12. Para proteger a la PCB del entorno, la PCB, incluyendo el electrodo, se cubre con capa de protección. Esto conlleva la ventaja añadida de que se minimiza el área de electrodo expuesta al fluido, ya que ciertas reacciones químicas como la PCR son sensibles a la presencia de metal. La estructura laminar 116 se corta para exponer únicamente la sección transversal del electrodo, proporcionando así una señal de referencia con una superficie mínima. Preferentemente, el electrodo se expone durante el proceso de creación de los volúmenes de microfluidos como se ha señalado anteriormente.

- 30 **[0100]** Al extraer el cartucho del dispositivo de preparación de muestras se une al mismo tiempo una cuña para presionar un bloque de sellado en el chip para aislar cada cámara. En las figuras 16 a 18 se muestra un cierre 81 conectado a la cuña 86 que presenta una superficie inclinada 89 que está en contacto con una superficie inclinada del bloque 87 de forma que el movimiento horizontal de 81 deriva en un desplazamiento vertical del bloque 87 para expandir el fluido a través del chip desde un extremo y sellar las cámaras.

- 35 **[0101]** En la figura 18 se representa el cartucho unido al dispositivo de preparación de muestras. Los voladizos 71 del dispositivo de preparación de muestras presentan enganches para estar en contacto de manera flexible y tirar del cierre 81 del cartucho de forma que la extracción del cartucho arrastra el cierre 81 y la cuña 86 para accionar el bloque 87. Hacia el final del recorrido, los enganches 71 se montan en las protuberancias 82 para liberar el cierre y, por tanto, el cartucho.

- 40 **[0102]** Para completar el sistema de ensayo, el chip sensor se conecta a una fuente de alimentación para hacer funcionar los circuitos, medios de procesamiento de señal para monitorizar las señales del sensor y determinar una propiedad de la muestra, memoria para almacenar valores anteriores y posteriores al procesamiento, y circuitos de entrada/salida (E/S) para que el dispositivo interactúe con un procesador externo como un ordenador o un instrumento. En una forma de realización, el propio chip sensor comprende los circuitos de procesamiento de señal, memoria y circuitos E/S.

- 45 **[0103]** En otra forma de realización que se muestra en la figura 21, el cartucho 80 está conectado a un analizador 110, comprendiendo el analizador una carcasa, y un circuito para el procesamiento de señal, memoria, interfaz de sensor y circuitos E/S.

**[0104]** En otra forma de realización, el cartucho en sí contiene su propia fuente de alimentación en una batería y el chip semiconductor contiene un procesador de señal y un regulador.

- 50 **[0105]** Dependiendo de la cantidad de calor residual generada en el circuito y como parte del ambiente químico (p. ej., termociclaje entre 95 °C y 60 °C para la PCR), la temperatura del dispositivo puede elevarse demasiado para el funcionamiento. Como se muestra en la figura 22, se puede incorporar un ventilador 111 dentro de la

carcasa del analizador para enfriar el dispositivo y un disipador de calor 105 acoplado al chip sensor para aumentar la disipación. El aire ambiente puede introducirse en la carcasa del analizador y después dirigirse a través del puerto que conecta el analizador y el cartucho.

5 **[0106]** Como alternativa, se puede integrar un elemento Peltier en el chip sensor, alimentado por el analizador para acelerar el intercambio de calor.

10 **[0107]** Al contrario que con los sistemas actuales donde se manipulan y analizan fluidos en una escala de mililitros, las formas de realización de la presente invención pueden emplear volúmenes mucho más pequeños que permiten que los dispositivos sean más pequeños y utilicen un menor volumen de reactivo. No obstante, el simple hecho de realizar procesos conocidos a pequeña escala se torna problemático en un producto simple, automatizado y  
15 fabricado en serie debido a que las variaciones en componentes, volúmenes muertos y flexión de componentes implica que la variación de la mezcla sobrepasaría el rango apropiado para las reacciones. El diseño descrito en el presente documento permite facilitar la fabricación debido a que el émbolo y el cilindro pueden realizarse en macrodimensiones de forma que se pueden asegurar la resistencia y calidad al mismo tiempo que se dispensan microlitros de fluido de forma precisa. Además, no es necesario que el usuario sea meticuloso en su actuación, ya  
20 que lo único que necesita el dispositivo para mezclar las proporciones correctas es una única acción hasta su finalización. Del mismo modo, el volumen del fluido final mezclado dispensado se trata enérgicamente disponiendo pocillos para microfluidos expuestos a cada sensor, permitiendo el sobrellenado de la carcasa del cartucho, y sellando los pocillos a un volumen concreto.

25 **[0108]** Aunque se ha descrito la invención por lo que respecta a formas de realización preferidas según se ha expuesto anteriormente, se comprenderá que estas formas de realización son únicamente ilustrativas y que las reivindicaciones no se limitan a esas formas de realización. Los expertos en la materia podrán realizar modificaciones y alternativas a tenor de la descripción, que se contemplan dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Cada característica expuesta o ilustrada en la presente memoria puede incorporarse en la invención, ya sea individualmente o en cualquier combinación apropiada con cualquier otra característica descrita o ilustrada en el presente documento.

**REIVINDICACIONES**

1. Cartucho para detectar muestras biológicas y estando configurado para interactuar con un dispositivo externo, comprendiendo el cartucho:
- una carcasa (80);
  - 5 un chip semiconductor (100, 112) que tiene integrado en el mismo un conjunto de sensores;
  - un bloque de sellado (87) separado del chip para formar un espacio entre ellos; y
  - un conjunto de pocillos abiertos por un lado para recibir las muestras,
- 10 donde el bloque de sellado y el chip están dispuestos para moverse uno respecto al otro entre una posición de no sellado y una posición de sellado para cerrar el espacio con el fin de aislar los pocillos entre sí; **caracterizado por** un actuador dispuesto para desplazar el bloque de sellado a la posición de sellado conforme se extrae el cartucho del dispositivo externo.
2. Cartucho de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo además un conjunto de electrodos expuestos a los pocillos.
- 15 3. Cartucho de acuerdo con la reivindicación 2, comprendiendo además un medio de inclinación para alejar el bloque de sellado del chip semiconductor en la posición de no sellado.
4. Cartucho de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo además un disipador de calor conectado al chip semiconductor.
5. Cartucho de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo además un puerto en la carcasa para recibir una muestra de fluido.
- 20 6. Cartucho de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo además un puerto en la carcasa para recibir y dirigir flujo de aire al chip semiconductor y/o a un disipador de calor.
7. Cartucho de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo además un conector mecánico para conectar el cartucho a un dispositivo externo.
- 25 8. Cartucho de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo además un conector eléctrico (83) para conectar el chip semiconductor a un circuito externo.
9. Cartucho de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el espacio se establece para proporcionar una fuerza capilar para mantener el fluido sobre los sensores.
10. Cartucho de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo además una falda flexible rodeando al menos parte del chip semiconductor para contener exceso de fluido.
- 30 11. Cartucho de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el conjunto de pocillos se proporciona mediante aberturas en un sustrato plano, preferentemente donde el sustrato comprende una placa de circuito impreso (PCB), más preferentemente una PCB flexible.
12. Cartucho de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo además un agente humectante recubriendo una superficie de los pocillos.
- 35 13. Cartucho de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde cada pocillo comprende además un reactivo cubierto por o fijado en un sustrato fundible, preferentemente donde la sustancia fundible es una cera.
14. Cartucho de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo además un calentador para proporcionar calor a la sustancia fundible.
15. Método para detectar muestras biológicas comprendiendo:
- 40 proporcionar un dispositivo de preparación de muestras unido a un cartucho de acuerdo con cualquier reivindicación anterior; accionar el dispositivo de preparación de muestras para dispensar la muestra de fluido dentro del cartucho; y
  - extraer el cartucho del dispositivo de preparación de muestras, durante dicha acción el bloque de sellado y el chip se desplazan el uno respecto al otro entre una posición de no sellado y una posición de sellado para cerrar el espacio con el fin de aislar los pocillos entre sí.
  - 45
16. Método de acuerdo con la reivindicación 15 comprendiendo además la etapa de conexión del cartucho a un analizador para recibir señales de los sensores y determinar una propiedad de la muestra.

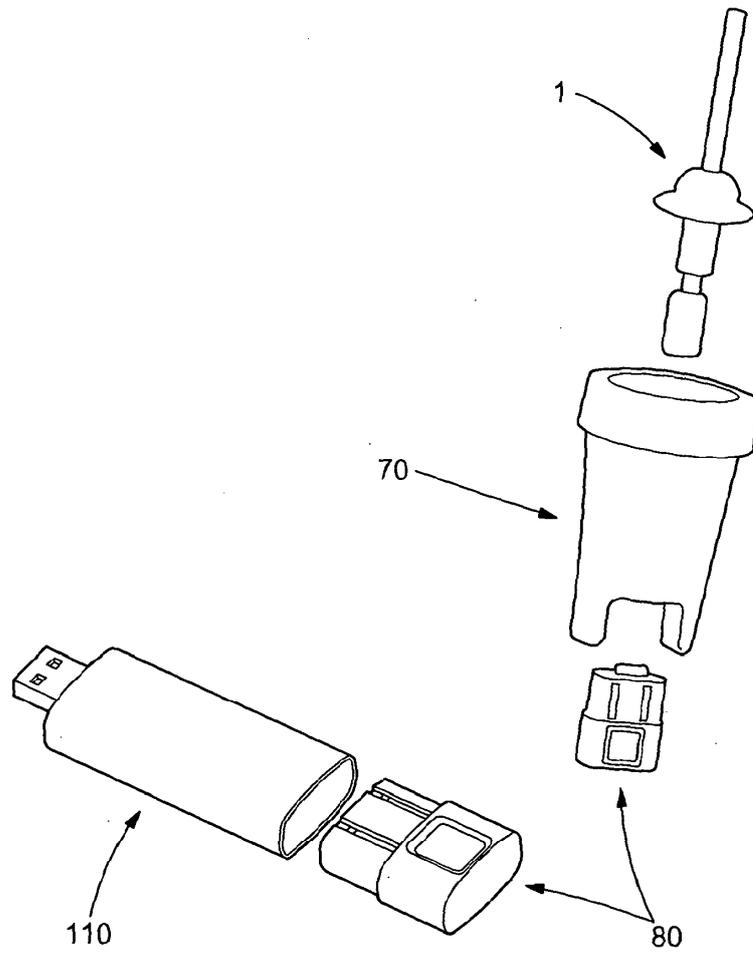


Figura 1

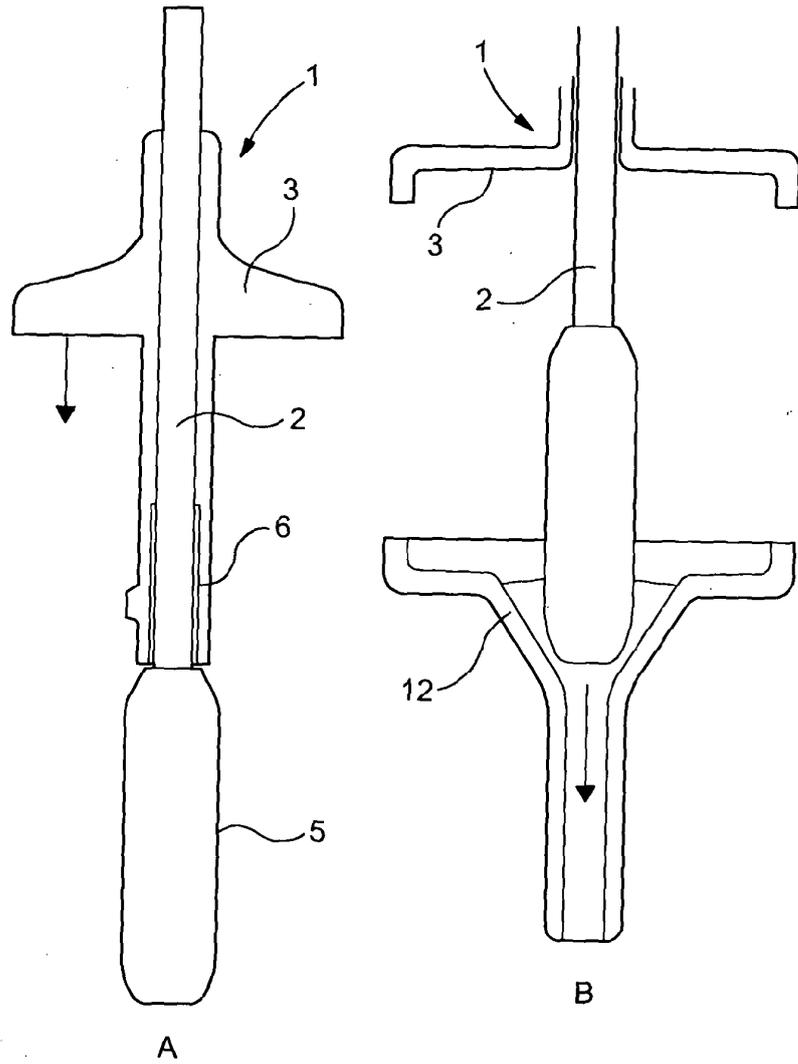


Figura 2

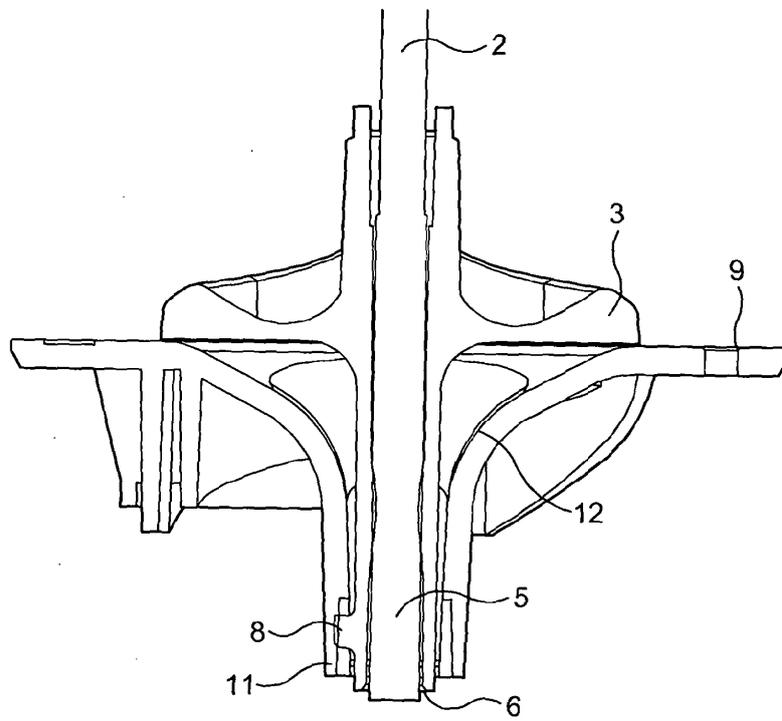


Figura 3

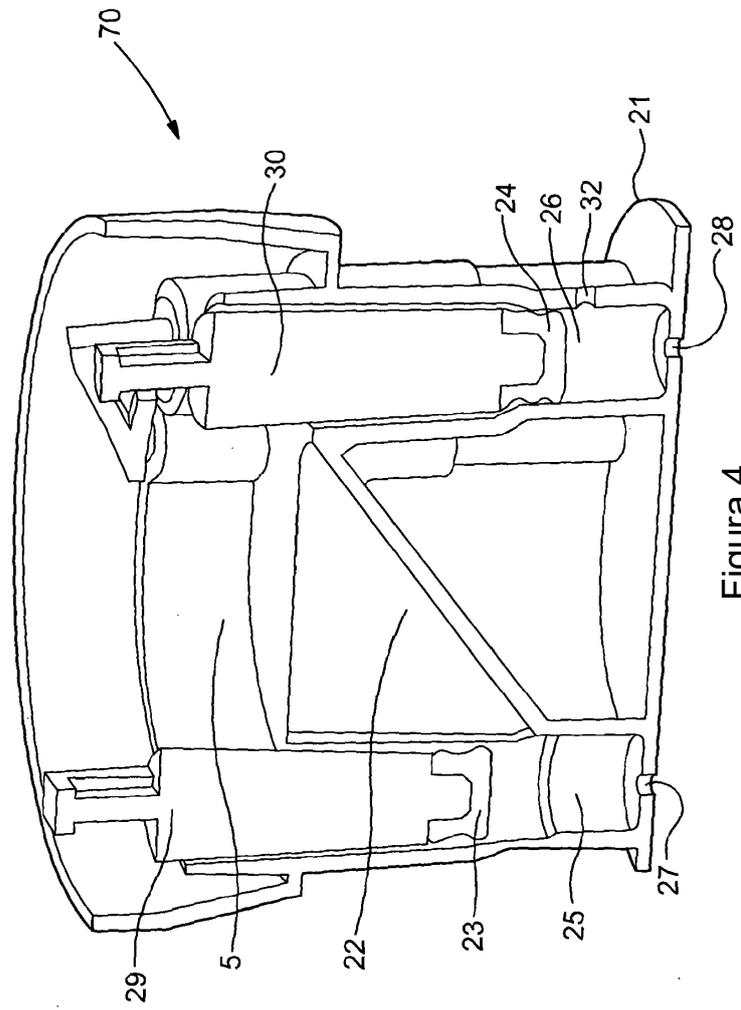


Figure 4

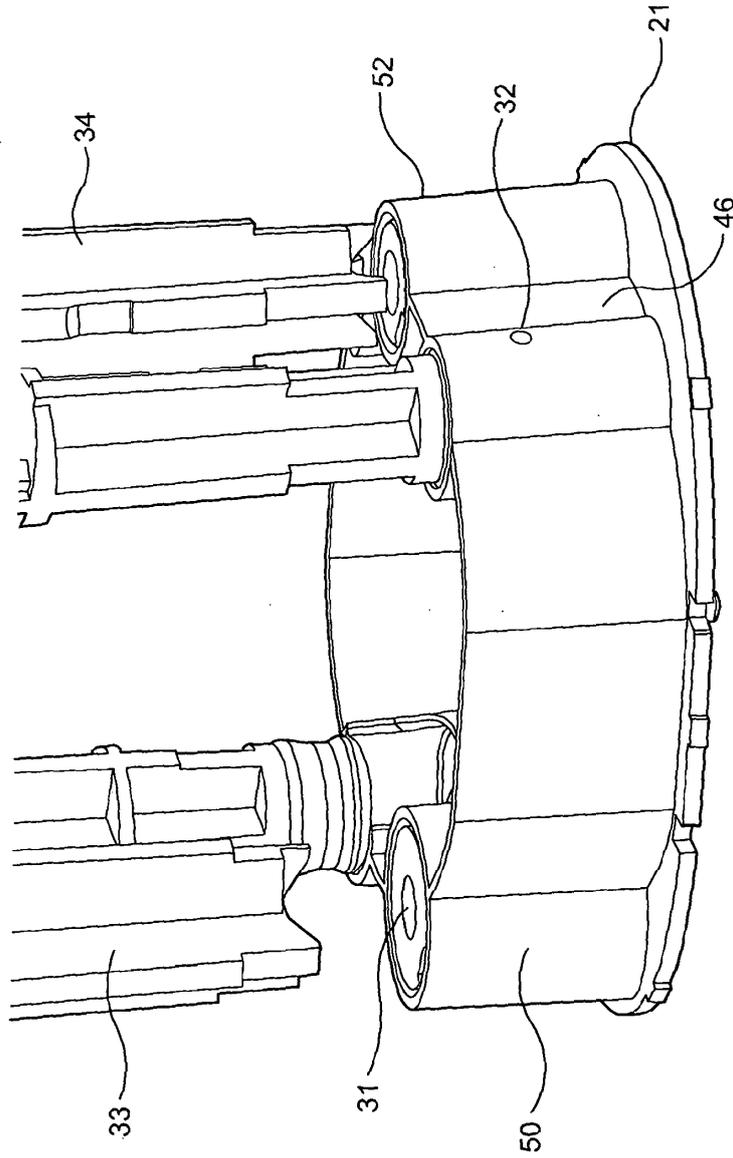


Figura 5

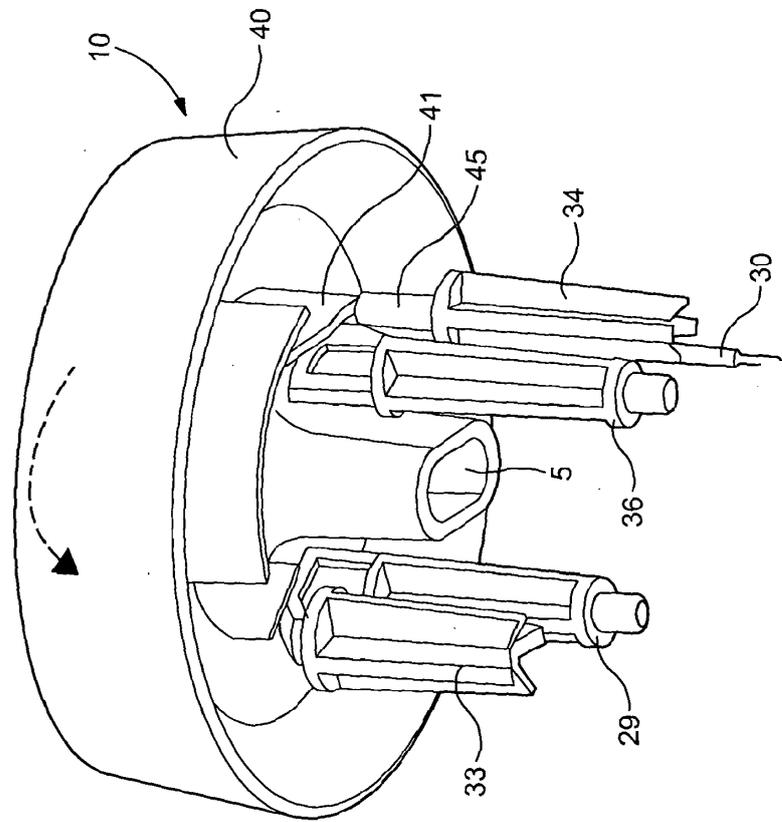


Figura 6

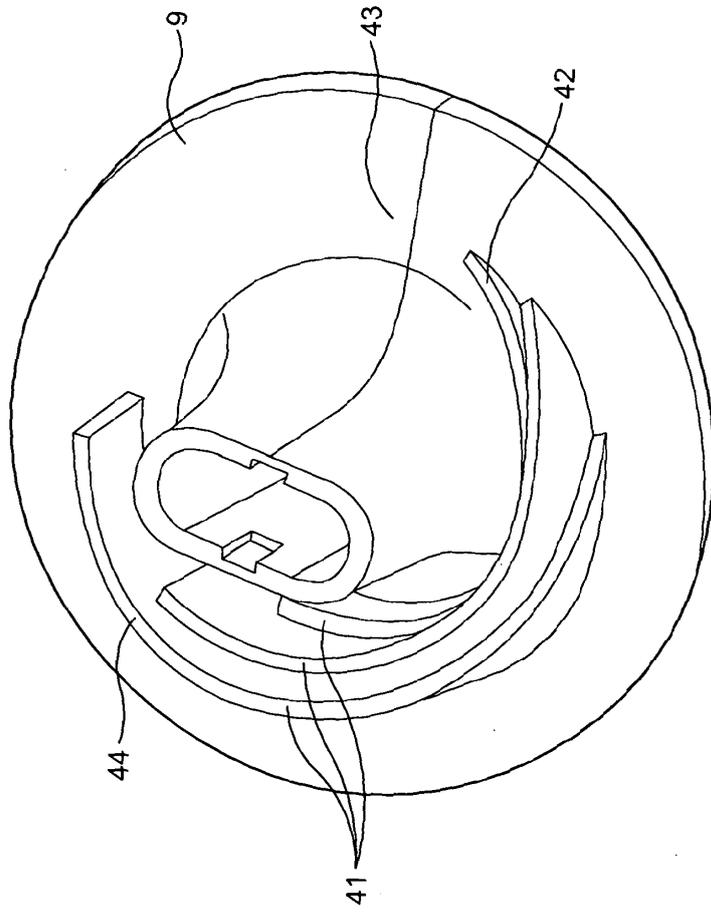


Figura 7

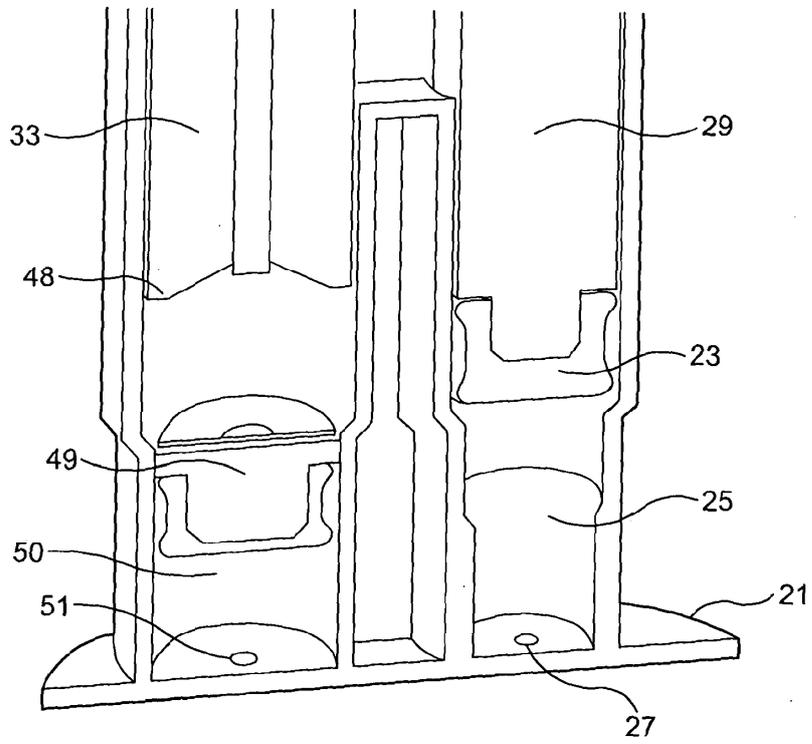


Figura 8

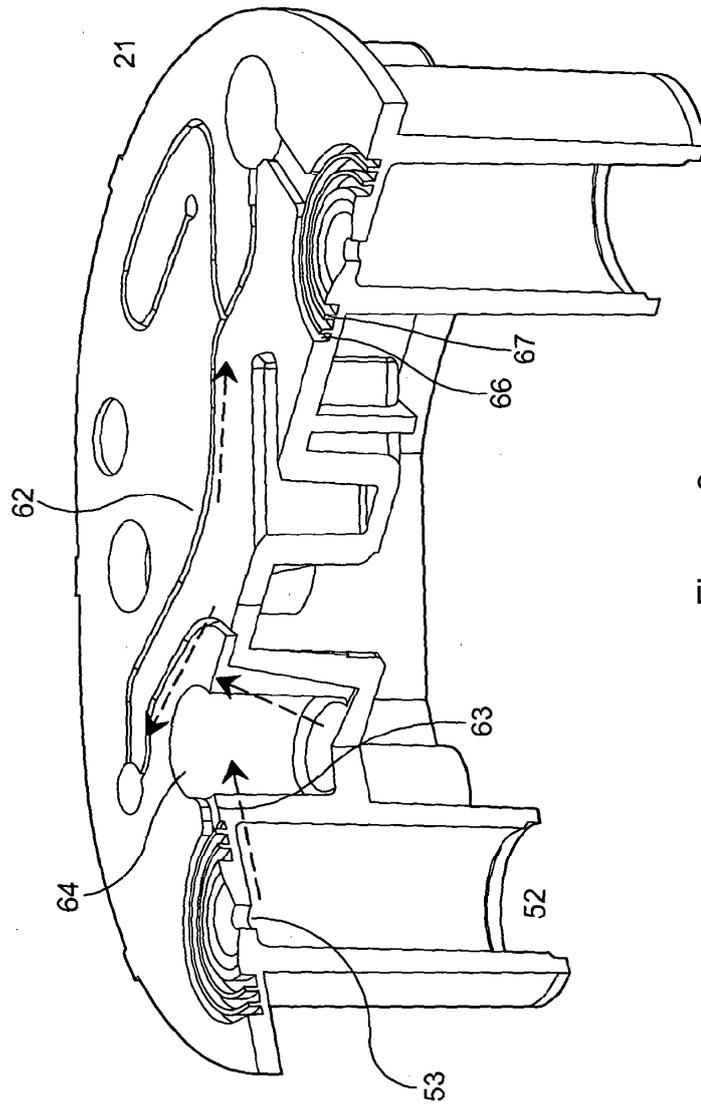


Figura 9

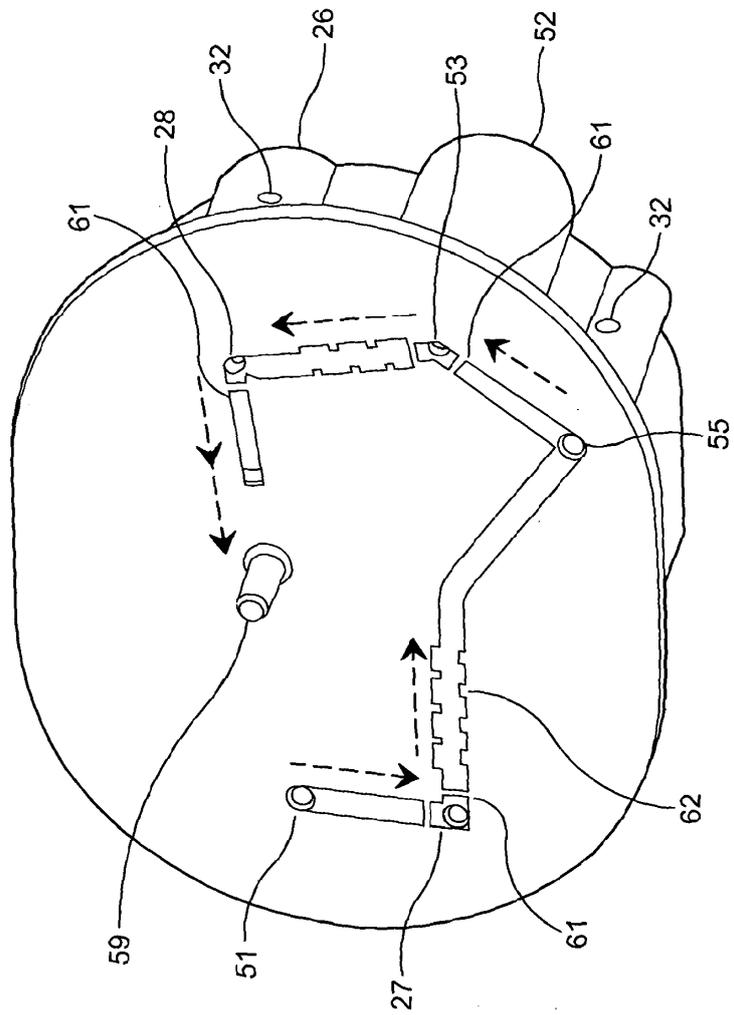


Figura 10

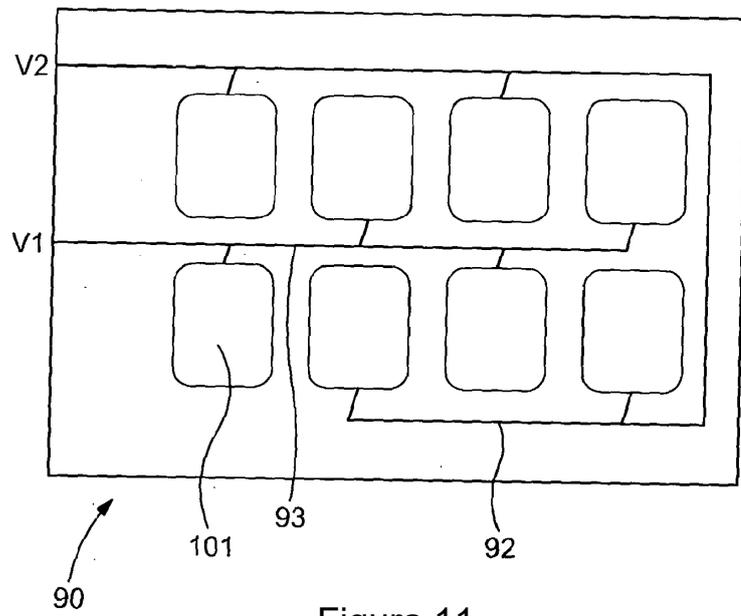


Figura 11

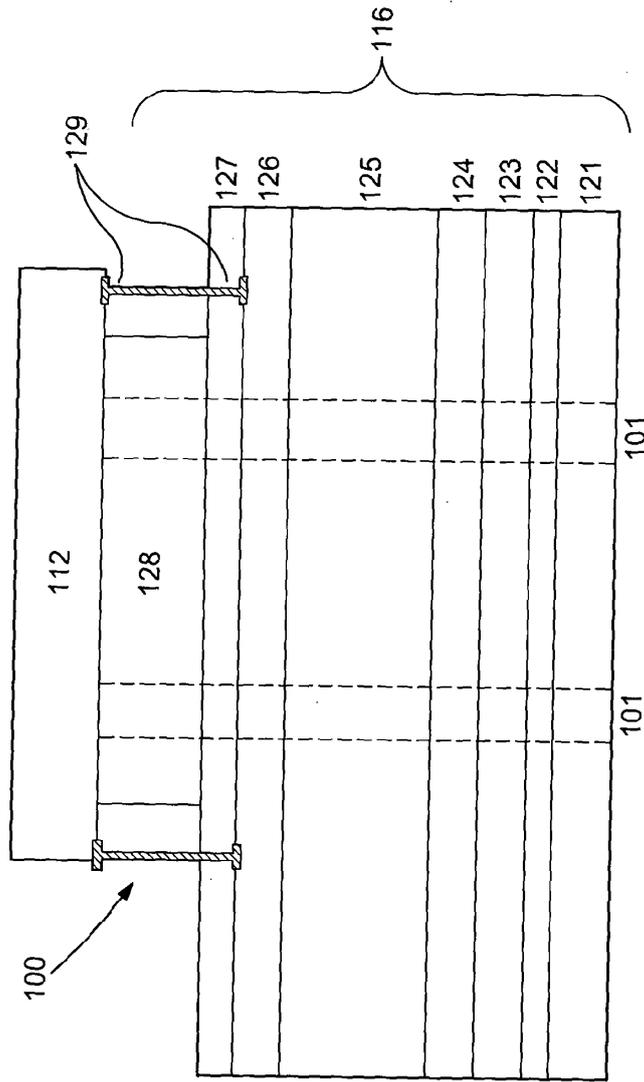


Figure 12

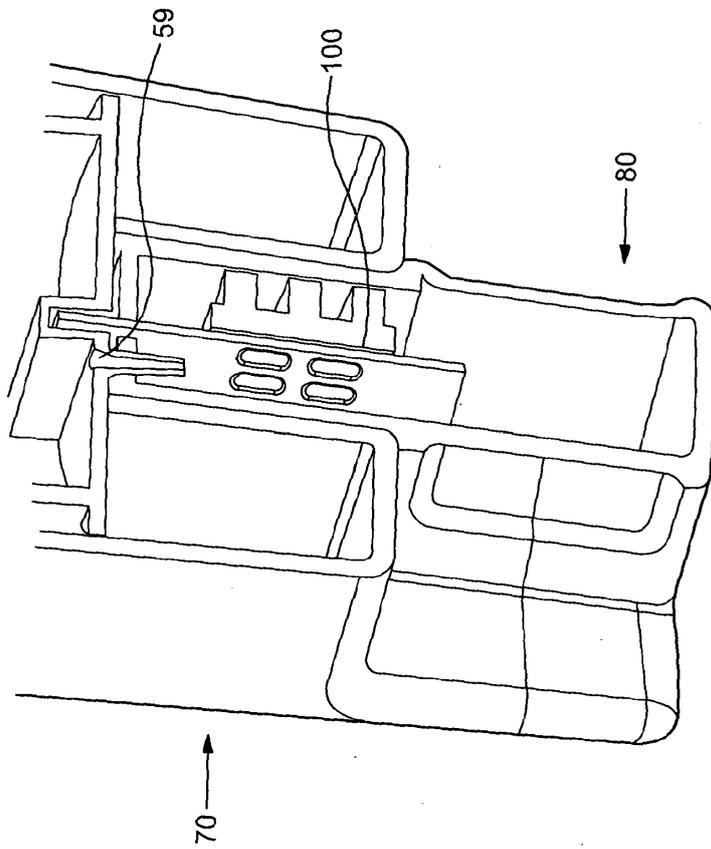


Figura 13

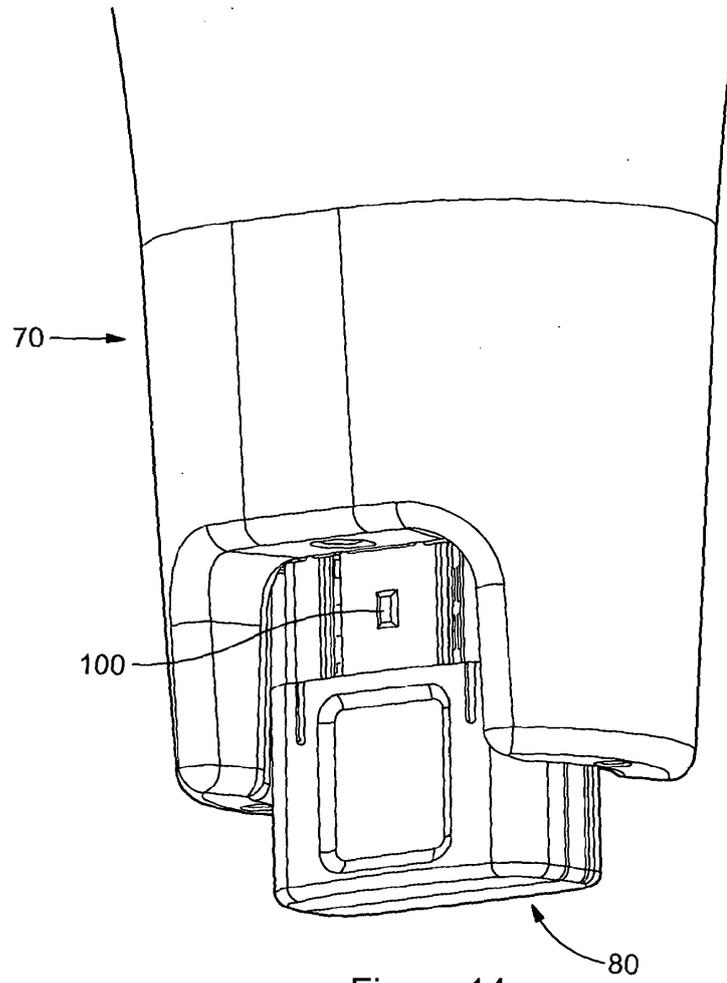


Figura 14

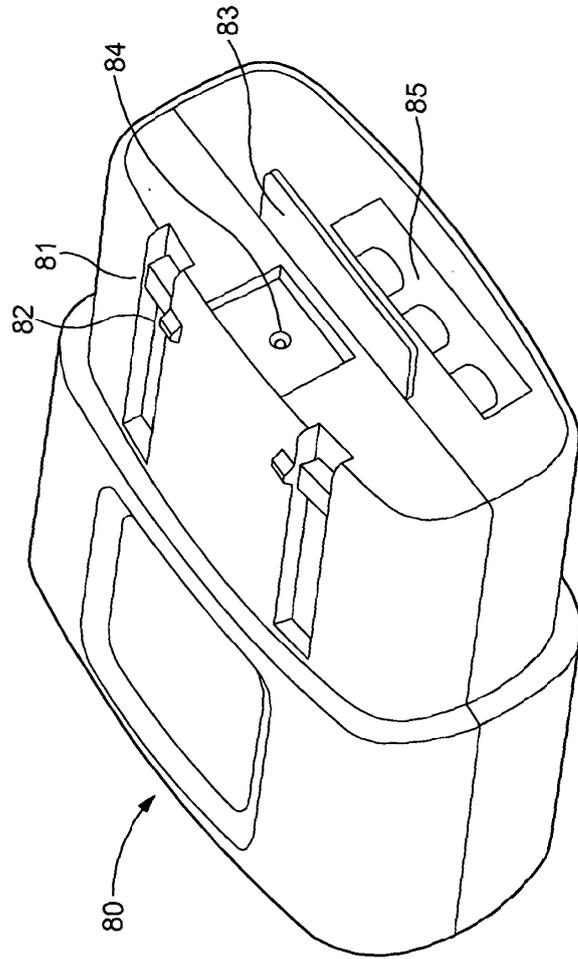


Figura 15

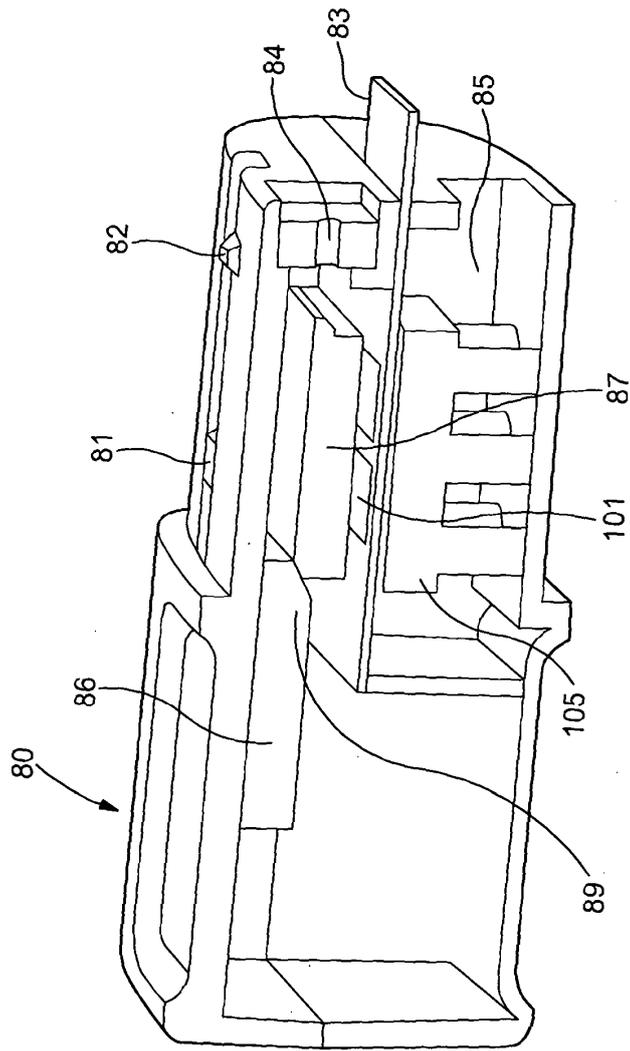


Figure 16

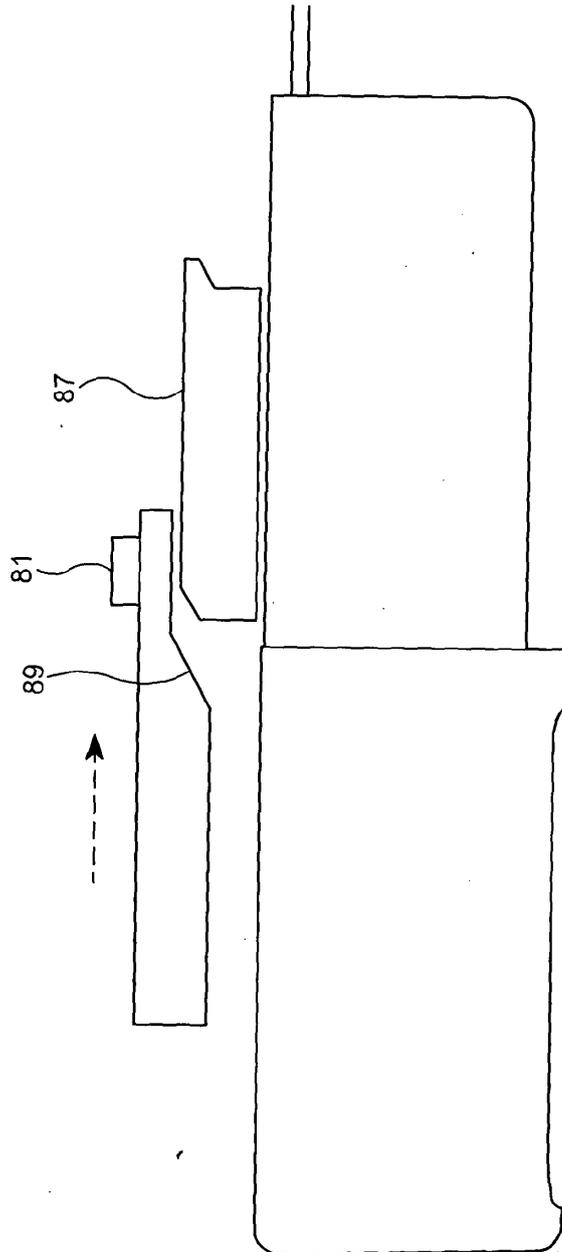


Figura 17

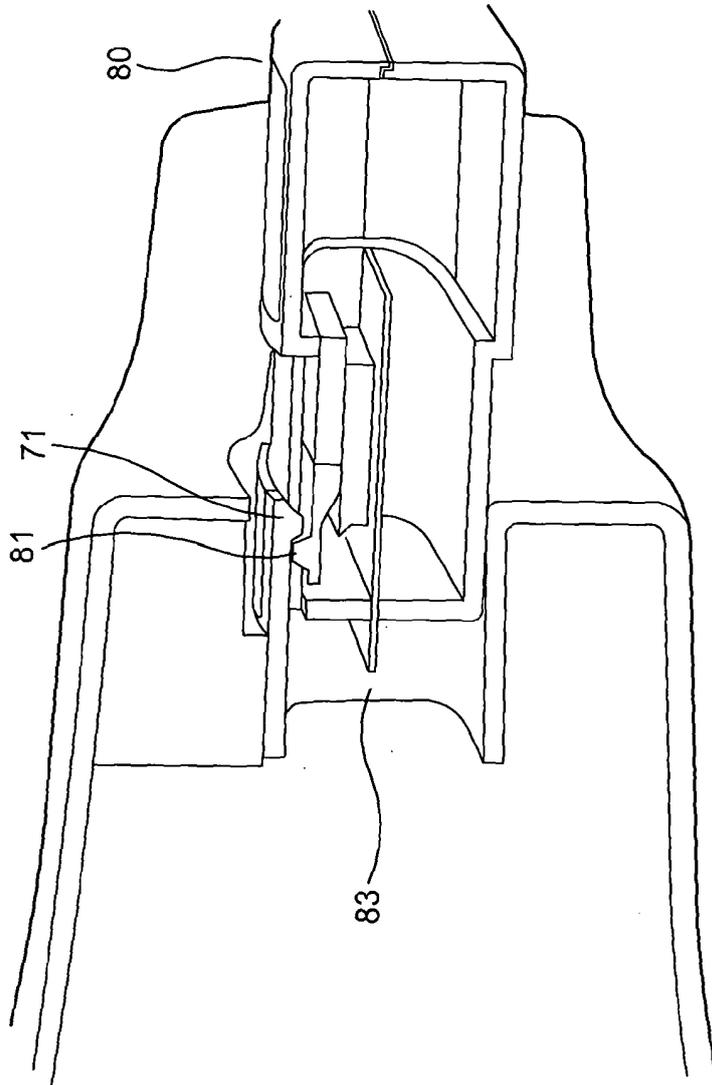


Figura 18

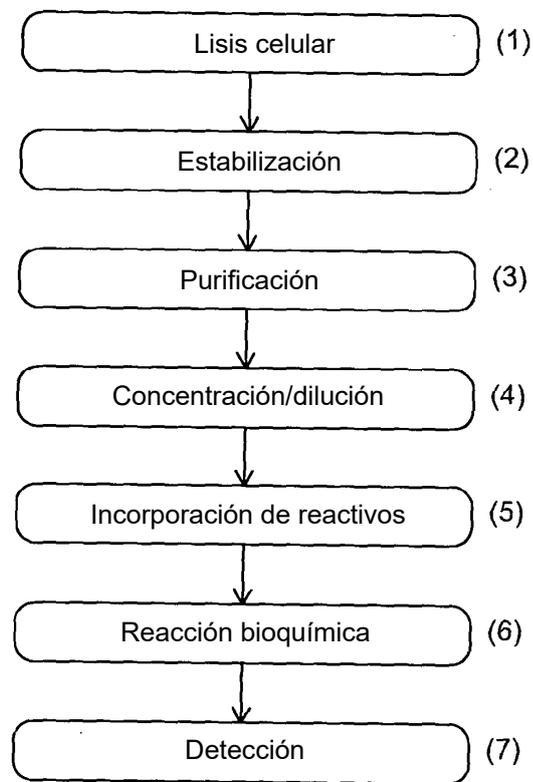


Figura 19

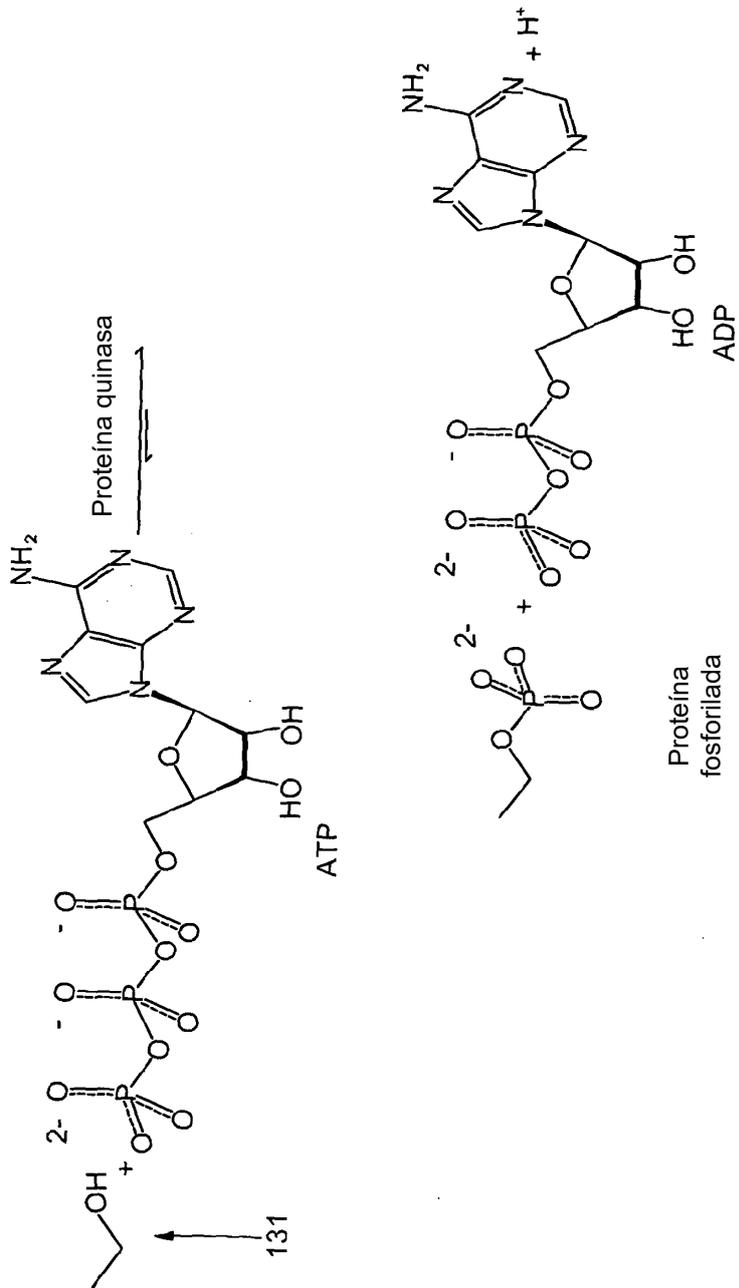


Figura 20

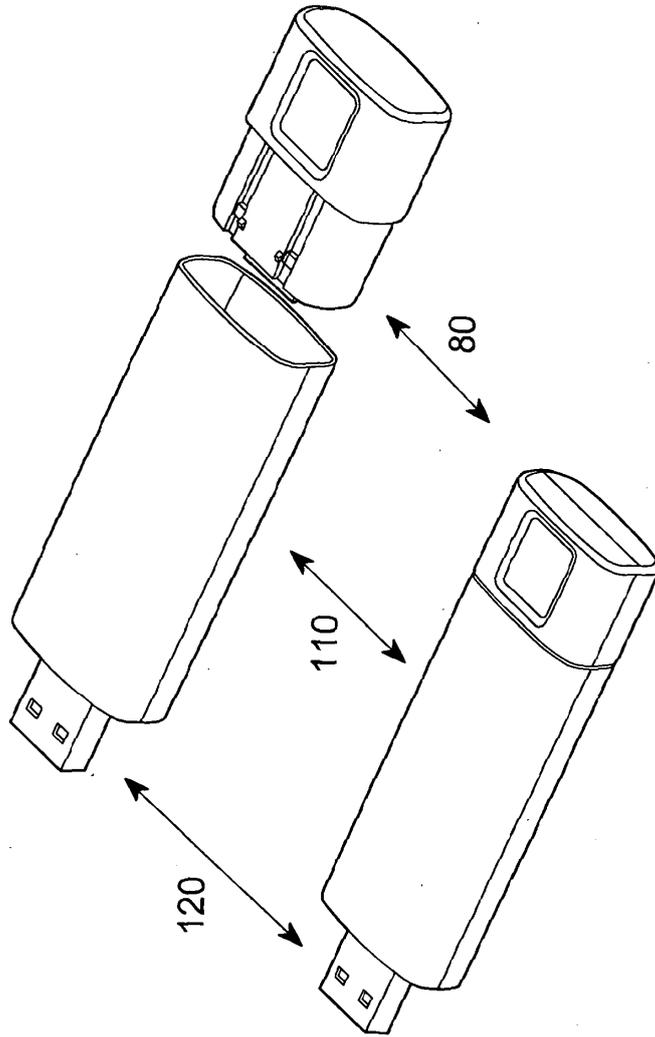


Figura 21

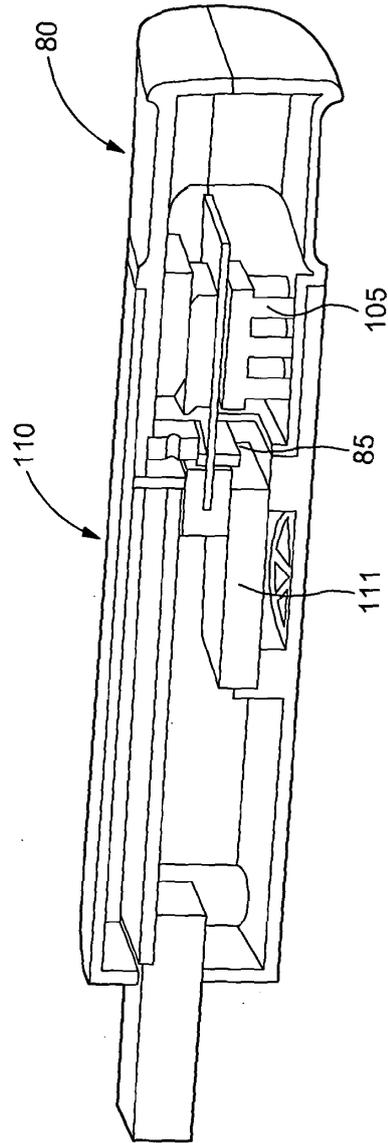


Figura 22