

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 377**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/554 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2015 PCT/EP2015/065163**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.01.2016 WO16001391**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2015 E 15734140 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 3164712**

54 Título: **Matriz microfluídica que soporta un conjunto de bicapa lipídica**

30 Prioridad:

03.07.2014 GB 201411915

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

14.06.2018

73 Titular/es:

**DUBLIN CITY UNIVERSITY (100.0%)
Collins Avenue Glasnevin
Dublin D9, IE**

72 Inventor/es:

**KEYES, TIA;
FORSTER, ROBERT;
BASIT, HAJRA;
MAHER, SEAN y
GAUL, VINCENT**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 672 377 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

Matriz microfluídica que soporta un conjunto de bicapa lipídica.

5 Campo

La presente solicitud se refiere a estructuras que pueden utilizarse como modelos fiables y reproducibles de membranas celulares en las que pueden ensamblarse proteínas de membrana. La solicitud se refiere particularmente a una matriz microfluídica que soporta un conjunto de bicapa lipídica sobre el cual pueden ensamblarse proteínas de membrana. Las presentes enseñanzas también pueden encontrar aplicación dentro del contexto de imitar membranas de orgánulos.

Antecedentes

15 Las proteínas de membrana (MP) constituyen casi una tercera parte de todas las proteínas humanas y se sabe que orquestan funciones celulares clave que van desde el transporte de iones, unión célula-célula, hasta la señalización. Por consiguiente, dichas proteínas son dianas importantes en el descubrimiento de fármacos. Sin embargo, a pesar de su importancia, el estudio *in vitro* directo de proteínas de membrana carece de modelos de selección de alto rendimiento adecuados, que puedan fabricarse de manera reproducible, con composición de lípidos controlada y en los que la integridad estructural de la proteína se conserve tras la reconstitución. Entornos de modelo biológicamente apropiados que sean sencillos de construir y adecuados para aplicaciones basadas en chip siguen suponiendo un reto importante. Una característica clave de la membrana celular, que es importante en la función de proteínas de membrana, es su fluidez en 2-D inherente. La difusión lateral de lípidos y proteínas de membrana dentro de la membrana regula la distribución de componentes de membrana y afecta a muchos procesos, tales como la formación de complejos de proteínas y el ensamblaje/desensamblaje dinámico de microdominios desordenados y ordenados de lípidos. Por tanto, para que cualquier modelo de bicapa artificial sea creíble, debe presentar la propiedad de alta movilidad lateral de constituyentes lipídicos y proteicos.

30 Para ello, aunque las bicapas lipídicas soportadas (SLB) son valiosos modelos de bicapas artificiales, un inconveniente principal inherente es la interacción de la bicapa con el sustrato sólido, lo que reduce drásticamente la movilidad de los lípidos y las proteínas de membrana incorporadas en comparación con membranas celulares nativas o liposomas libres. Se han emprendido varios enfoques para abordar esta cuestión, incluyendo membranas de bicapa lipídica ancladas (t-BLM) con el fin de minimizar estas interacciones mediante la inclusión de un espaciador entre la bicapa y la superficie. Aunque se mostró que las t-BLM proporcionan mejor estabilidad a las bicapas lipídicas, los coeficientes de difusión de los lípidos medidos no mejoraron significativamente en comparación con los medidos para SLB en sustratos planos y lo mismo es cierto para SLB amortiguadas. Con el fin de obtener bicapas lipídicas que estén lo suficientemente separadas de los sustratos subyacentes, otro enfoque es extender bicapas lipídicas a través de aberturas de tamaño nano y micrométrico, formando las denominadas membranas lipídicas negras (BLM). Sin embargo, las BLM presentan una escasa estabilidad debido a la retención de disolventes orgánicos que se utilizan comúnmente en su preparación. Además, la incorporación y estabilidad de proteínas de membrana se ve gravemente limitada debido a su modo de preparación desfavorable y los disolventes restantes dentro de la bicapa.

45 También se conoce en la técnica el diseño de procedimientos libres de disolventes para bicapas lipídicas que se extienden sobre poros. Sin embargo, la mayoría de dichas técnicas funcionan en condiciones restringidas tales como la utilización de determinado tamaño de los poros y las vesículas, aplicación de flujo de cizalladura y pH, la utilización de vesículas unilamelares gigantes (GUV) o que se extienden sobre sustratos secos. Aunque cada uno de estos procedimientos ha aclarado los mecanismos de una variedad de membranas lipídicas que se extienden sobre poros, la incorporación y manipulación de proteínas de membrana dentro de estos sistemas sigue siendo una tarea desalentadora.

Típicamente, las mejores alternativas utilizadas son ensayos con células vivas. Sin embargo, son caros de implementar debido a los costes asociados con el cultivo celular. Por tanto, una etapa intermedia en la que puedan evaluarse las interacciones con membrana, interacciones con proteínas en un entorno biomimético y/o el transporte transmembrana antes de una evaluación preclínica más compleja podría ofrecer ahorros significativos.

60 Se han descrito estructuras de matriz porosa, por ejemplo el documento WO 2006/104639 describe una matriz porosa en la que los poros presentan todas dimensiones submicrométricas. Chemical Communications vol. 47, 2011, "Lipid bilayer assembly at a gold nanocavity array", págs. 12530-12532, Jose *et al.*, demuestra la utilización de poros de tamaño nanométrico en matrices con diámetros <800 nm. Sin embargo, la limitación de todas estas estructuras es que son submicrométricas y hasta ahora se han identificado retos significativos para obtener una bicapa que se extienda sobre aberturas mayores de 1 micrómetro.

Sumario

65 Por consiguiente, se proporcionan una matriz microfluídica y un procedimiento tal como se definen en las

reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

- 5 A continuación, se describirá la presente solicitud haciendo referencia a los dibujos adjuntos, en los que:
- las figuras 1A y 1B proporcionan una ilustración esquemática de las etapas implicadas en la formación de una matriz que presenta capas lipídicas de extensión libre sobre microcavidades rellenas con tampón;
- 10 la figura 2A proporciona una ilustración de una plataforma microfluidica que utiliza la matriz de la figura 1;
- la figura 2B muestra otro ejemplo de una plataforma proporcionada según las presentes enseñanzas;
- 15 la figura 3 muestra la obtención de imágenes confocales de una bicapa dopada de manera fluorescente formada sobre cavidades de diferentes tamaños;
- la figura 4 muestra imágenes de FLIM de (a) reflectancia y (b) fluorescencia obtenidas para lípido que se extiende sobre cavidades con un diámetro de 3 μm ;
- 20 la figura 5 muestra curvas de autocorrelación normalizadas medidas por encima de una cavidad de 3 μm y sobre las regiones planas de la bicapa soportada;
- la figura 6 muestra imágenes de FLIM de (a) reflectancia y (b) fluorescencia de bicapa que contiene glicoforina A que se extiende sobre una cavidad de 3 μm de diámetro;
- 25 la figura 7 muestra (a) una curva de autocorrelación normalizada medida por encima de una cavidad de 3 μm de diámetro (símbolos circulares) y (b) una curva de intensidad-tiempo para la medición realizada sobre regiones planas en una bicapa lipídica soportada;
- 30 la figura 8 muestra imágenes de FLIM de (a) reflectancia y (b) fluorescencia de bicapa que contiene anexina V marcada que se extiende sobre una cavidad de 3 μm de diámetro;
- la figura 9 muestra (a) una curva de autocorrelación normalizada medida por encima de una cavidad que se extiende 3 μm (símbolos circulares rojos) y (b) una curva de intensidad-tiempo para la medición realizada sobre regiones planas en la bicapa lipídica soportada;
- 35 la figura 10 es una representación gráfica de la admitancia de electrodo de matriz con microcavidades de oro de 5 micrómetros de diámetro, tratado con mercaptoetanol, antes y después de la formación de bicapa de DOPC;
- 40 la figura 11 es una representación gráfica de la admitancia del efecto de la introducción de ibuprofeno (4 mMol) a bicapa de DOPC en matrices con cavidades de oro de 2,8 μm sobre la espectroscopia de impedancia de CA de la bicapa;
- 45 la figura 12 (A) es una imagen de vida útil de fluorescencia de los poros de 2,8 μm de diámetro en PDMS tras la adición de ibuprofeno (4 mMol) a una bicapa de DOPC; y
- la figura 12 (B) una comparación de las curvas de autocorrelación para la difusión de lípidos de una bicapa de DOPC (DOPE-BODIPY marcado al 1% mol/mol) soportada sobre cavidades de PDMS de 2,8 micrómetros en presencia y ausencia de ibuprofeno 4 mMol.
- 50 La figura 13 demuestra datos experimentales que muestran funciones de autocorrelación para datos experimentales especificados.
- 55 La figura 14 muestra espectros de impedancia electroquímica (EIS) de una bicapa de DOPC soportada a través de solución salina tamponada con fosfato (PBS) acuosa;
- la figura 15 muestra resultados de un estudio de EIS de rifampicina en una bicapa de DOPC soportada en cavidad de oro, tras la introducción de 0 a 100 μmol de fármaco en el canal de flujo de la matriz en contacto con tampón PBS.
- 60 La figura 16 muestra resultados de un estudio de EIS de rifampicina en una bicapa de DOPC soportada en cavidad de oro, tras la introducción de 10 μmol de fármaco en el canal de flujo de la matriz en contacto con la bicapa. Este experimento se llevó a cabo en la oscuridad para evitar reacciones de rifampicina inducidas por luz. Se dejó la cámara en la oscuridad durante la noche y no mostró ningún cambio adicional.
- 65

La figura 17 muestra un estudio de EIS de rifampicina en una bicapa de DOPC soportada en cavidad de oro, tras la introducción de 10 μ mol de fármaco en el canal de flujo de la matriz en contacto con la bicapa; el experimento se llevó a cabo con iluminación y el cambio de la impedancia dependiente del tiempo refleja la reacción fotorredox de rifampicina.

La figura 18 muestra datos de utilización de una matriz según las presentes enseñanzas en una aplicación para moléculas transportadoras con el ionóforo valinomicina.

La figura 19 muestra datos de utilización de una matriz según las presentes enseñanzas en una aplicación para moléculas transportadoras con el ionóforo nigericina.

Descripción detallada de los dibujos

Según las presentes enseñanzas, se proporciona una matriz nanoporosa microfluidica que presenta unas dimensiones que oscilan entre el nivel submicrométrico y el micrómetro y que soporta una capa (o bicapa) lipídica de extensión y proteínas de membrana reconstituidas encerradas en la misma. Una matriz de este tipo puede dotarse de nano o microporos. La matriz comprende una capa o bicapa lipídica extendida sobre cavidades semiesféricas rellenas de tampón de tamaño micrométrico o de nanoporos formadas en esta disposición a modo de ejemplo sobre polidimetilsiloxano (PDMS) hidrófilo. Se utiliza una bicapa preparada utilizando una técnica de Langmuir Blodgett o Langmuir Blodgett Schaeffer o (particularmente en el caso de bicapas que contienen proteínas) una combinación de técnicas de Langmuir-Blodgett y de fusión de vesículas para obtener una capa (o bicapa) libre de defectos que se extiende sobre las cavidades. Puede extenderse de manera fiable un intervalo de tamaños de cavidad de desde 620 nm hasta 5 micrómetros utilizando esta técnica y las bicapas extendidas permanecen intactas y estables durante varios días.

Una matriz según las presentes enseñanzas puede utilizarse para ensamblar una capa o bicapa lipídica de extensión para dar una célula de flujo que se monta directamente en un microscopio. Aunque las presentes enseñanzas pueden utilizarse a nivel submicrométrico, por ejemplo en el intervalo de 620 nm a 1 micrómetro, se apreciará que tienen aplicación significativa en la provisión de bicapas lipídicas que se extienden sobre poros mayores de 1 micrómetro. Tal como resultará evidente a partir de la siguiente discusión, dichas disposiciones requieren un microporo que presente una razón de altura de poro con respecto al diámetro de abertura mayor que uno, es decir, la forma del microporo es al menos un poco más que una semiesfera. Por ejemplo, una cavidad de 3 micrómetros, si se forma con una abertura de poro por encima del ecuador de la esfera, puede presentar una abertura de, por ejemplo, 2 micrómetros, de modo que la razón de altura con respecto a abertura es de 3/2. Los presentes inventores han constatado que si el poro presenta dimensiones mayores de 1 micrómetro, entonces el poro debe ser una esfera truncada para soportar la bicapa lipídica de una manera estable durante periodos de días.

A continuación, se describirán las presentes enseñanzas haciendo referencia a una ruta a modo de ejemplo de preparación de la matriz 100 tal como se muestra en las figuras 1A y 1B.

Tal como se muestra en la figura 1A, se prepara un sustrato polimérico (por ejemplo PDMS) mediante deposición de partículas esféricas de esferas 102 sobre un portaobjetos 101 de sustrato recubierto con vidrio, mica, cuarzo, metal u oblea de silicio. Específicamente, se deja autoensamblarse una matriz ordenada de esferas 102 de poliestireno coloidales para dar una matriz con empaquetamiento compacto sobre el portaobjetos 101. Después se recubre esta matriz de esferas 102 con PDMS (polidimetilsiloxano). Tras curarse, se desprende o se retira el PDMS del portaobjetos 101. Se invierte el PDMS para revelar una matriz con empaquetamiento compacto de cavidades 103 impresas en el sustrato de PDMS 104. Efectivamente, la matriz con empaquetamiento compacto sobre el portaobjetos forma un molde para la disposición final en patrones del sustrato de PDMS. Las dimensiones de las esferas 102 utilizadas en el procedimiento de formación de molde determina el tamaño final de los nanoporos que se forman en la superficie del sustrato de PDMS.

Se ha encontrado que un diámetro de 600 nm es adecuado para las esferas 102, pero el experto puede elegir como apropiado cualquier diámetro según el tamaño de la cavidad deseado. El portaobjetos 101 y la matriz de esferas 102 pueden volver a utilizarse para la fabricación de más sustratos de PDMS 104 que presentan cavidades 103 en los mismos.

Tras la separación del sustrato de PDMS 104 y el portaobjetos 101, se hace que el sustrato 104 sea hidrófilo mediante tratamiento con plasma a presión de aire controlada durante 5 minutos. Evidentemente, el experto puede elegir la duración del tratamiento según sea apropiada y no debe considerarse que las presentes enseñanzas se limiten a 5 minutos.

Después se rellenan las cavidades 103 en el sustrato 104 mediante sonicación con una disolución 105, por ejemplo tamponada, durante 30-45 minutos. Tal como se explicará con más detalle a continuación, con el fin de un ensamblaje óptimo de capa/bicapa lipídica, los poros deben rellenarse con la disolución 105 anteriormente

mencionada. Esta disolución 105 es normalmente acuosa, por ejemplo agua sola o disolución acuosa que contiene sal y/o azúcar y/o tampón, por ejemplo tampón de pH o fuerza iónica.

5 Con referencia a la figura 1B, después se lleva a cabo el ensamblaje de una capa lipídica 106 sobre la matriz 100 de cavidades 103. Esto puede lograrse ensamblando la capa lipídica 106 mediante el procedimiento conocido de Langmuir-Blodgett (LB) o LB Schaefer (LBS) para formar la capa lipídica 106. Se apreciará que un método de Langmuir-Blodgett contiene la deposición de una o más monocapas de un material orgánico desde la superficie de un líquido sobre un sólido mediante inmersión (o emersión) del sustrato sólido en (o desde) el líquido. Se adsorbe una monocapa de manera homogénea con cada etapa de inmersión o emersión, por tanto pueden formarse películas con grosor muy preciso. Este grosor es preciso porque se conoce el grosor de cada monocapa y por tanto puede sumarse para hallar el grosor total de una película de Langmuir-Blodgett.

15 La capa lipídica formada 106 presenta una composición seleccionada que puede ser un único lípido o una mezcla compleja de lípidos. Para estudios ópticos, por ejemplo FLCS o FCS, el lípido puede estar marcado. Por ejemplo, se extiende el 1% mol/mol del DOPE marcado con colorante apropiado en la capa lipídica 106. Se apreciará que el marcaje del lípido se realiza si se desea estudiar la dinámica del lípido. Sin embargo, tal como se explicará con más detalle a continuación, cuando se requiere un estudio de proteínas, pueden marcarse las proteínas o pueden marcarse tanto las proteínas como los lípidos. El lípido marcado no necesita estar marcado durante la deposición de LB, puede introducirse con una etapa de fusión de liposomas si tiene lugar. El lípido marcado también puede introducirse mediante autoensamblaje en la capa tras el ensamblaje de bicapa, particularmente útil si se desea un marcaje asimétrico. Tal como se explicará en más detalle, normalmente se realiza una etapa de fusión de liposomas si se introduce una proteína en la matriz.

25 Opcionalmente, la formación de la primera capa lipídica 106 puede ir seguida por la deposición de una segunda capa lipídica 107 encima de la primera capa 106 para formar una bicapa lipídica 106, 107. La formación de la segunda capa lipídica 107 puede lograrse o bien mediante una segunda etapa de LB o LBS o bien por fusión de liposomas sobre la primera capa 106. La fusión es cuando se altera un liposoma (también conocido como vesícula) encima de la primera capa lipídica 106 (o bicapa 106, 107) formada mediante LB. Tal como se mencionó anteriormente, cuando se introduce una proteína en la matriz, normalmente se utiliza una etapa de fusión de liposomas. Si se desea proporcionar capas asimétricas, el ensamblaje de LB puede proporcionar una composición de lípidos diferente a la matriz para las capas primera 106 y segunda 107. Por ejemplo, la composición de liposoma de la segunda capa 107 puede variar con respecto a la de la primera capa depositada mediante LB 106.

35 Las cavidades pueden considerarse depresiones en la superficie plana del sustrato 104. También debe observarse que la forma de las cavidades es importante ya que cada una de las cavidades individuales comprende paredes laterales arqueadas que se extienden hacia abajo al interior del sustrato desde la superficie plana. De esta manera las depresiones definen una esfera truncada, algunas veces denominada bóveda esférica o tapa esférica. Tales estructuras se definen por una porción de una esfera que se corta por un plano. En el contexto de las presentes enseñanzas, de manera deseable estas depresiones presentan una geometría cuya altura de poro con respecto al diámetro de abertura es mayor que uno, es decir, el pocillo definido por la depresión es más profundo que su agujero en la parte superior. En particular, en la parte superior o agujero de las cavidades donde se define una abertura que proporciona acceso a la depresión, las paredes se aproximan entre sí, es decir, el diámetro del agujero o abertura es menor que el diámetro de la cavidad definida por el poro. Se ha encontrado que esta forma es la más adecuada para el ensamblaje de una capa lipídica 106 sobre la matriz 100 de cavidades 103 ya que proporciona más soporte a la capa lipídica que las cavidades de pared recta. Además, se ha encontrado que si los bordes de las cavidades 103 están curvados en vez de ser afilados, esto garantiza que la capa lipídica no se perfora por los bordes afilados. Los presentes inventores han encontrado que la utilización de tales disposiciones que presentan un diámetro mayor que 1 micrómetro puede soportar bicapas lipídicas de una manera estable durante periodos de tiempo de más de algunas horas, de hecho se ha encontrado una estabilidad del orden de días.

50 Una de las ventajas de las cavidades 103 según las presentes enseñanzas es que pueden crearse gradientes de concentración, por ejemplo osmótica o iónica, a través de la bicapa rellenando las cavidades 103 con una concentración de disolución diferente (por ejemplo sal, pH o azúcar) con respecto a una disolución de contacto externa.

60 Los inventores de la presente solicitud han realizado el procedimiento anteriormente resumido para la construcción de la matriz para el ensamblaje de capa y bicapa lipídica a través de una amplia gama de composiciones de lípidos, incluyendo desde capas de dioleilfosfatidilcolina (DOPC) simples hasta conjuntos ternarios complejos que contienen PS, DOPC DOPS, colesterol y esfingomielinas, mediante ensamblaje de LB seguido por alteración de vesícula (fusión de liposomas). La alteración de vehículo introduce un liposoma o proteoliposoma en la capa lipídica 106 que produce alteración al contacto con la capa para formar la segunda capa (o valva) 107 de la bicapa lipídica 106, 107 en la superficie.

65 Habiendo formado una capa/bicapa lipídica sobre el sustrato, la estructura resultante comparte muchas

- características con una membrana celular y puede considerarse una membrana celular artificial. Habiendo fabricado esta artificial membrana celular, es posible introducir proteínas en las capas/bicapas lipídicas. Como resultado estas membranas celulares artificiales proporcionan nuevos modelos poderosos para estudiar el comportamiento de tales proteínas en entornos altamente biorrelevantes. Cuando se describen con referencia a liposomas se apreciará que las matrices según las presentes enseñanzas pueden extenderse para adaptarse a otras formas de estructuras que imitan membranas tales como nanodiscos que presentan forma de disco, nanoescalas, bicapas fosfolipídicas rodeadas por dos moléculas de una proteína de hélice alfa anfipática que rodea el disco de bicapa como un cinturón y limita su tamaño.
- Se apreciará y entenderá que el término general proteínas de membrana incluye proteínas transmembrana y periféricas, todas las cuales están asociadas a membrana. Cuando la siguiente descripción hace referencia a proteínas transmembrana se apreciará que esto es para proporcionar detalles de una implementación a modo de ejemplo de las presentes enseñanzas y no se pretende que limite la solicitud únicamente a proteínas transmembrana.
- En este contexto, las figuras 1A y 1B describen una secuencia de etapas en la que se proporciona un ensamblaje de proteínas transmembrana rellenando las cavidades 103 con proteoliposomas antes de formar la capa/bicapa lipídica sobre la cavidad. Los proteoliposomas se preparan mediante reconstitución de una proteína de membrana en un liposoma utilizando detergente seguido por eliminación del detergente utilizando bioperlas.
- A continuación, se describe un ejemplo de un protocolo para integrina que logra esto: Se seca lípido en cloroformo de la composición deseada bajo una corriente constante de nitrógeno en un vial de vidrio antes de colocarse a vacío durante 2 horas para garantizar la evaporación de disolvente. Para estudios de difusión de lípidos, también se incluye DOPE-atto655 al 1% mol/mol con respecto a lípido. Después se solubiliza el lípido a 1 mM en un tampón de reconstitución (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 1 mM, Triton X-100 al 0,1%, pH 7,4). Después se añade integrina marcada (proteína) al vial antes de agitar la disolución a temperatura ambiente durante 30 minutos para garantizar completamente que se ha solubilizado todo el lípido y que la disolución es homogénea. Después se incuba la disolución a 37°C durante 1 hora y 30 minutos. Se elimina el detergente mediante la adición de 100 mg de bioperlas por ml de disolución durante 3 horas y 30 minutos en un vial con agitación lenta. Después se retiran las bioperlas y se sustituyen por un lote nuevo de 100 mg de bioperlas por ml de disolución durante 30 minutos (con agitación lenta). Una vez completado, se retiran las bioperlas y se almacenan los proteoliposomas reconstituidos a 4°C hasta su utilización.
- Alternativamente, pueden introducirse proteínas tras la formación, por ejemplo utilizando el procedimiento conocido de tratamiento con detergente de una capa previamente formada 106 (o bicapa 106, 107) con la proteína diana.
- Para proteínas periféricas, proteínas que se ensamblan de manera espontánea en la capa 106 o bicapa 107 o glicolípidos, se lleva a cabo un simple flujo a través de la proteína/glicolípido a través de la matriz 100 e incubación. Se apreciará que la asociación de proteínas puede requerir la presencia de lípidos específicos en la capa de presentación (por ejemplo DOPS en el caso de protrombina) y también puede requerir la presencia de iones de calcio en el medio de contacto, por ejemplo anexina.
- Tal como se explicará con más detalle a continuación, utilizando FLCS, puede localizarse de manera fiable una proteína o lípido marcado de manera fluorescente mediante exploración a través del eje Z e identificación de la posición de máxima intensidad.
- También puede utilizarse una matriz formada con referencia a las figuras 1A y 1B como parte de una plataforma microfluídica. Por ejemplo, la matriz 100 puede ensamblarse en un dispositivo de flujo a través que permite la retención de agua sobre la superficie del sustrato 104 y permite la introducción de reactivos en la capa lipídica 106 (o bicapa 106, 107), que puede dejarse reposar durante un periodo de residencia en contacto con la bicapa lipídica antes de la eliminación mediante lavado de materiales.
- Un ejemplo de una plataforma 200 microfluídica de este tipo se ilustra en la figura 2A y se construye formando inicialmente un molde de una matriz 100, según las enseñanzas de las figuras 1A y 1B. Puede fabricarse un orificio de entrada y de salida (no mostrado explícitamente), para permitir el flujo de líquido, incorporado en el sustrato de PDMS 100 mediante moldeo durante la formación de la matriz 100 porosa. La entrada y salida pueden formarse mediante punción de orificios en el sustrato de PDMS. Después se une el sustrato de PDMS modificado, con respecto al mostrado en la figura 1, a un soporte 201 sólido, normalmente un cubreobjetos de microscopio. Esto completa entonces la fabricación de la plataforma. Después se introducen vesículas lipídicas que contienen un colorante (para experimentos ópticos) con o sin proteína utilizando la entrada sobre las cavidades formadas. Los expertos en la materia apreciarán que también puede introducirse un fármaco, lectina o ligando en la bicapa o proteobicapa a través de la entrada microfluídica.
- La salida requiere ya que la disolución que fluye sobre la bicapa lipídica desborde el pequeño volumen de muestra. Utilizando la salida, también es posible comparar la concentración de una especie dada introducida

sobre la bicapa (por ejemplo, un fármaco) en el volumen introducido con lo que sale por la salida, como medida de unión de la especie a la bicapa. Se apreciará que, por ejemplo utilizando HPLC, puede determinarse la concentración de material, por ejemplo fármaco, introducido en la bicapa, por ejemplo tras un tiempo de residencia dado, en comparación con la concentración que se elimina mediante lavado. Tal análisis permite la determinación de la concentración retenida o repartida en la bicapa.

Después se inyectaron las vesículas de DOPC que contienen el colorante con o sin proteína reconstituida en la cámara microfluidica para obtener las bicapas lipídicas de extensión libre.

La influencia de agentes externos, por ejemplo fármacos, tampón, iones, otras proteínas, etc., puede examinarse haciendo fluir estos reactivos a través de la superficie de contacto de bicapa lipídica utilizando la plataforma 200 microfluidica.

La figura 2B muestra una variante de la disposición ilustrada con referencia a la figura 2A. En esta configuración, se moldea un pocillo 202 en la cara delantera del PDMS. Al proporcionar el pocillo 202, es posible proporcionar un canal de fluido conectado con la entrada 203 y la salida 204 y permite un flujo de materiales, por ejemplo fármacos/proteínas/lectinas, sobre la superficie de la bicapa lipídica de la matriz 100. Aunque no se observa en la figura 2B, se construye una matriz (tal como la matriz 100 de la figura 1) dentro del canal formado por el pocillo 202.

Se apreciará que la referencia a PDMS en el esquema es a modo de ejemplo del tipo de material de sustrato que puede utilizarse y no se pretende que limite las presentes enseñanzas a PDMS ya que pueden utilizarse otros materiales tales como PMMA para el cuerpo de la matriz. En otra configuración puede utilizarse PDMS u oro en la superficie de matriz. En utilización, se presentará y se dispondrá un objetivo de microscopio en la superficie de contacto de portaobjetos de vidrio. Además, la entrada 203 puede actuar como salida y la salida 204 puede actuar como entrada. Los expertos en la materia apreciarán que cualquier configuración que permite que el fluido introducido entre en contacto con la matriz, específicamente la bicapa lipídica, en el pocillo 202 es suficiente.

La presencia de una capa lipídica 106 (o bicapa 106, 107) que se extiende sobre las cavidades 103 previamente rellenas puede confirmarse mediante microscopía confocal utilizando un fluoróforo. Pueden evaluarse cavidades 103 fabricadas a partir de esferas de poliestireno con diferentes diámetros para determinar la extensión de lípidos tras rellenar previamente las cavidades con un tampón (por ejemplo, disolución 105 acuosa) y formar la capa 106 (o bicapa 106, 107) tal como se describió anteriormente.

La figura 3 presenta imágenes confocales de una bicapa de DOPC dopada de manera fluorescente 106, 107 extendida sobre las cavidades 103 rellenas. Se utilizan cavidades 103 de tamaños de 620 nm (imágenes a y b), 1 μm (imágenes c y d), 3 μm (e y f) y 5 μm (g y h). Las bicapas 106, 107 contenían DOPE-carboxifluoresceína al 1% en moles como fluoróforo. La longitud de onda de excitación fue de 488 nm. Las imágenes de fluorescencia (b, d, f y h) se recogieron utilizando un filtro de paso largo de 505 nm, por encima de 505 nm y se recogieron imágenes de reflectancia (a, c, e y g) utilizando un paso largo de 420 nm por debajo de 505 nm. Se recogieron imágenes tanto de fluorescencia como de reflectancia simultáneamente utilizando dos canales diferentes.

Una ventaja que puede aprovecharse, debido a la naturaleza esférica de la matriz porosa en la evaluación del relleno con fluido de las matrices 100, es la diferencia de índice de refracción entre PDMS ($n \approx 1,45$) y el tampón ($n \approx 1,33$). Esto provoca que la luz láser incidente se disperse en las posiciones de las cavidades rellenas y tiene el efecto de hacer que las cavidades 103 rellenas parezcan significativamente más brillantes que las no rellenas o el PDMS plano. Esto se muestra en las imágenes de reflexión para las matrices con cavidades mostradas en la figura 3 (a, c, e y g).

A partir de las imágenes de la figura 3 resulta evidente que no todas las cavidades 103 se rellenaron con tampón con la sonicación. Sin embargo, se observó que la bicapa lipídica 106, 107 se extendía sobre las cavidades 103 sin rellenar en el sustrato 104 en el que el diámetro de cavidad era de menos de 1 μm . Esto se confirma a partir de la fluorescencia homogénea obtenida en las imágenes de fluorescencia b y d respectivamente, en las que la imagen de reflectancia demuestra que varias de las cavidades 103 no están rellenas. En cambio, para las cavidades más grandes, es decir aquellas fabricadas a partir de esferas de 3 μm y 5 μm (imágenes f y h respectivamente de la figura 3), se observó que la bicapa 106, 107 se extendía exclusivamente sobre las cavidades 103 rellenas con tampón. Cuando las cavidades 103 de estas dimensiones no se rellenaban previamente con un tampón (por ejemplo, disolución 105 acuosa) se observó que el lípido recubría la superficie interior de la cavidad 103. Este resultado destaca la importancia de la presentación de una superficie de contacto acuosa por ejemplo, disolución 105 acuosa, a través de las cavidades que presentan diámetros de abertura que superan aproximadamente 1 μm .

A partir de la inspección de la figura 3 resultará evidente que la superficie de contacto hidrófila (proporcionada por la utilización de la disolución 105 en las cavidades 103), a través de la cual se ensambla la monocapa de Langmuir-Blodgett, se requiere para la formación de una bicapa 106, 107 de extensión sobre las cavidades 103

de mayor diámetro. Además, la técnica de Langmuir-Blodgett puede formar monocapas homogéneas sobre pequeños defectos (por ejemplo, cavidades 103 de menor diámetro), mientras que para las cavidades no rellenas de mayor diámetro la película de LB formada será discontinua y las vesículas inyectadas forman en vez de eso una bicapa en las paredes interiores de la cavidad 103.

Con el fin de evaluar la estabilidad de las capas de extensión resultantes, se realizó FCS y obtención de imágenes por fluorescencia confocal con las bicapas 106, 107 soportadas a lo largo de todos los tamaños de cavidad 103 a lo largo de un periodo de múltiples días. Las imágenes resultantes mostraron que las bicapas lipídicas 106, 107 formadas sobre las cavidades 103 rellenas utilizando el método de LB/fusión de vesículas eran estables durante un periodo de entre 4-5 días y que el coeficiente de difusión de lípidos permanecía estable durante este periodo. Se observa que esta estabilidad prolongada, que habitualmente es un problema con membranas lipídicas negras o con poros que no se rellenan con fluido o los que presentan más de 1 micrómetro de diámetro con otras formas, se alivia en el presente sistema atribuido a la presencia del depósito acuoso ofrecido por las cavidades 103 rellenas y también a la forma de tapa esférica específica de estos pocillos.

Ahora se facilitan ejemplos de la aplicación de la matriz 100 de las presentes enseñanzas en el estudio de (i) la fluidez de las bicapas lipídicas de extensión y (ii) reconstitución de proteínas de membrana en las bicapas lipídicas de extensión sobre la cavidad.

(i) Fluidez de bicapas lipídicas soportadas por cavidad.

Se estudiaron los coeficientes de difusión lateral de una bicapa de DOPC en las matrices 100 para establecer la fluidez de una bicapa lipídica de extensión 106, 107. Aunque se describe el siguiente ejemplo con referencia a las bicapas 106, 107, también puede utilizarse una única capa lipídica, por ejemplo, la capa 106.

Se comparó el coeficiente de difusión de lípidos ensamblados sobre las cavidades 103 y en regiones planas sobre el sustrato de PDMS 104. Para ello, se empleó espectroscopía de correlación de vida útil de fluorescencia (FLCS) y/o espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS) para estudiar bicapas extendidas de una manera similar a la descrita con referencia a la figura 3, con la excepción de que para FLCS las bicapas se marcaron con un colorante DOPE-Atto-655 a una concentración de 1 nM, que es aproximadamente equivalente a una razón de 1:100.000 de colorante:lípido. Se requiere la concentración de colorante menor para experimentos de FLCS. Para localizar con precisión la bicapa 106, 107 y las bicapas 106, 107 que se extienden sobre la cavidad 103 en el experimento de FLCS, se registraron imágenes de vida útil tanto de reflectancia como de fluorescencia (FLIM).

La figura 4 muestra imágenes de FLIM de (a) reflectancia y (b) fluorescencia obtenidas para lípido que se extiende sobre cavidades fabricadas utilizando esferas de 3 μm . El fluoróforo utilizado es el ATTO 655-DOPE anteriormente mencionado a una concentración de 1 nM y el tamaño de imagen es de 80 x 80 μm .

Tal como puede observarse a partir de las imágenes (a) y (b) de la figura 4, las imágenes de reflectancia fueron guías eficaces para localizar bicapas que se extienden sobre cavidades rellenas sobre cavidades de 3 μm . Se registraron medidas de FLCS sobre cavidades así como superficies de PDMS planas para obtener las funciones de autocorrelación para cada superficie. Estas curvas se muestran en la figura 5 tal como se describirá con más detalle a continuación. Se ajustaron las curvas de autocorrelación obtenidas al modelo bidimensional descrito en la ecuación 1 para obtener el coeficiente de difusión lateral de los lípidos en la bicapa.

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left[1 + \left(\frac{\tau}{\tau_i} \right)^\alpha \right]^{-1} \quad (1)$$

donde, $G(\tau)$ es la función de autocorrelación, N es el número promedio de moléculas fluorescentes presentes en el volumen confocal, τ_i es el tiempo de residencia característico, y α es el parámetro anómalo que refleja el grado de desviación de difusión con respecto al movimiento normal o browniano donde $\alpha = 1$, i es el índice de los componentes. El coeficiente de difusión lateral, D_L , puede obtenerse como $D_L = \omega^2/4\tau_i$. En esta ecuación, ω es el radio del haz de láser utilizado. Para determinar ω para cada excitación, se utilizó una disolución de referencia de colorante libre para la que se conoce el coeficiente de difusión. Para la excitación a 640 nm, el colorante de referencia era Atto-655 en agua a 25°C y su coeficiente de difusión es 426 $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$.

La figura 5 muestra las curvas de autocorrelación normalizadas medidas sobre una cavidad que se extiende sobre 3 μm (símbolos circulares negros) y sobre las regiones planas de la bicapa soportada (símbolos rectangulares). Estas se calculan a partir de mediciones adquiridas con un láser de 640 nm. El fluoróforo observado en este caso es ATTO 655-DOPE a concentraciones de 1 nM. Las líneas continuas que pasan sobre los puntos representan los ajustes utilizando la ecuación (1).

A partir de FLCS, se encontró que el coeficiente de difusión obtenido para la bicapa lipídica soportada sobre la región plana del PDMS hidrófilo era de $4,1 \pm 0,6 \mu\text{m}^2/\text{s}$ con un valor de α aproximadamente igual a 1, es decir = $0,997 \pm 0,002$. Se encontró que el coeficiente de difusión de lípidos sobre regiones planas del PDMS era autoconsistente a lo largo de múltiples sitios a lo largo de múltiples muestras de diferentes tamaños de cavidad. El valor refleja la alta hidrofilia del sustrato tratado con plasma.

En cambio, se determinó que los valores del coeficiente de difusión medidos para la bicapa que se extendía a través de cavidades rellenas con disolución acuosa de $3 \mu\text{m}$ de diámetro 103 eran de $10,2 \pm 0,6 \mu\text{m}^2/\text{s}$ con un valor de α de $0,989 \pm 0,004$. Además, se determinó que los coeficientes de difusión de la bicapa 106, 107 que se extiende sobre las cavidades fabricadas a partir de esferas de $5 \mu\text{m}$ eran de $D = 11,2 \pm 0,4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ con α de $0,992 \pm 0,002$. Es decir, dentro del error experimental, eran iguales. Sin embargo, de manera interesante, se observó que los valores de coeficiente de difusión obtenidos para bicapas lipídicas que se extendían sobre cavidades fabricadas a partir de esferas de $1 \mu\text{m}$ eran inferiores a los observados para muestras de $3 \mu\text{m}$ y $5 \mu\text{m}$ con $D = 7,1 \pm 0,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ con α de $1,012 \pm 0,004$. Esta diferencia del coeficiente de difusión está posiblemente relacionada con una variación en la curvatura de la bicapa lipídica 106, 107 por encima de una cavidad 103, que variará con las dimensiones de la cavidad, provocando un aumento de la difusión. Sin embargo, esta curvatura es más prominente en las cavidades de mayor diámetro, es decir de $3 \mu\text{m}$ y $5 \mu\text{m}$, y disminuye para las cavidades de menor tamaño ($1 \mu\text{m}$), conduciendo a una disminución de los coeficientes de difusión. No obstante, el punto clave es que se observan valores de coeficiente de difusión claramente superiores para las bicapas 106, 107 que se extienden sobre la cavidad 103 que sobre las regiones planas (al menos el doble). Otra explicación para este fenómeno es que hay una mayor contribución de lípidos que han difundido sobre la región plana de la matriz que contribuyen al coeficiente de difusión medido y estos lípidos se mueven más lentamente al haberse retardado en la superficie plana -es una ventaja clave de utilizar poros más grandes el hecho de que tales lípidos no contribuyen.

La alta movilidad/difusión lateral de lípidos en las matrices 100 se atribuye al entorno acuoso subyacente proporcionado por las cavidades 103 rellenas con tampón (por ejemplo, disolución 105) que separan eficazmente la bicapa lipídica del sustrato subyacente permitiendo que se mueva libremente en 2 dimensiones. El estrecho parecido del valor de difusión de la bicapa 106, 107 que se extiende sobre la cavidad y el observado para GUV conocidas indica que los lípidos que se extienden sobre una cavidad 103 se comportan como vesículas independientes debido al depósito acuoso formado por la cavidad 103 debajo de la valva interna de la bicapa de extensión. Dado que la profundidad de la cavidad es más que la mitad del diámetro de la cavidad, por ejemplo $1,5 \mu\text{m}$ para el poro de $3 \mu\text{m}$, la cavidad es lo suficientemente profunda incluso para los tamaños de cavidad más pequeños como para que haya pocas probabilidades de que la proteína o el lípido sobre el poro interactúen con el sustrato subyacente. La estructura de microcavidad presenta regiones tanto planas como de cavidad en un único experimento, de modo que puede compararse la difusión de lípidos tanto soportada por sólido como soportada por depósito, siendo las regiones planas las regiones entre las cavidades 103 sobre la superficie del sustrato 104.

(ii) Reconstitución de proteínas de membrana en las bicapas de extensión.

Motivados por la fluidez de las bicapas suspendidas y la evidente separación del lípido con respecto al sustrato sobre las cavidades, los inventores de la presente solicitud también investigaron la posibilidad de reconstituir proteínas de membrana en las bicapas lipídicas 106, 107 que se extienden sobre la cavidad. De nuevo, aunque se describen bicapas lipídicas, también puede utilizarse sólo una única capa lipídica 106.

Para la investigación, se utilizaron la proteína glicoforina A (GpA) humana y anexina V como proteínas modelo. GpA es una de las proteínas de membrana mejor caracterizadas y se proporciona como ejemplo de proteína periférica. Se conoce que, *in vivo*, GpA se extiende a través de la membrana plasmática, con su extremo C-terminal en el lado citoplasmático de la membrana, una región hidrófoba penetra a través de la membrana, y su extremo N-terminal, que está glicosilado, está expuesto al exterior de la membrana. Se marcó glicoforina A con 5-carboxitetrametilrodamina (TAMRA). Después se reconstituyó la glicoforina A marcada en vesículas. Se formaron las bicapas en las matrices con unas cavidades mediante fusión de las vesículas que contenían glicoforina A marcada sobre monocapas de DOPC formadas sobre sustratos con cavidades de $3 \mu\text{m}$ utilizando deposición de LB.

Puede reconstituirse glicoforina A en las vesículas de una manera casi idéntica a la descrita anteriormente para la integrina, excepto porque no se requiere ningún detergente ni ninguna eliminación de detergente con bioperlas. Se purifican las vesículas mediante centrifugación.

La figura 6 muestra imágenes de FLIM de (a) reflectancia y (b) fluorescencia de la bicapa que contiene glicoforina que se extiende sobre una cavidad fabricada a partir de esferas de $3 \mu\text{m}$ de tamaño. En este caso, la glicoforina se marca con el fluoróforo TAMRA, la longitud de onda de excitación era de 532 nm .

Tal como se muestra en la figura 6, la imagen de fluorescencia confocal (b) de la bicapa lipídica soportada por cavidad resultante indica la formación de una película de bicapa lipídica homogénea. Dado que la única fuente de fluorescencia es la glicoforina A marcada con TAMRA, la imagen (b) indica que la glicoforina A se incorporó correctamente dentro de la bicapa. De manera que concuerda con su incorporación en la bicapa, se encontró que la glicoforina A era esencialmente inmóvil a lo largo de las regiones planas de las cavidades reflejadas en el fotoblanqueo en la curva de intensidad-tiempo en la figura 7b obtenida mediante mediciones de FLCS. Este resultado concuerda con lo que se esperaría en una bicapa lipídica soportada sobre un sustrato plano y se atribuye a la interacción de la cola citoplasmática de la proteína con el PDMS subyacente en las regiones planas de la matriz conduciendo a una pérdida de movilidad lateral. A la inversa, se encontró que GpA era móvil sobre las cavidades y se midió mediante FLCS que el coeficiente de difusión de GpA sobre la cavidad era de $7,1 \pm 0,6 \mu\text{m}^2/\text{s}$ con α de $0,992 \pm 0,005$, obtenido ajustando la curva de autocorrelación en la figura 7a utilizando la ecuación 1. Este valor se compara de manera notablemente buena con el coeficiente de difusión para GpA en un liposoma de DMPC independiente por encima de su temperatura de transición de fase ($D_{\text{GpA}} = (4 \pm 2) \times \mu\text{m}^2/\text{s}$ a 30°C) utilizando recuperación de fluorescencia tras el fotoblanqueo (FRAP). De manera que concuerda con los valores de difusión de lípidos sobre las cavidades, la estrecha correspondencia de la tasa de difusión para una proteína de membrana en la cavidad y en un liposoma es una buena evidencia de que la proteína experimenta poca o ninguna interacción de fricción con la superficie sobre una cavidad de extensión.

Para demostrar la extensión de un sistema proporcionado según las presentes enseñanzas a múltiples tipos de proteína, también se estudió una proteína transmembrana, anexina V, utilizando la plataforma de la figura 1. La figura 8 (a) muestra una imagen de reflectancia del sustrato de PDMS 104 que permite la localización de cavidades rellenas con tampón. Esto permite la identificación de puntos en los que debe realizarse FLCS. La figura (b) muestra una imagen de anexina V marcada con Atto 647N en una bicapa lipídica (el 80% de DOPC, el 20% de DOPS) por encima de las cavidades mostradas en la figura 8(a). Se realizaron las mediciones de puntos de FLCS con la proteína marcada tanto en PDMS plano como sobre cavidades basándose en la reflectancia de la imagen (a). Tanto las imágenes (a) como (b) tienen $80 \times 80 \mu\text{m}$.

La figura 9(a) muestra una curva de autocorrelación normalizada medida por encima de una cavidad que se extiende sobre $3 \mu\text{m}$ (símbolos circulares). La figura 9(b) muestra una curva de intensidad-tiempo para la medición realizada sobre regiones planas en la bicapa lipídica soportada. En ambas mediciones, el fluoróforo observado es anexina V marcada con Atto647. Se realizaron las mediciones a lo largo de 200 s.

El coeficiente de difusión y la fracción móvil de anexina V en este sistema de bicapa lipídica amortiguada variaron dependiendo de las concentraciones y del tamaño de polímero. Por ejemplo: en un único sistema amortiguado de PEG 5000 al 0,5% en moles, se observó un coeficiente de difusión de $3,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ en el que el $24,6 \pm 1,7\%$ de las moléculas de anexina eran móviles. Utilizando un sistema con doble amortiguación de PEG 5000 al 0,5% en moles y BSA, se observó un coeficiente de difusión de $2,9 \pm 0,4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ en el que el $73,5 \pm 2,4\%$ de la anexina era móvil. Obsérvese particularmente el hecho de que un gran porcentaje de la proteína marcada era inmóvil, y por tanto los valores de difusión se obtuvieron a partir de la fracción móvil. Se observó la misma inmovilidad de proteína en PDMS plano en el que también se observó un grado significativo de blanqueo. Sin embargo, de manera crucial, la utilización de las microcavidades 103 en las presentes enseñanzas previene la interacción no específica entre proteína y el sustrato 104 subyacente. Sobre estas cavidades no se observa ningún blanqueo y la proteína anexina V se difunde libremente con un coeficiente de difusión próximo al del lípido.

Los resultados de las investigaciones descritas anteriormente con referencia a las figuras 3-8 demuestran claramente que una matriz 100 proporcionada según las presentes enseñanzas ofrece ventajas significativas para estudiar la movilidad tanto para lípidos como para proteínas transmembrana. Presentan la fluidez de un liposoma, debido a la separación eficaz de la valva interna de la capa 106 o la bicapa 106, 107 con respecto al sustrato 104 con la versatilidad y estabilidad de una capa lipídica 106 o bicapa 106, 107 soportada. Estas estructuras presentan varias aplicaciones clave en biofísica.

Aunque anteriormente sólo se han descrito con respecto a PDMS, las matrices también pueden prepararse de metal o bien mediante deposición electroquímica directa o mediante deposición en fase de vapor sobre las matrices de PDMS, o bien mediante deposición electroquímica directa/en fase de vapor alrededor de esferas de poliestireno.

Al utilizar matrices de metal pueden utilizarse mediciones electroquímicas así como otras mediciones espectroscópicas de fluorescencia (por ejemplo espectroscopía de correlación de vida útil de fluorescencia, espectroscopía de Raman). Los inventores han demostrado la voltametría y en particular la espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) de las matrices. Como ejemplo:

En primer lugar se modifica un electrodo con microcavidades de oro con 2-mercaptoetanol sumergiéndolo en una disolución 1 mM en etanol durante la noche tras lo cual se sonica en tampón Tris durante 30 minutos para rellenar previamente las cavidades (en el electrodo de oro o el sustrato). Después se deposita una

monocapa de DOPC sobre el electrodo con microcavidades utilizando una deposición de monocapa de Langmuir-Blodgett seguida por alteración de DOPC en esta monocapa para formar una bicapa.

5 Se realizan mediciones con un potencial de 0 V y un intervalo de frecuencia de 0,01 Hz a 100000 Hz con un electrodo convencional 3 configurado con un electrodo de referencia de Ag/AgCl. Todos los experimentos se realizan en tampón Tris NaCl con la célula contenida dentro de una jaula de Faraday.

10 La representación gráfica de la admitancia de la figura 10 muestra una clara disminución de la admitancia tras la formación de la bicapa de DOPC sobre la matriz con microcavidades de oro tratada con mercaptoetanol (electrodo). En la figura 10, se muestra una representación gráfica de la admitancia de electrodo de matriz con microcavidades de oro de 5 micrómetros de diámetro, tratado con mercaptoetanol, antes (curva superior) y después de la formación de la bicapa de DOPC (curva inferior). Se realizan mediciones en tampón Tris, utilizando un electrodo convencional 3 configurado a 0 V (frente a Ag/AgCl) utilizando un intervalo de frecuencia de 100000 Hz a 0,01 Hz.

15 La admitancia es directamente proporcional a la capacitancia (C), que entonces puede relacionarse con el grosor de la membrana en el electrodo con microcavidades utilizando la siguiente ecuación:

$$C = \epsilon \epsilon_0 \frac{A}{d}$$

20 donde ϵ es la constante dieléctrica de la membrana, ϵ_0 es la permitividad del vacío, A es el área del electrodo con microcavidades y d es el grosor de la membrana. Esta ecuación muestra que la capacitancia es inversamente proporcional al grosor de membrana. Por tanto, la disminución de la admitancia observada tras la formación de bicapa corresponde a un aumento del grosor de la membrana en el electrodo debido a la adición de la bicapa de DOPC sobre el electrodo con microcavidades tratado con mercaptoetanol.

25 La espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) es altamente sensible a cambios en la bicapa y esta sensibilidad puede potenciarse utilizando una sonda electroquímica tal como ferrocianuro en la disolución de contacto (es decir, disolución que entra en contacto con la superficie externa de la matriz) o en la aplicación de un gradiente iónico a través de la membrana aplicando un pH o fuerza iónica ligeramente diferentes en la disolución a cada lado de la membrana, por ejemplo, rellenando previamente las cavidades con una disolución con fuerza iónica diferente de la disolución de contacto que estará operativamente en contacto con la valva superior de la bicapa (es decir, alejada de la cavidad). Dentro de este contexto, la valva de membrana interna se refiere a la capa lipídica más cerca de las cavidades y la valva externa es la capa lipídica dirigida alejándose de las cavidades y operativamente en contacto con la disolución de contacto que se introduce en la entrada y sale de la salida de la plataforma microfluídica.

30 EIS en la matriz tiene aplicación en interacciones fármaco-membrana. La figura 11 es una representación gráfica de la admitancia que muestra el efecto de la introducción de ibuprofeno (4 mMol) a una bicapa de DOPC en matrices con cavidades de oro de 2,8 μm sobre la impedancia de espectroscopía de CA de la bicapa. El experimento se llevó a cabo en un tampón PBS a pH 7,4 a temperatura ambiente con cavidades rellenas con la misma disolución tampón. Se utiliza una plataforma microfluídica que presenta una entrada y salida (similar a la plataforma de la figura 2) para introducir el ibuprofeno en la bicapa.

35 La línea 111 de la figura 11 muestra la impedancia de las matrices sin las bicapas, la línea 112 muestra la impedancia con una bicapa de DOPC sola y las líneas restantes muestran el resultado de la exposición a ibuprofeno a 4 y después a 8 mMol a lo largo de diversos tiempos. Se utilizó ferrocianuro $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ como sonda redox, aunque no es necesario utilizarlo para provocar una respuesta analítica útil. La aplicación del ibuprofeno a través de la plataforma microfluídica da inicialmente como resultado una disminución seguida por un aumento sustancial de la capacitancia de la capa. Queda claro que la respuesta tarda varios minutos en alcanzar el equilibrio, momento en el cual el ibuprofeno provoca una disminución de la impedancia; atribuida a una alteración moderada de la estructura de bicapa (es decir, es más porosa).

40 De manera correspondiente, la exposición de la bicapa a ibuprofeno da como resultado aumentos del coeficiente de difusión de lípidos de la membrana desde aproximadamente 7 hasta aproximadamente 9,5 μms^{-1} reflejado en FLCS. La figura 12 (A) que proporciona una imagen de vida útil de fluorescencia de los poros de 2,8 μm de diámetro en PDMS tras la adición de ibuprofeno (4 mMol) a la bicapa de DOPC se llevó a cabo en tampón PBS a pH 7,4 a temperatura ambiente. La sonda es lípido DOPE marcado con BODIPY al 1% mol/mol. La figura 12(B) muestra la función de autocorrelación a partir de FLCS de estas mismas matrices reflejando los cambios en la dinámica de difusión del lípido con la introducción de ibuprofeno.

45 Según las presentes enseñanzas, se ha descrito un enfoque novedoso al diseño de unas capas (y bicapas) lipídicas de extensión libre. La capa lipídica 106 o la bicapa 106, 107 se fabrica sobre microcavidades rellenas con tampón acuoso en sustratos de polidimetoxisilano (PDMS) utilizando ensamblaje de monocapas de

Langmuir-Blodgett seguido por fusión con vesículas unilamelares pequeñas para formar una matriz. Además, la matriz 100 puede ensamblarse en una cámara microfluídica sencilla de manera que puede montarse directamente sobre una platina de microscopio. Utilizando espectroscopía de correlación de vida útil de fluorescencia (FLCS) puede demostrarse que la capa o bicapa lipídica suspendida sobre una cavidad es altamente fluida, mostrando coeficientes de difusión comparables a vesículas independientes en disolución.

Además, uno de los grandes retos sin resolver al trabajar con proteínas de membrana en bicapas lipídicas artificiales se supera en el sistema de las presentes enseñanzas. Específicamente, se logra la difusión sin impedimentos de la proteína en la capa soportada, es decir, la capa/bicapa lipídica. Como resultado de su entorno similar a una célula que presenta depósitos acuosos a ambos lados de la capa o bicapa lipídica, las proteínas de membrana incorporadas en la(s) capa(s) logran una movilidad lateral completa sin acoplamiento al sustrato subyacente. Esto se muestra a modo de ejemplo mediante el estudio resumido anteriormente de dos proteínas de membrana reconstituidas en la bicapa con diferentes dimensiones en sus dominios extracelulares y citoplasmáticos, glicoforina A y anexina V. En ambos casos, una vez sobre la cavidad, ambas proteínas mostraron una movilidad del 100%. También se ha demostrado para la proteína integrina $\alpha 11\beta 3$.

Una ventaja clave adicional de estas matrices es que no requieren la utilización de disolvente orgánico en la preparación de la capa/bicapa lipídica. Son estables y propensas a incorporación en un formato microfluídico. En conjunto, estas matrices abren oportunidades para estudiar proteínas transmembrana en entorno biomimético separado de la complejidad de la membrana celular al tiempo que presentan fluidez de tipo liposoma con una estabilidad y versatilidad mucho mayores.

Utilizando una matriz según las presentes enseñanzas, es posible investigar y analizar varias interacciones fármaco-membrana diferentes. Como ejemplo de la eficacia de este enfoque, a continuación se comentarán tres ejemplos:

(a) Monitorización mediante fluorescencia de la modulación de la dinámica de lípidos en la bicapa provocada por interacción fármaco-membrana utilizando una bicapa marcada de manera fluorescente en la matriz con cavidades.

Un estudio de ejemplo es la interacción de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) diclofenaco e ibuprofeno con modelos de membrana lipídica; la figura 13 demuestra funciones de autocorrelación (ACF) a partir de poros de PDMS de 2,8 μm de diámetro rellenos con PBS que soportan una bicapa lipídica de DOPC marcada con BODIPY-HPC marcado con DOPE al 1% mol/mol marcado sin y después tras incubación (15 min) de 4, 20, 100 y 200 μmol con la bicapa (B) con DOPE-ATTO655 marcado al 1% mol/mol marcado sin y después tras incubación (15 min) de 4, 20, 100 y 200 μmol de ibuprofeno (c) marcado con BODIPY-HPC marcado al 1% mol/mol marcado sin y después tras incubación (15 min) de 4, 100, 400 y 800 μmol de diclofenaco con la bicapa (B) bicapa marcada con DOPE-ATTO655 marcado al 1% mol/mol y después tras incubación de 4, 100, 400 y 800 μmol de diclofenaco. Las bicapas estaban en contacto con tampón PBS pH 7,4.

Esto muestra la influencia de los AINE a lo largo de varias concentraciones sobre la dinámica de difusión de bicapa lipídica marcada (DOPE-ATTO655 marcado al 1% mol/mol en bicapas de DOPC sobre cavidades). Se exploraron dos regímenes de marcaje; DOPE marcado con ATTO 655; que es una sonda hidrófila unida al grupo de cabeza de fosfolípido hidrófilo y reposa en la superficie de contacto acuosa externa de la bicapa y BODIPY-HPC; 2-(4,4-difluoro-5-metil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-dodecanoil)-1-hexadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina, es decir en el que el BODIPY lipófilo se une al extremo terminal del orientado hacia el interior de la bicapa. La monitorización de la difusión de cada sonda permitió la evaluación de la interacción del fármaco con la membrana y dónde se produjeron estas interacciones; es decir ¿se unió a la superficie de contacto o se intercaló en la bicapa? En la mayoría de los casos sólo se necesita una única sonda, sin embargo, dependiendo de la sofisticación del instrumento de FCS, pueden utilizarse dos marcadores en un único experimento de dos colores o pueden aplicarse en experimentos independientes para proporcionar información detallada sobre la ubicación del fármaco en la membrana.

Las ACF para diclofenaco e ibuprofeno respondieron de manera diferente con cada sonda. Mientras que el ibuprofeno tenía, dentro del error experimental, poco impacto sobre la difusión de la sonda BODIPY-HPC lipófila, ejerció un impacto significativo sobre la difusión de la sonda ATTO, el coeficiente de difusión aumentó desde $10,37 \pm 0,72 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ hasta $12,05 \pm 0,6 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ con la introducción de 100 μmol de ibuprofeno en la matriz lipídica.

De manera similar, el diclofenaco tuvo poco efecto sobre la difusión de la sonda BODIPY-HPC, sin embargo indujo grandes aumentos sistemáticos del coeficiente de difusión de DOPE marcado con Atto-655 que aumentó desde $11,71 \pm 0,82 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ hasta $43,5 \pm 8,13 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ con concentración creciente de diclofenaco desde 0 hasta una concentración de 800 μmol .

La falta de cambio significativo en la sonda orientada de manera interna y un gran cambio (particularmente para diclofenaco) en la difusión de las sondas hidrófilas sugiere que los fármacos no se intercalan fuertemente en el

interior de la membrana. En vez de eso, indica que ambos fármacos se unen en la superficie de contacto acuosa. El cambio muy grande del coeficiente de difusión de ATTO-DOPE indica que hay una fuerte interacción del fármaco con esta sonda que puede tirar de la sonda alejándola de la superficie de contacto lipídica. Tal comportamiento se ha observado anteriormente para bicapas modificadas con PEG y los resultados concuerdan con lo que se conoce sobre estos AINE, y las observaciones indicadas por Brandenburg *et al.*, (The membrane-activity of Ibuprofen, Diclofenac, and Naproxen: A physico-chemical study with lecithin fosfolipids Marcela Manrique Moreno, Patrick Garidel, Mario Suwalsky, Jörg Howe, Klaus Brandenburg, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1788, 2009, páginas 1296-1303) quienes mostraron, a partir de estudios de IR y calorimétricos de diclofenaco e ibuprofeno con liposomas, que se unen a la superficie de la membrana lipídica pero no se intercalan. Además, utilizando las matrices con espectroscopía de correlación de fluorescencia es posible, según las presentes enseñanzas, seguir la unión en equilibrio a las bicapas mediante monitorización para obtener información de unión cuantitativa.

(b) Utilizando matrices de oro puede utilizarse tanto fluorescencia como EIS para estudiar interacciones fármaco-membrana o EIS con matrices de oro sola es muy sensible a cambios estructurales en la bicapa inducidos por reparto de fármaco en, o asociación con, la capa y puede utilizarse para estudiar estos procesos de manera dinámica.

Impedancia electroquímica; en estudios paralelos a los estudios de difusión con AINE, la figura 14 muestra el impacto del mismo intervalo de concentración de fármaco sobre la impedancia de bicapa de DOPC (las bicapas estaban en contacto con tampón PBS pH 7,4 en ambos lados del poro). La interacción de ambos AINE dio como resultado una reducción de la resistencia de la bicapa. La magnitud del cambio a través de cada fármaco es considerablemente diferente con una disminución de aproximadamente el 6% ($\pm 2\%$) de la resistividad para ibuprofeno entre 0 y 400 μmol en comparación con una disminución del 65% ($\pm 4\%$) para diclofenaco. Estos resultados, particularmente en el contexto de la magnitud de la influencia del fármaco sobre la membrana, concuerdan con los de FLCS. La unión electrostática del fármaco a la membrana disminuye de manera reproducible la respuesta de impedancia en la bicapa. Las bicapas son estables frente a la introducción de varios volúmenes de tampón al final de un estudio y podían monitorizar la reversibilidad de la unión. Lavar la bicapa con 6 volúmenes de tampón libre de fármaco recuperó parcialmente la resistencia de la bicapa. Un experimento de control confirmó que tal lavado no influye sobre una bicapa que no se había tratado con fármaco.

Los resultados de EIS, en cuanto a la magnitud de respuesta y reproducibilidad, se mejoran adicionalmente modificando de manera selectiva únicamente la capa superior de la matriz de oro con un alcohol de cadena larga de empaquetamiento más compacto, por ejemplo mercaptohexanol, para garantizar que la única área electroquímicamente sensible es el poro. Este enfoque también simplifica el modelo de impedancia que se utiliza. Esto se ha demostrado en la investigación de galectinas en bicapas lipídicas de GM1 DOPC/Chol asimétricas y en bicapas de DOPC que contienen canales de iones (gramicidina y el antiportador nigericina).

Para comparación; se examinó un ejemplo del efecto de un fármaco de reparto fuerte, el antibiótico rifampicina. Estudios de EIS de la adición de este fármaco a lo largo de un intervalo de concentración de 0 a 100 μmol a la bicapa soportada sobre cavidad de oro descrita anteriormente demuestran disminuciones muy grandes de la resistencia de la película a partir de la señal de EIS, mostrada en la figura 15. El intervalo de concentración inferior refleja intervalos de concentración terapéuticos.

La magnitud mucho mayor de cambios de EIS para la bicapa lipídica ensamblada a través de matrices con cavidades rellenas con tampón en comparación con los AINE refleja el hecho de que este fármaco lipófilo se reparte en, y atraviesa, la bicapa, alterando así la estructura de la bicapa y reduciendo la resistencia de la película. De manera correspondiente, el coeficiente de difusión de la capa de DOPC marcada con DOPE-Atto655 aumentó drásticamente por la presencia de rifampicina. Además, el reparto fue esencialmente irreversible, con poca o ninguna recuperación de la impedancia tras lavar la película. En un experimento de control, lavar la capa de DOPC de la misma manera en ausencia de rifampicina no afecta significativamente a la impedancia.

Una matriz de sistema según las presentes enseñanzas también permite estudios dinámicos del efecto de fármaco sobre la bicapa en los que, en el ejemplo de rifampicina, se encontró que el fármaco tardaba aproximadamente 30 minutos en repartirse al interior de la capa y también reveló que el reparto era en gran medida irreversible, tal como se demuestra por la etapa de lavado en la figura 15. En el ejemplo de la figura 15, se llevó a cabo el estudio de estabilidad de rifampicina (10 μM) en presencia de luz. La resistencia de la bicapa disminuye a lo largo de un periodo de tiempo. La disminución de la resistencia se debe a que el fármaco cambia de forma a lo largo de un periodo. La figura 16 muestra un ejemplo de estudio de estabilidad de rifampicina (10 μM) en contacto con bicapa de DOPC y confirma que el fármaco se equilibra con la bicapa en menos de 30 minutos y después la respuesta es estable. A concentraciones inferiores de fármaco se obtuvo algo de recuperación de la respuesta de EIS con el lavado. La respuesta de EIS se volvió irreversible a altas concentraciones de fármaco ($>60 \mu\text{mol}$).

Además, tal como se muestra a modo de ejemplo con referencia a los datos en la figura 17, puede utilizarse una matriz según las presentes enseñanzas para seguir reacciones, por ejemplo estudios de estabilidad mientras se

reparte el fármaco en la bicapa.

En este ejemplo, se siguió la oxidación inducida por luz de rifampicina mientras estaba en una bicapa de DOPC y estos cambios de redox se reflejaron en la resistencia decreciente a lo largo del tiempo. En ausencia de luz, la señal de impedancia fue estable durante la noche.

c) Las matrices de oro pueden utilizarse para potenciar estudios espectroscópicos, particularmente estudios de Raman de interacciones sonda-bicapa y para detectar que un fármaco atraviesa al interior de la cavidad interior.

Un ejemplo de la aplicación de matrices proporcionadas según las presentes enseñanzas como modelo para moléculas transportadoras es la aplicación de ionóforos responsables de transportar pequeños iones a través de la membrana celular. Se apreciará que hay tres clasificaciones principales de ionóforos: uniportadores, que transportan un único ion a través de la membrana; antiportadores, que intercambian un ion por otro; y simportadores, que transportan dos iones diferentes a través de la membrana de manera simultánea.

Utilizando una matriz según las presentes enseñanzas, los presentes inventores han demostrado una aplicación para moléculas transportadoras con dos ionóforos: valinomicina y nigericina. La valinomicina es un ionóforo uniportador que se produce de manera natural, que se sabe que se incrusta de manera espontánea en bicapas lipídicas en las que transporta iones K⁺ a través de la membrana lipídica. La nigericina es un antibiótico derivado de *Streptomyces hygroscopicus*. Al igual que la valinomicina, se incorpora de manera espontánea en bicapas lipídicas y transporta iones K⁺ a través de la bicapa lipídica intercambiándolos por iones H⁺.

Se formaron electrodos con microcavidades de oro mediante el procedimiento descrito en la presente memoria utilizando electrodeposición de oro a través de una matriz con empaquetamiento compacto de esferas de poliestireno (2,88 micrómetros de diámetro) tras lo cual se retiraron las esferas mediante sonicación en THF durante 30 minutos. Después se modificó la matriz con microcavidades de oro con mercaptoetanol (ME) colocando el sustrato en una disolución 1 mM de ME, en etanol, durante 24 horas. Alternativamente, es posible modificar selectivamente la superficie superior con mercaptohexanol antes de la retirada de las esferas y dejar las cavidades libres de modificación de superficie tras la retirada de las esferas. Este último enfoque proporciona una reproducibilidad incluso mayor.

Tal como se muestra en la figura 18, para valinomicina; se rellenaron previamente las microcavidades con Tris KCl mediante sonicación durante 30 minutos antes del ensamblaje de la bicapa. Tras la sonicación se formó una bicapa de DOPC sobre las microcavidades utilizando una combinación de técnica de Langmuir-Blodgett y fusión de vesículas tal como se describió anteriormente.

Se midieron espectros de impedancia electroquímica (EIS) de esta bicapa colocando la matriz en contacto con Tris NaCl. Esto crea un gradiente de iones a través de la bicapa lipídica. La bicapa aísla eficazmente el poro frente a la disolución de contacto externa, pero una vez que se introduce valinomicina esto debe provocar que fluyan iones K⁺ desde el interior de las cavidades a la disolución a granel (véase el esquema en la figura 18). Se midió la impedancia de la bicapa de DOPC en presencia de este gradiente iónico. Después se introdujo valinomicina en la célula añadiendo 20 μM a partir de una disolución en etanol. Después volvió a medirse la impedancia de la bicapa y se observó una disminución de la resistencia (véanse los datos en la gráfica de la figura 18, que es una representación gráfica de EIS de las bicapas de DOPC antes, la línea a la izquierda más cerca del eje Y, y después, la línea a la derecha más cerca del eje X, de la incorporación de valinomicina demostrando la disminución de la resistencia observada tras la incorporación de la valinomicina). Aunque la impedancia absoluta varió de muestra a muestra, la magnitud del cambio que varía con la concentración de valinomicina fue reproducible. La disminución observada de la resistencia se debe al transporte de iones K⁺ a través de la bicapa lipídica por la valinomicina incorporada.

La figura 19 muestra datos similares relacionados con cambios de impedancia en bicapas de DOPC expuestas a nigericina. La nigericina es un antiportador de H⁺ y K⁺. En la presente memoria, se rellenaron previamente las cavidades con K⁺ 150 mM antes de la formación de la bicapa. Después se añadió tampón citrato (a pH 4) al electrolito para suministrar al sistema iones H⁺ (10 mMol) en el exterior de la bicapa. Se midió la impedancia de la bicapa de DOPC en presencia de este gradiente iónico. Después se introdujo nigericina en la célula añadiendo 20 μM del ionóforo a partir de una disolución en etanol (se llevó a cabo un experimento de control que reveló que la adición de etanol a la capa a este volumen tenía un efecto despreciable sobre la impedancia en ausencia de nigericina). Después volvió a medirse la impedancia de la bicapa y se observó una disminución de la resistencia. Esta disminución de la resistencia se debe al transporte de iones K⁺ y H⁺ a través de la bicapa lipídica por la nigericina incorporada.

La respuesta de la impedancia varió con el sustrato, pero la magnitud relativa de la disminución de la resistencia que dependía de la concentración de nigericina mostró una buena reproducibilidad (<± 5%). La magnitud de la respuesta global y la estabilidad de respuesta pueden mejorarse mediante modificación selectiva de la superficie superior con tio-alcohol o ácido de cadena larga.

Las cavidades de esfera truncada según las presentes enseñanzas también pueden utilizarse para la liberación controlada de un reactivo en un material inmovilizado en la bicapa lipídica. Este procedimiento puede utilizarse para la liberación controlada/sincronizada de una gama de reactivos de manera asimétrica a la bicapa o, por ejemplo, de agonistas proteicos frente a proteínas dentro de la bicapa y proporciona un procedimiento para abordar sitios de unión intercelulares y extracelulares en el mismo sistema.

Como ejemplo, se autoensambló mercaptoferroceno únicamente en la superficie de cavidad interior y se ensambló un alcohol tiolado de bloqueo (mercaptoetanol o mercaptohexanol) en la superficie superior de la matriz, mediante modificación de la superficie superior de la matriz antes de la liberación de la esfera de formación de molde y después adhiriendo el ferroceno tras la retirada de la esfera. El ferroceno se une de manera selectiva a beta-ciclodextrina modificada con estreptavidina (CD-estreptavidina) que se ensambla de manera previa al ensamblaje de la bicapa biotinilada de DOPC/DOPC. La aplicación de 0,5 V frente a Ag/AgCl da como resultado la oxidación del ferroceno, que en presencia de Na⁺ adquiere una carga positiva permanente, previniendo el nuevo ensamblaje de CD-estreptavidina. La CD-estreptavidina liberada difunde a la bicapa donde su estreptavidina colgante reconoce y se une a biotina.

Dicha electroliberación puede combinarse con EIS para permitir la detección de la interacción de agente liberado con la bicapa, y/o también puede combinarse con procedimientos espectroscópicos, tales como espectroscopía de Raman y de fluorescencia para una investigación adicional. Puede utilizarse para la liberación controlada/sincronizada de una gama de reactivos unidos de manera asimétrica a la bicapa, o, por ejemplo, de agonistas proteicos frente a proteínas dentro de la bicapa y proporciona un procedimiento para abordar sitios de unión intercelulares y extracelulares en el mismo sistema.

Además de la electroliberación para unirse a un lípido o proteína en la membrana, por ejemplo para analogía de señalización, si se emplea un agente apropiado puede utilizarse para instigar la eliminación sincronizada de reactivo a partir de la bicapa. Los presentes inventores han demostrado que la electroliberación de CD sin marcar a una bicapa que contiene colesterol da como resultado la eliminación de colesterol a partir de la bicapa, reflejado en una disminución de la resistencia de la película de bicapa. En principio, la cantidad de colesterol eliminado puede controlarse alterando la cantidad de CD en la cavidad mediante la utilización de una monocapa mixta.

Se apreciará que los datos experimentales anteriores muestran ejemplos de aplicaciones de un nanoporo microfluídico proporcionado según las presentes enseñanzas. Proporcionando una pluralidad de depresiones que presentan un diámetro mayor que 1 μm y que contienen una disolución, es posible proporcionar una capa lipídica que se extiende a través de la parte superior de la depresión que entonces puede utilizarse para imitar un límite celular. Una matriz de este tipo tiene aplicación en varios estudios de investigación de fármacos y otros estudios farmacéuticos y no se pretende que limite las presentes enseñanzas a ningún ejemplo específico excepto según se considere necesario a la luz de las reivindicaciones adjuntas.

Las expresiones comprende/que comprende, cuando se utilizan en esta memoria, son para especificar la presencia de características, números enteros, etapas o componentes mencionados, pero no excluir la presencia o adición de una o más de otras características, números enteros, etapas, componentes o grupos de los mismos.

REIVINDICACIONES

1. Matriz microfluídica que comprende:
 - 5 un sustrato polimérico hidrófilo o sustrato de metal que comprende una superficie plana con una pluralidad de depresiones esféricas individuales formadas en la misma, presentando cada una de las depresiones un diámetro en el intervalo mayor que 1 μm y hasta 5 μm y conteniendo una disolución acuosa;
 - 10 una capa lipídica que se extiende a través de la pluralidad de depresiones individuales; y
 - en la que cada una de entre la pluralidad de depresiones individuales comprende unas paredes laterales arqueadas que se extienden hacia abajo en el sustrato desde la superficie plana.
- 15 2. Matriz según la reivindicación 1, en la que cada una de las depresiones define una abertura a través de la cual se extiende la capa lipídica y en la que las depresiones sólo comprenden unas superficies arqueadas que definen una esfera truncada, presentando opcionalmente una geometría cuya altura con respecto al diámetro de abertura es mayor que uno.
- 20 3. Matriz según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la capa lipídica es una monocapa o es una bicapa.
4. Matriz según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende un soporte plano sobre el cual está montado el sustrato, siendo el soporte plano un cubreobjetos de microscopio y comprendiendo además la matriz una entrada y salida en unos extremos opuestos del sustrato, estando la entrada configurada para la introducción de vesículas lipídicas en la matriz.
- 25 5. Procedimiento para formar una matriz microfluídica que comprende:
 - 30 formar una pluralidad de depresiones individuales en una superficie plana de un sustrato polimérico hidrófilo o un sustrato de metal de manera que cada una de entre la pluralidad de depresiones individuales comprende unas paredes laterales arqueadas que se extienden hacia abajo en el sustrato desde la superficie plana y presentan un diámetro mayor que 1 μm y,
 - 35 rellenar las depresiones con una disolución acuosa; y
 - formar una capa lipídica que se extiende a través de la pluralidad de depresiones individuales.
- 40 6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que la capa lipídica es una primera capa lipídica y comprendiendo además el procedimiento la formación de una segunda capa lipídica sobre la primera capa lipídica.
- 45 7. Procedimiento según la reivindicación 5 o 6, que además comprende la utilización de la técnica de Langmuir-Blodgett (LB) o la técnica de LB Schaefer (LBS) para la formación de una capa lipídica.
- 50 8. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que la segunda capa lipídica está formada por fusión de liposomas sobre la primera capa.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que el sustrato está formado por polidimetilsiloxano (PDMS).
- 55 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en el que la formación de la pluralidad de depresiones individuales en la superficie plana de un sustrato comprende:
 - recubrir una matriz de esferas con PDMS;
 - 60 permitir que se cure el PDMS; y
 - desprender el PDMS de las esferas para revelar el sustrato de PDMS.
11. Procedimiento según la reivindicación 9 o 10, que además comprende hacer que el sustrato sea hidrófilo mediante un tratamiento con plasma a una presión de aire controlada.
- 65 12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, en el que las depresiones están rellenas con la disolución utilizando sonicación.
13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, que además comprende:
 - montar la matriz microfluídica sobre un soporte plano; y

formar una entrada y salida en unos extremos opuestos del sustrato de manera que la entrada esté configurada para la introducción de vesículas lipídicas en la matriz.

5 14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13, que además comprende rellenar las depresiones con proteoliposomas antes de formar la capa lipídica.

15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 14, que además comprende, tras la formación de la capa lipídica, la utilización de un tratamiento con detergente para introducir proteínas en la capa lipídica.

10

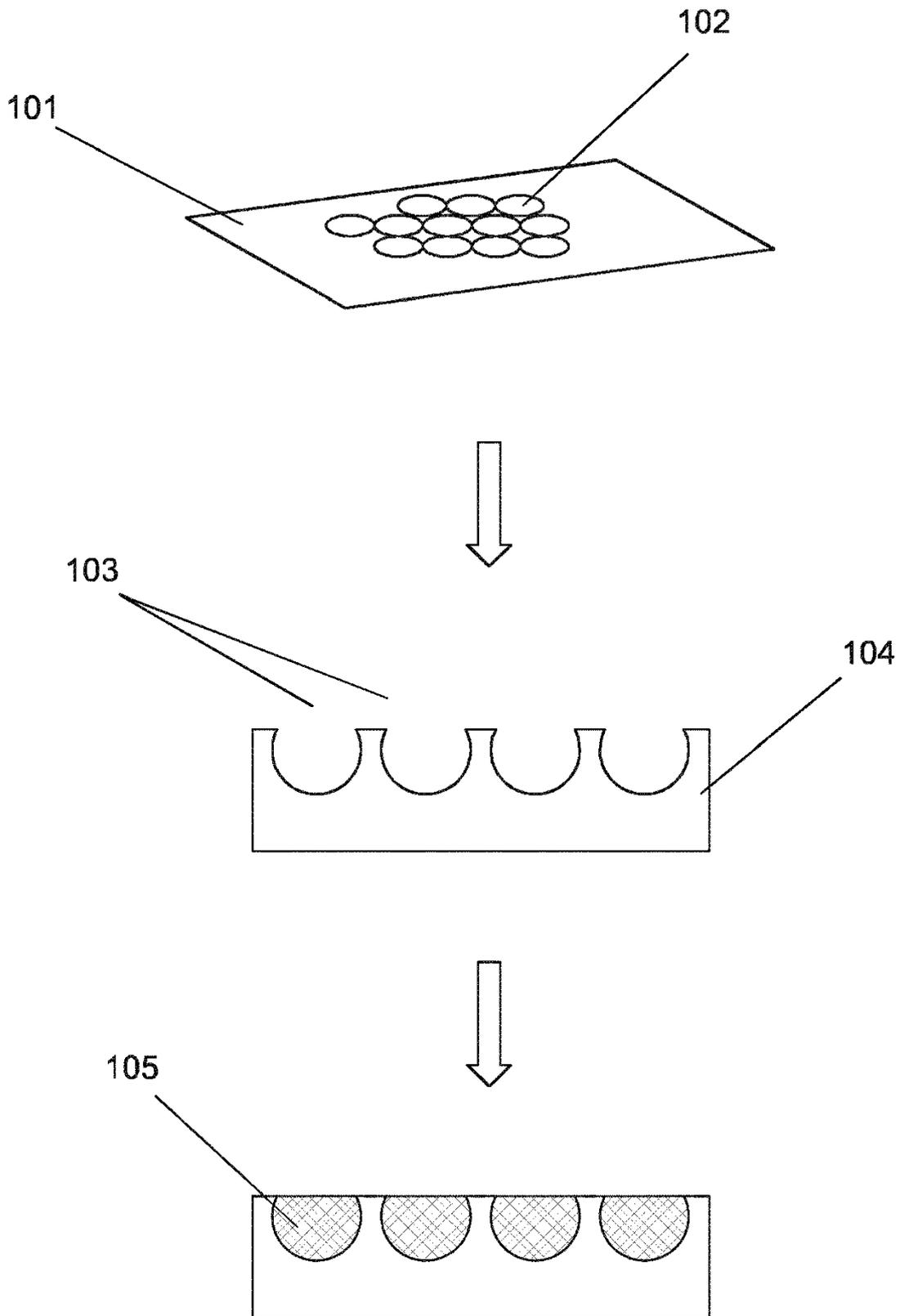


Figura 1A

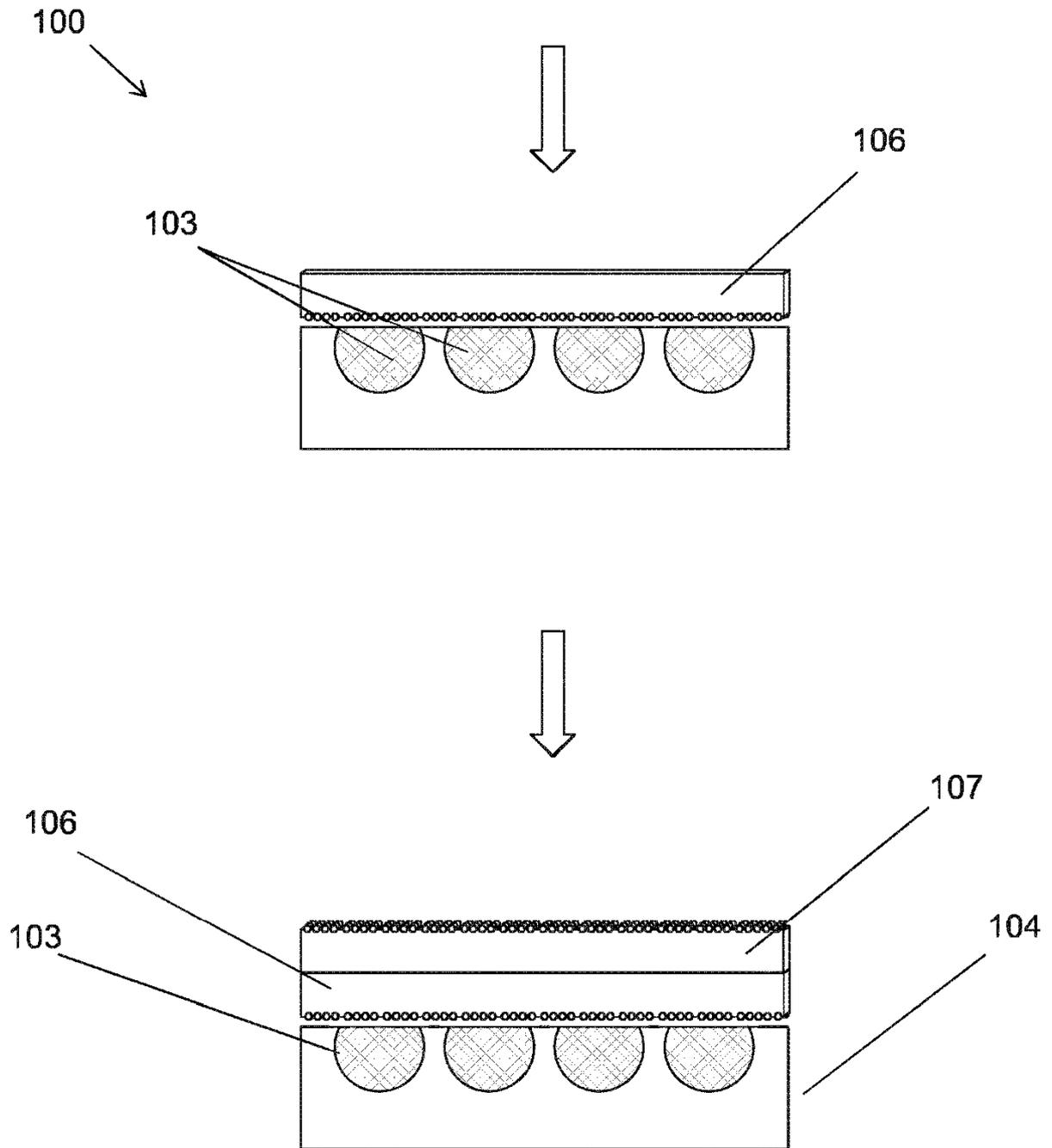


Figura 1B

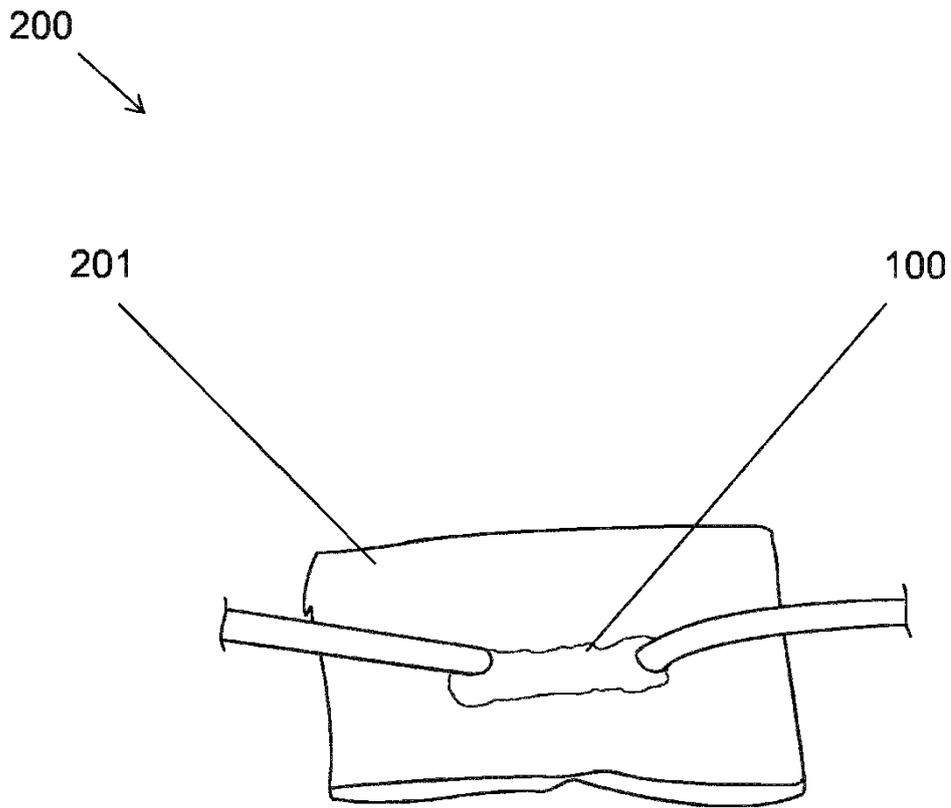


Figura 2A

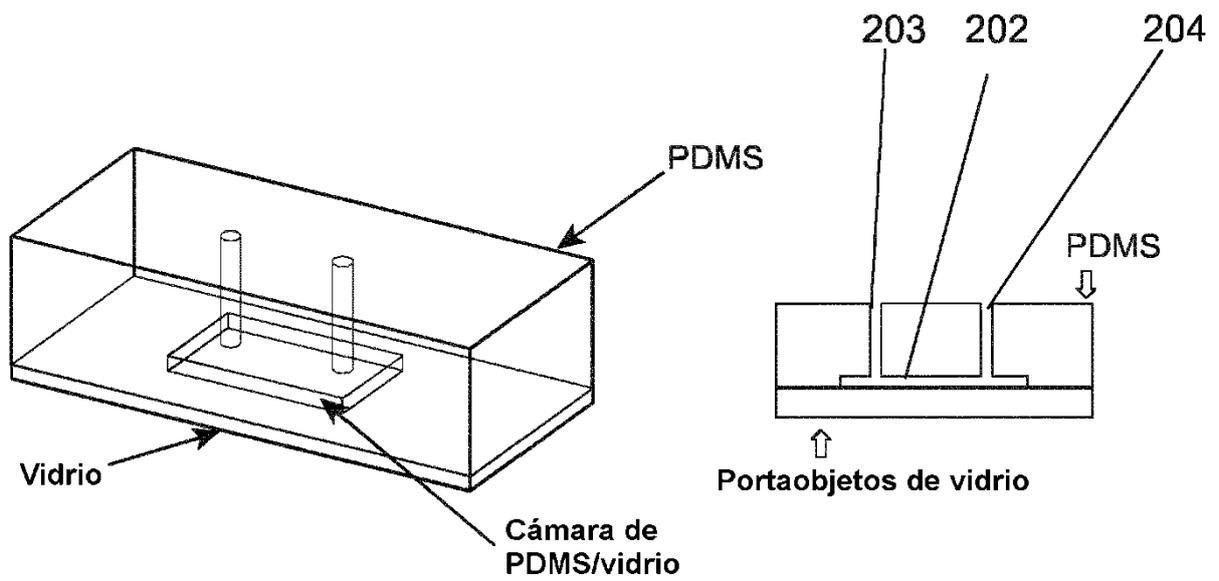


Figura 2B

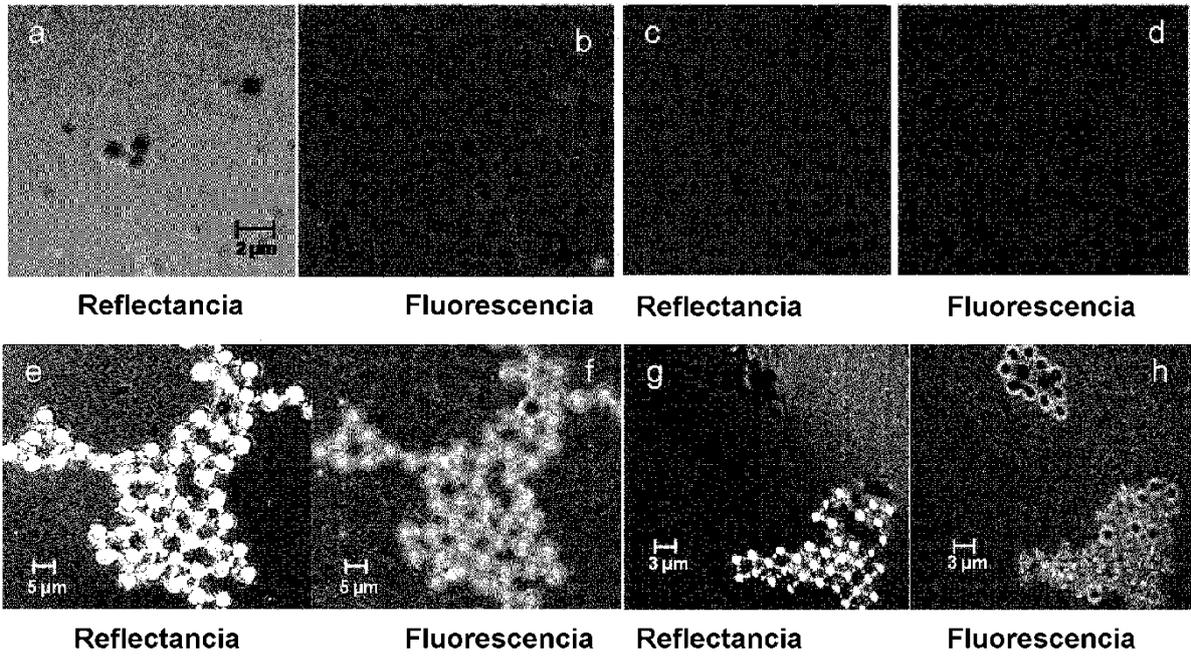


Figura 3

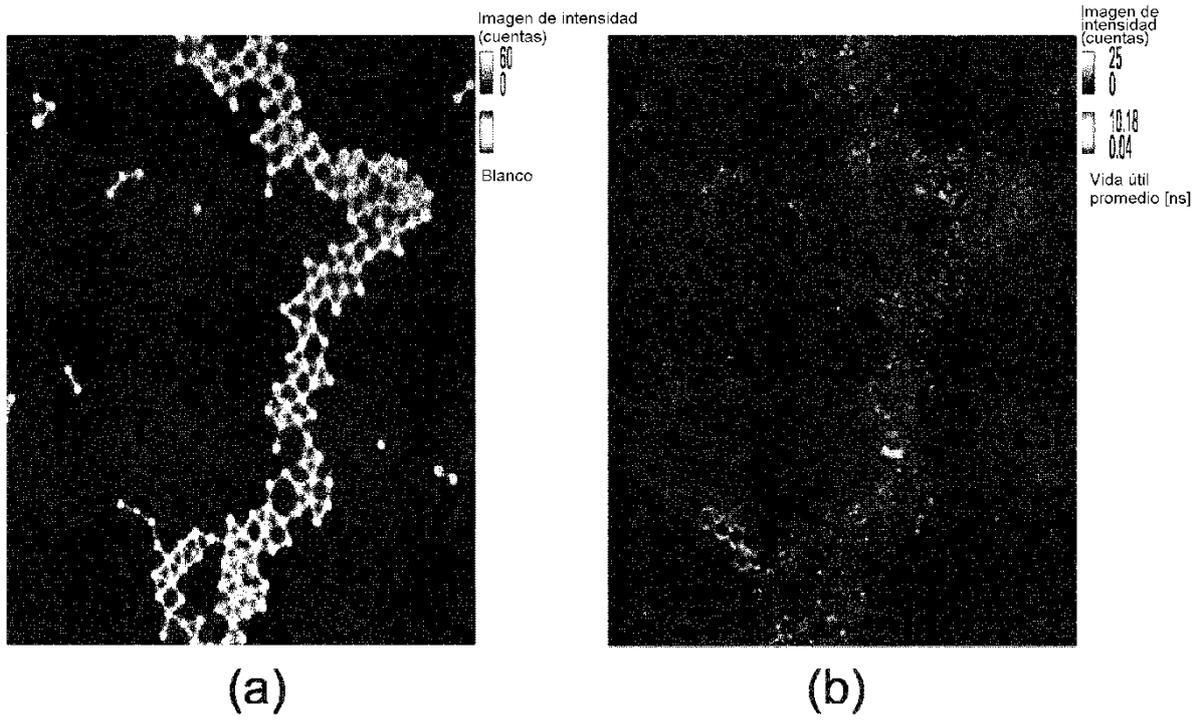


Figura 4

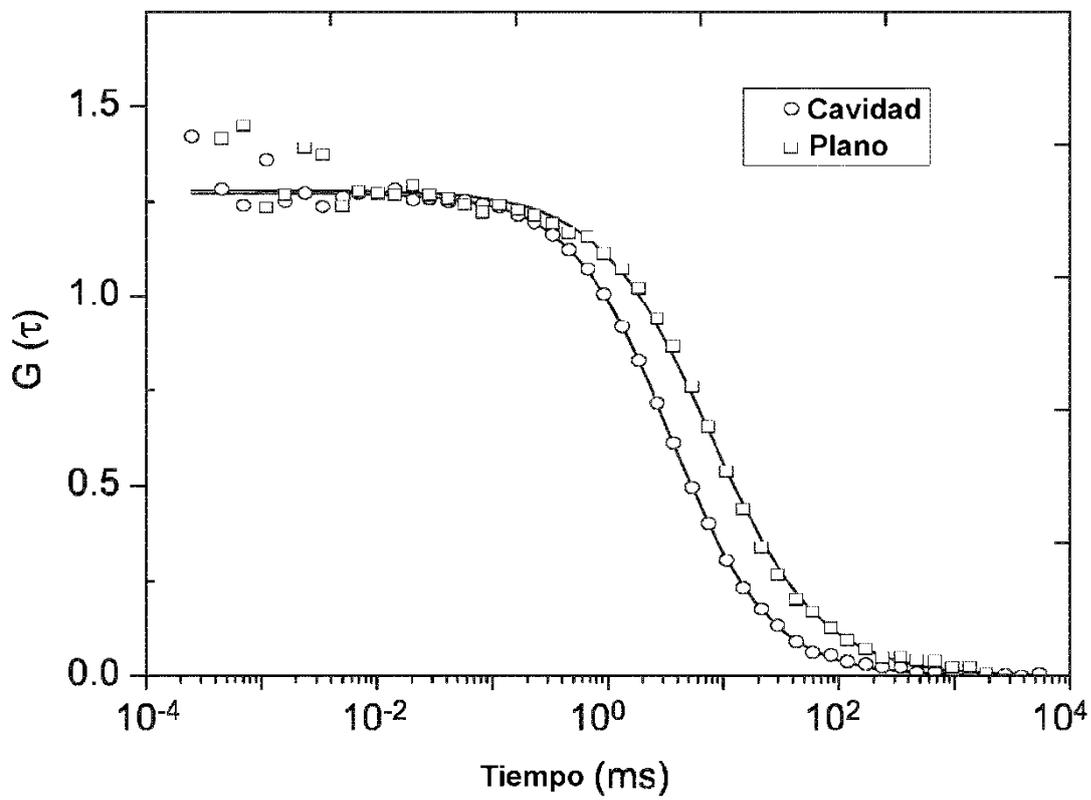


Figura 5

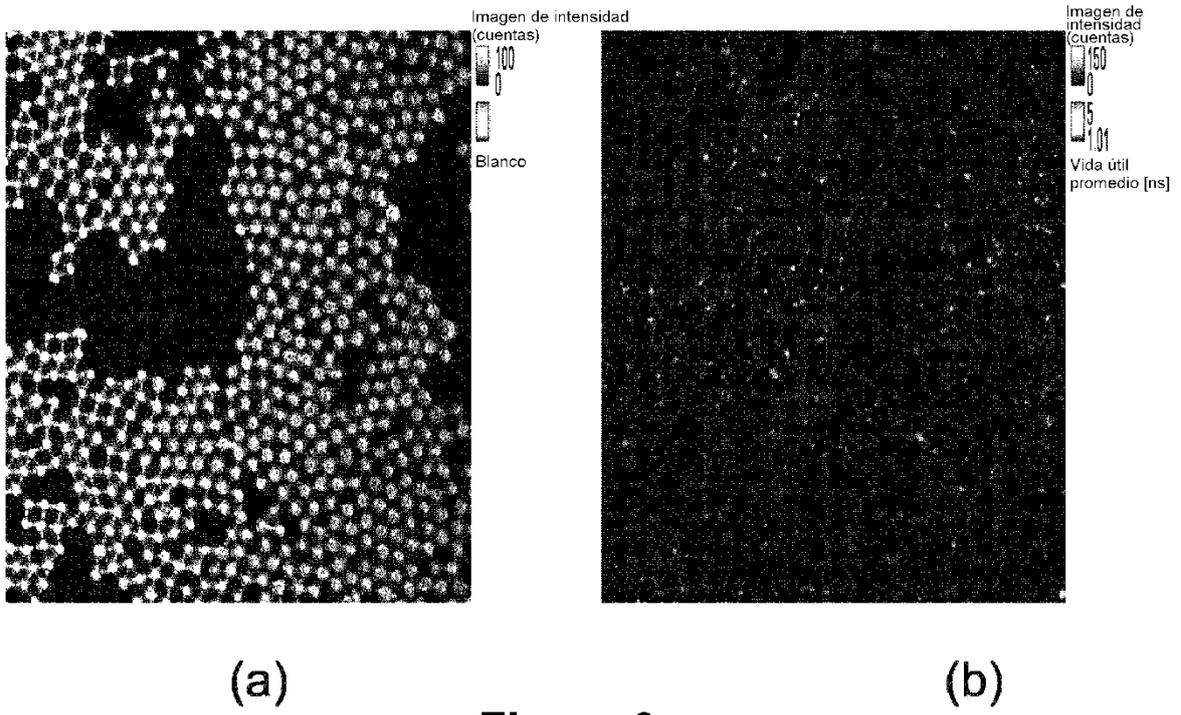


Figura 6

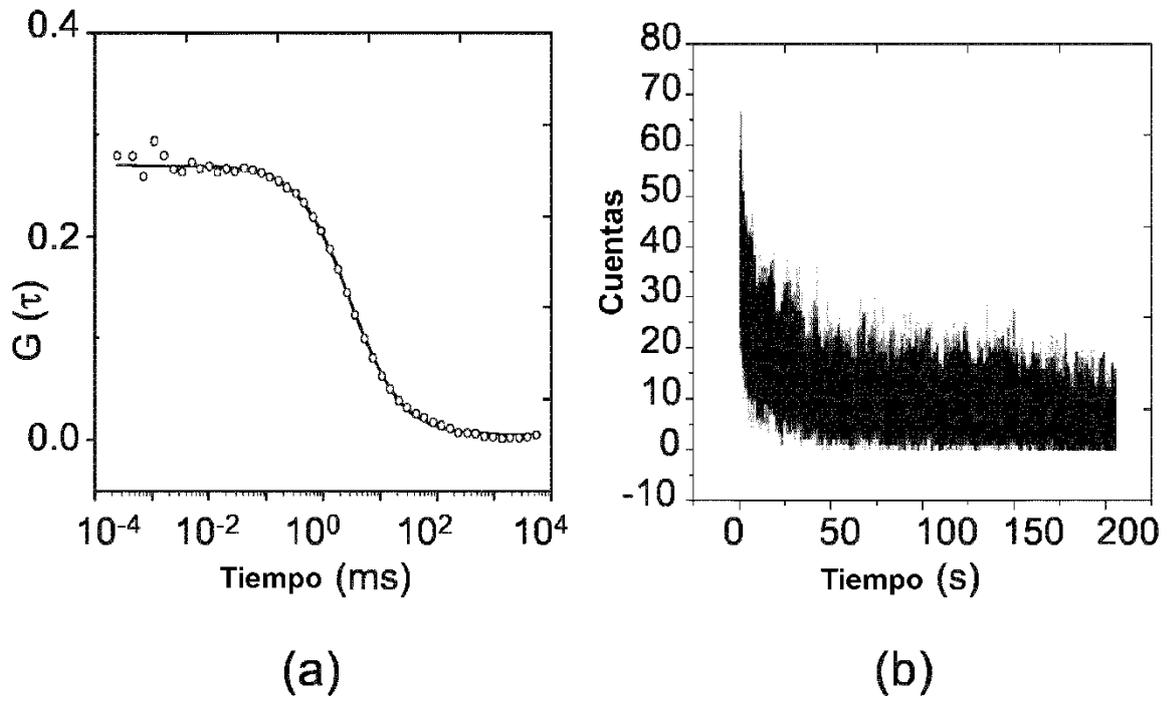
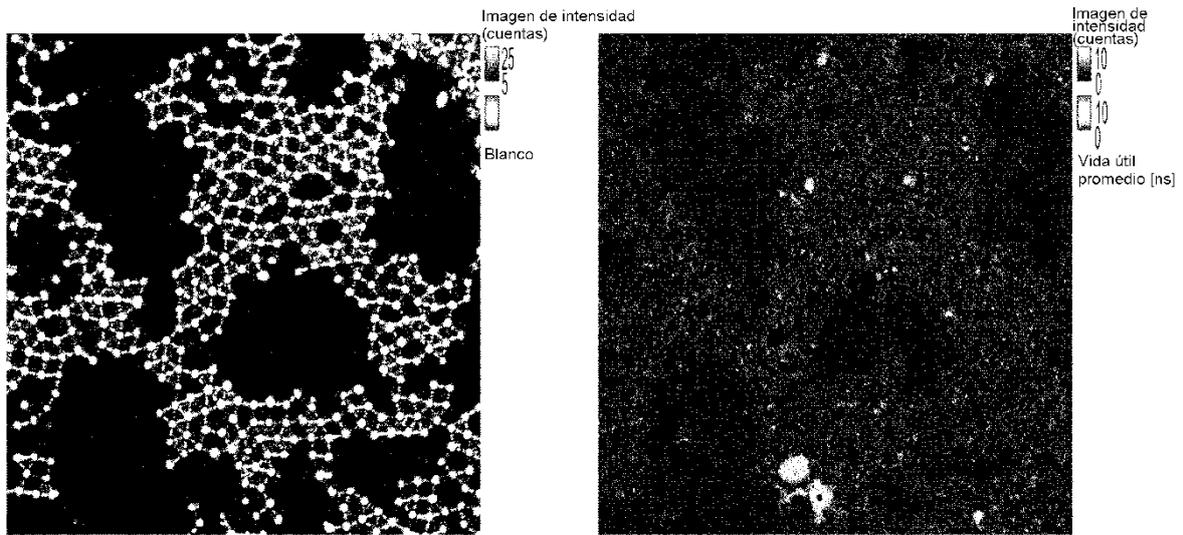


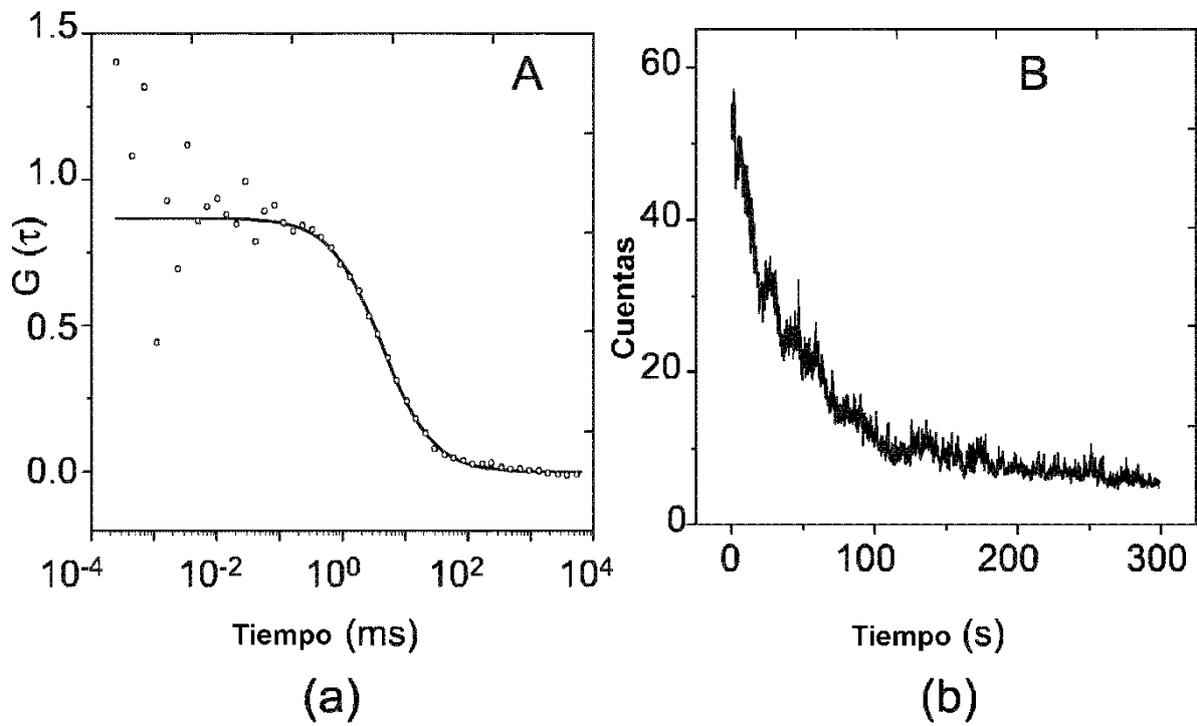
Figura 7



(a)

(b)

Figura 8



Tiempo (ms)

(a)

Tiempo (s)

(b)

Figura 9

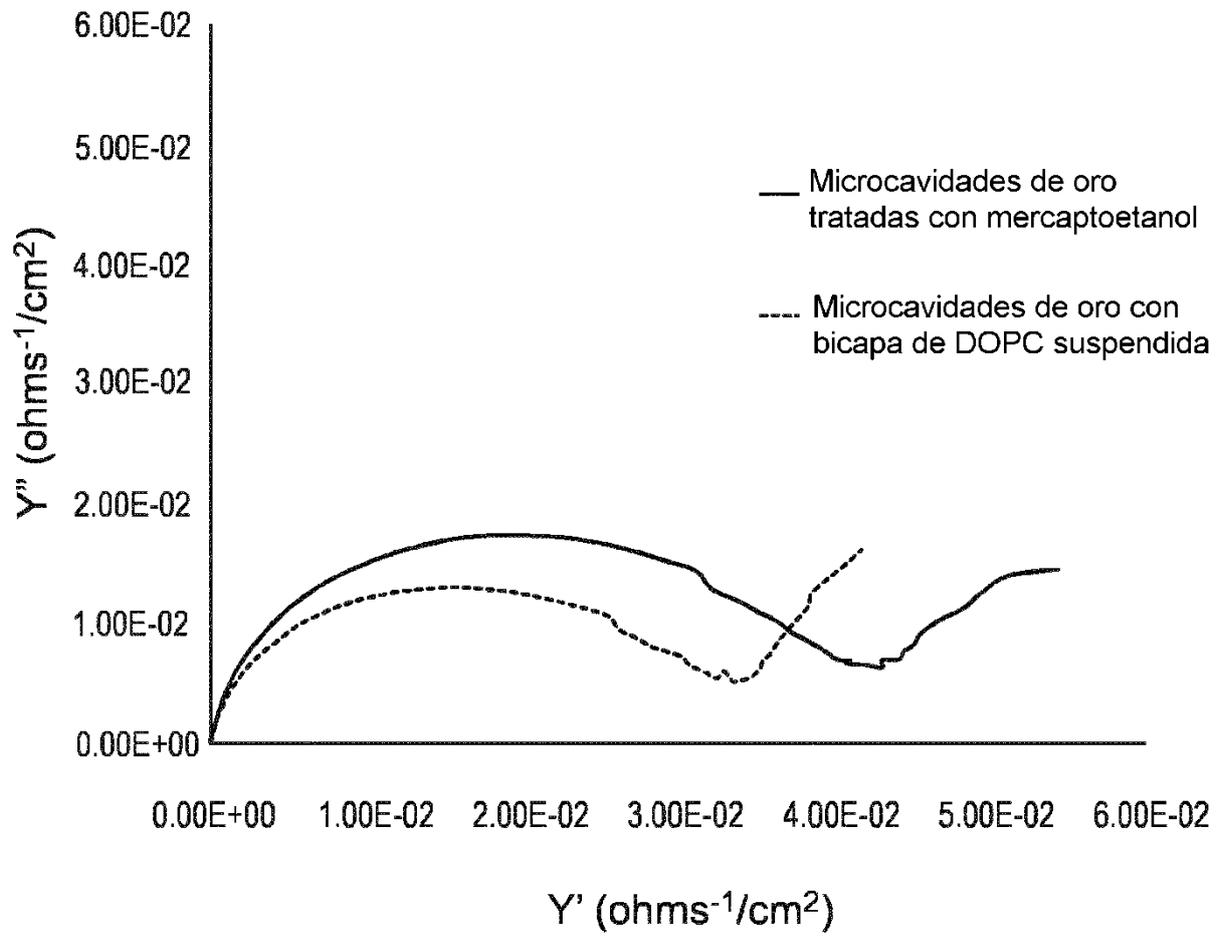


Figura 10

25 de junio de 2014
 Tec. IMP
 Archivo: Bilayer.bin

E inic. (V)=0.142
 Frec. alta (Hz)=1e+4
 Frec. baja (Hz)=0.1
 FT de imp.
 Amplitud (V)=0.01
 Tiempo de inactividad (s)=2
 Ciclos (-1-1Hz)=6

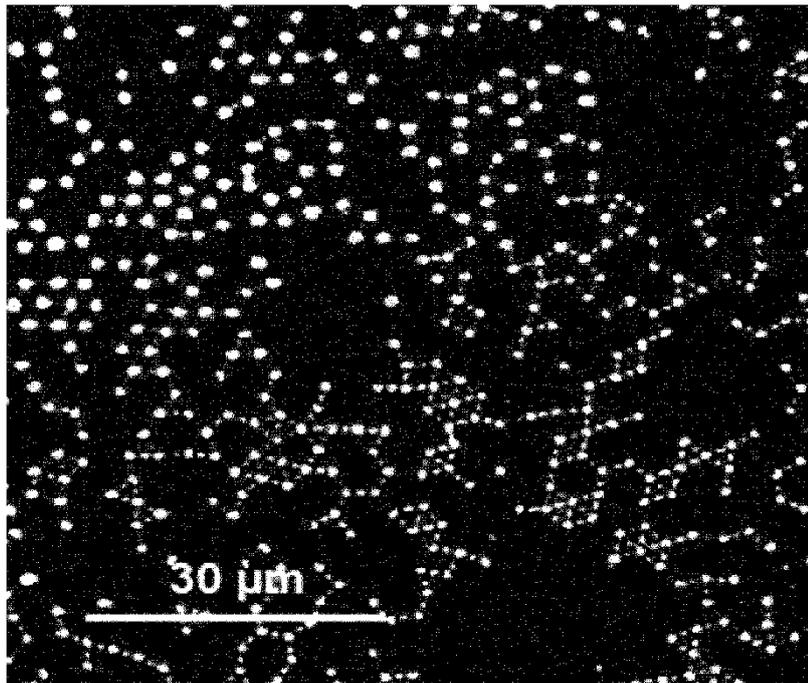
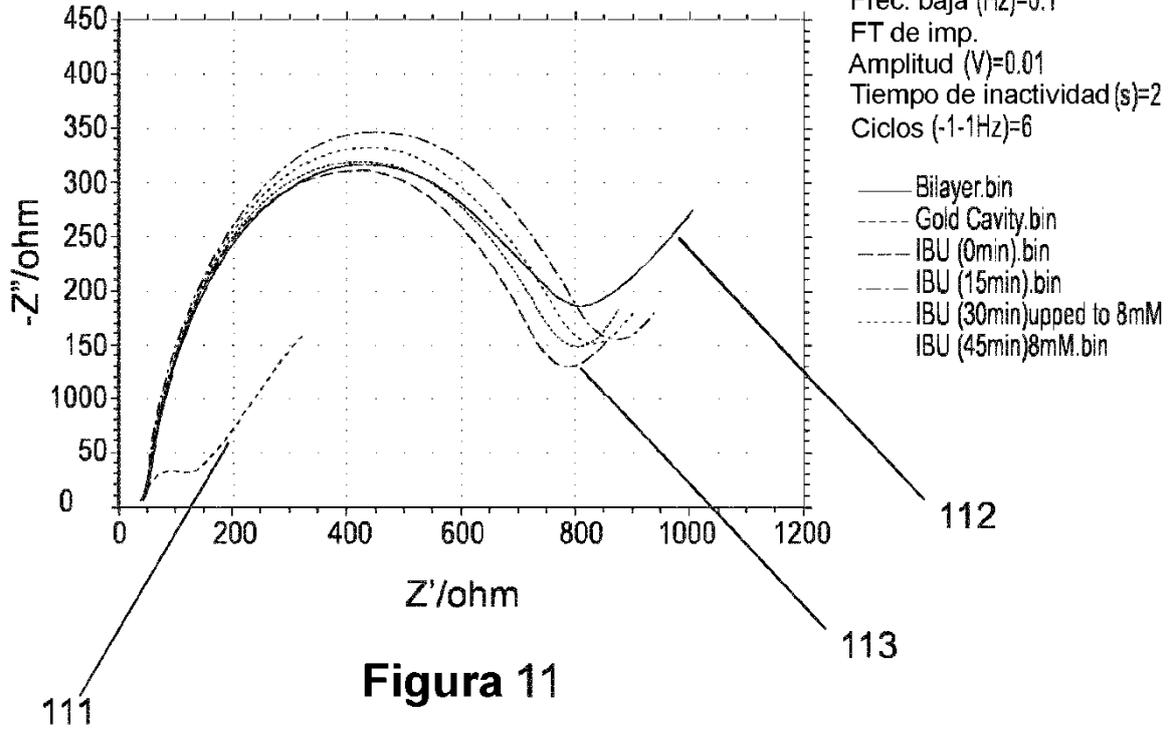


Figura 12 (A)

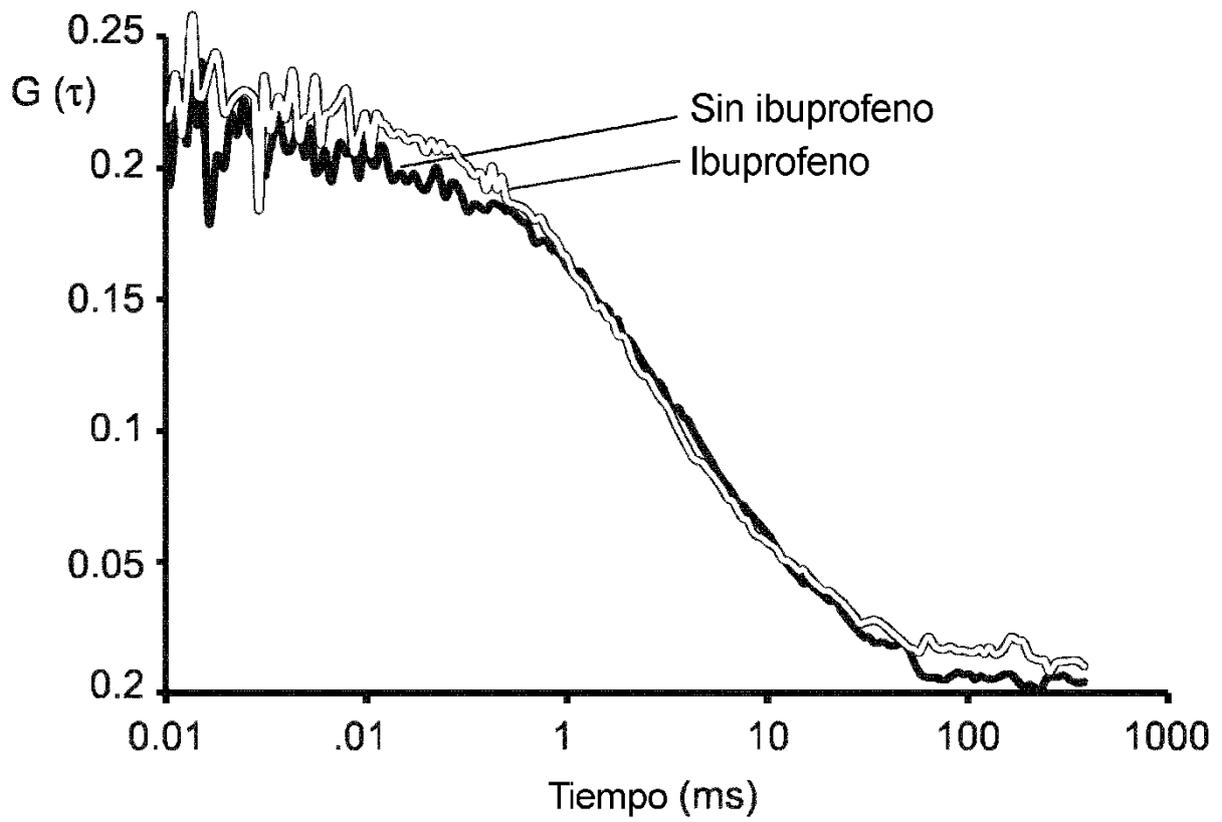


Figura 12 (B)

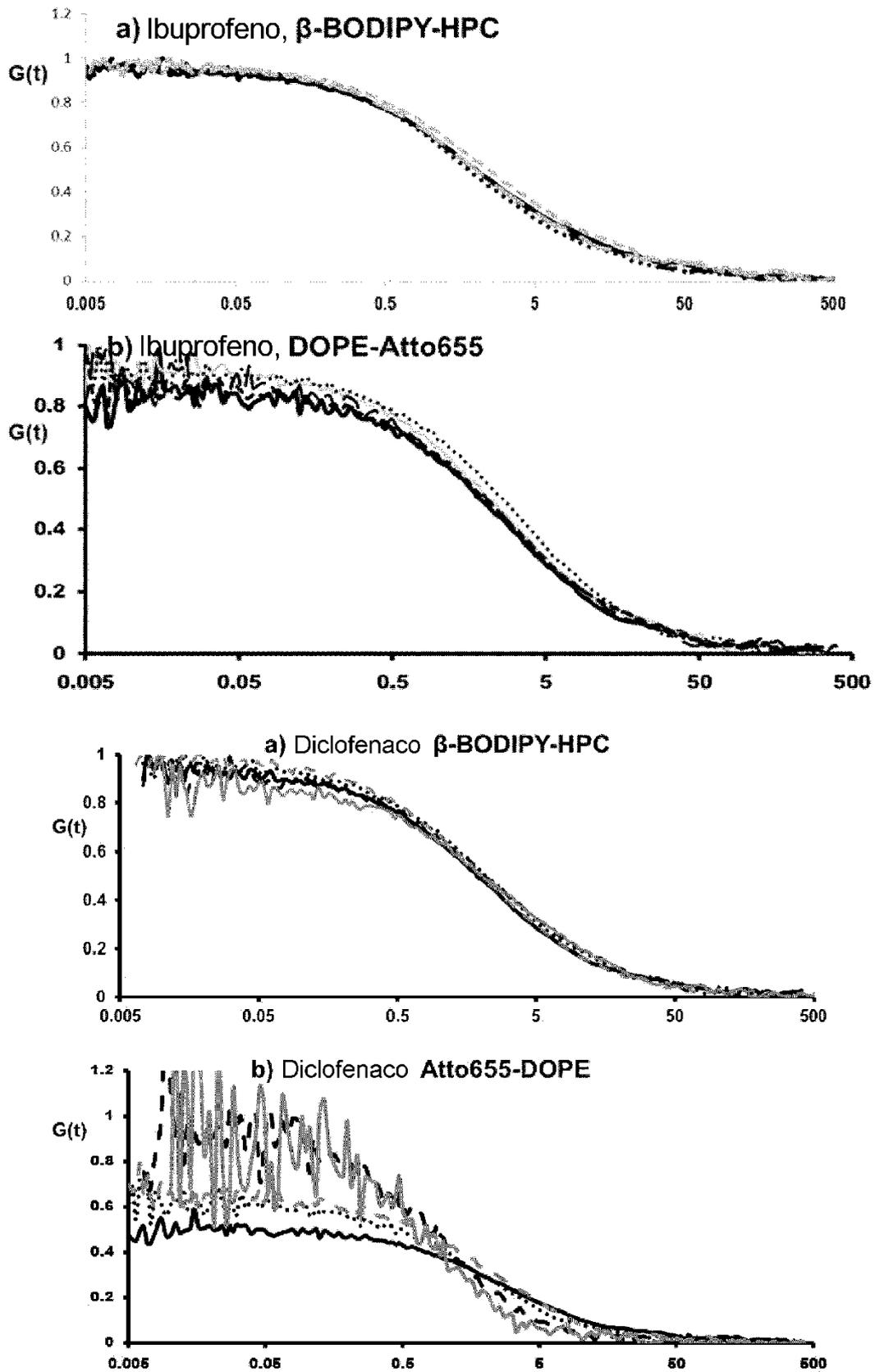
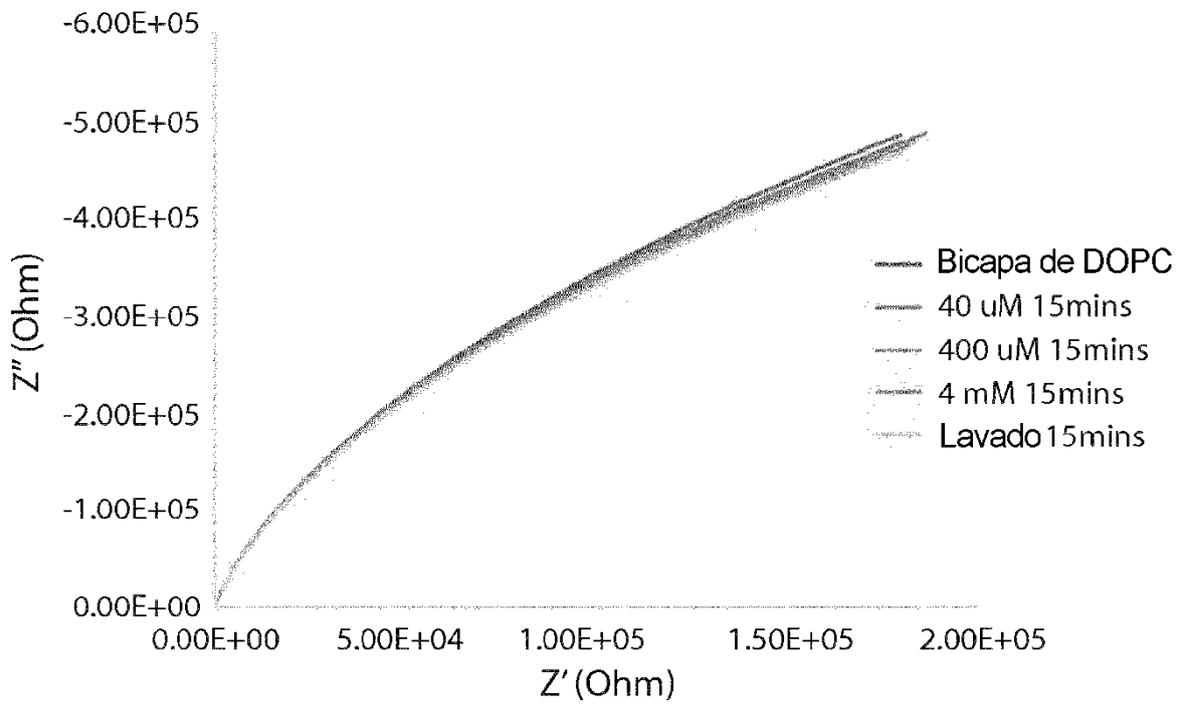


Figura 13

Estudio de EIS del efecto de ibuprofeno sobre bicapa de DOPC



Estudio de EIS del efecto de diclofenaco sobre bicapa de DOPC

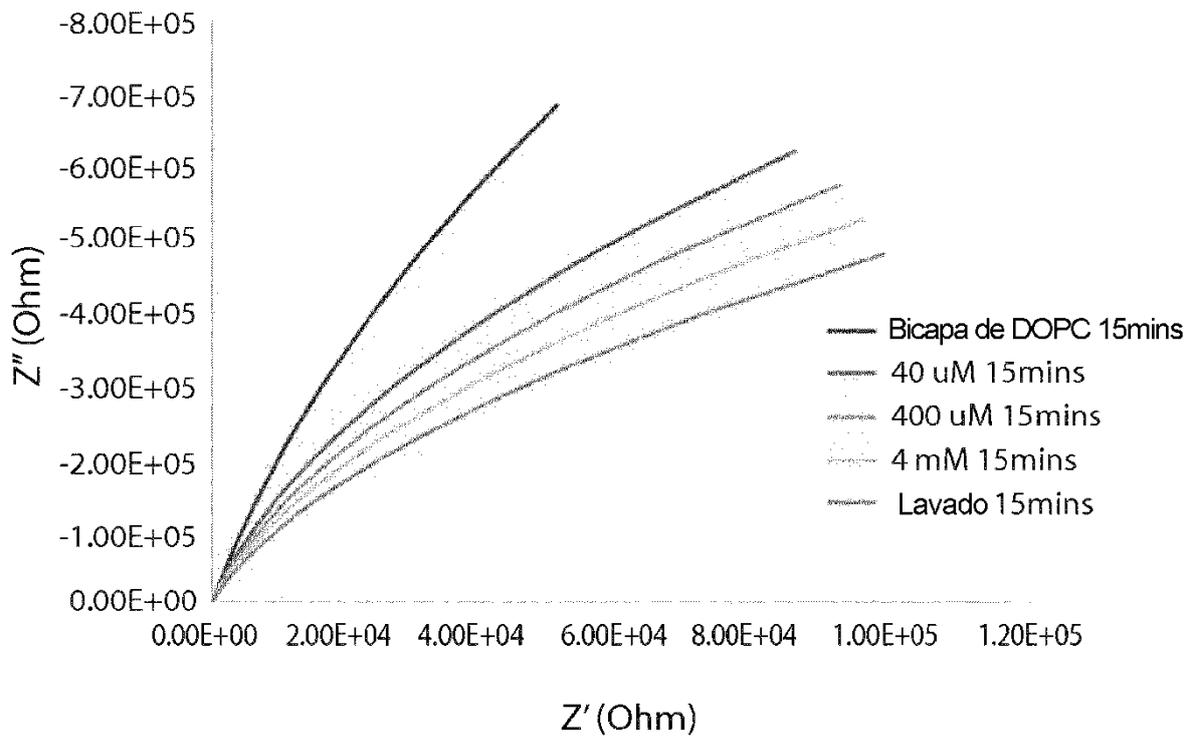


Figura 14

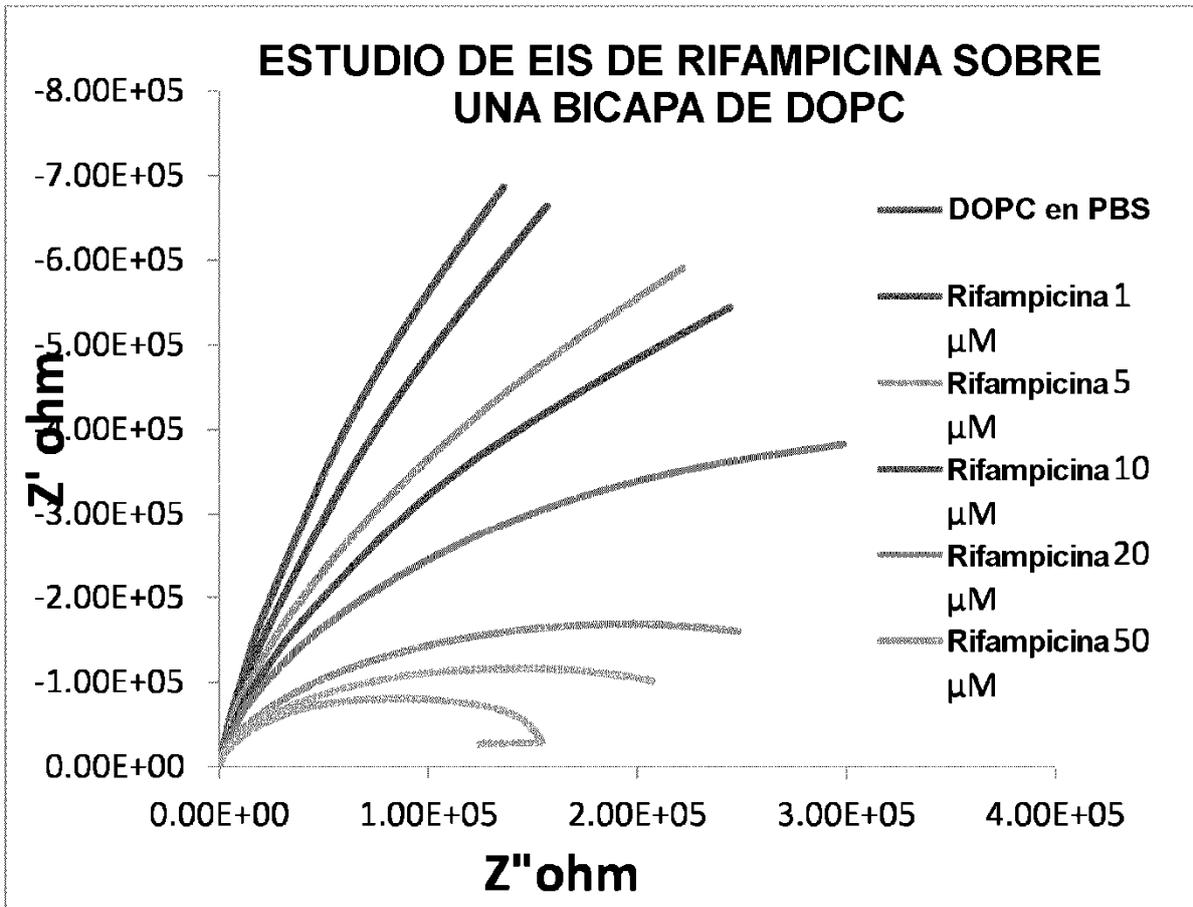


Figura 15

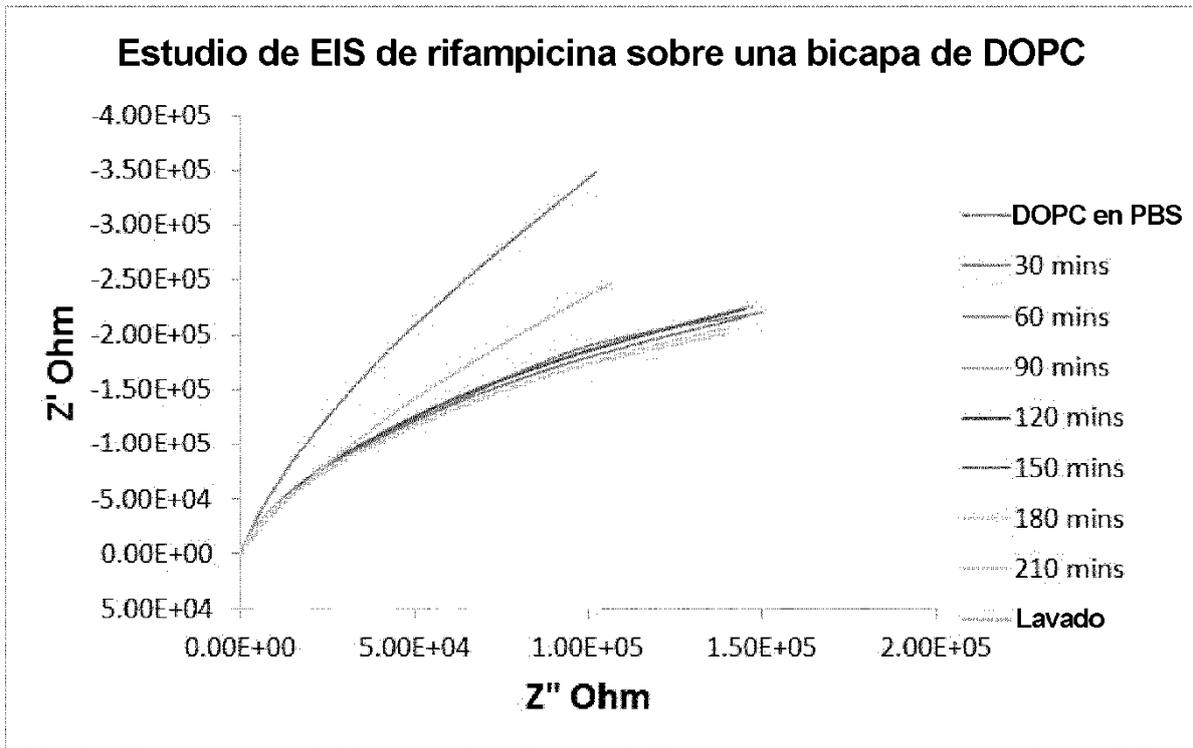


Figura 16

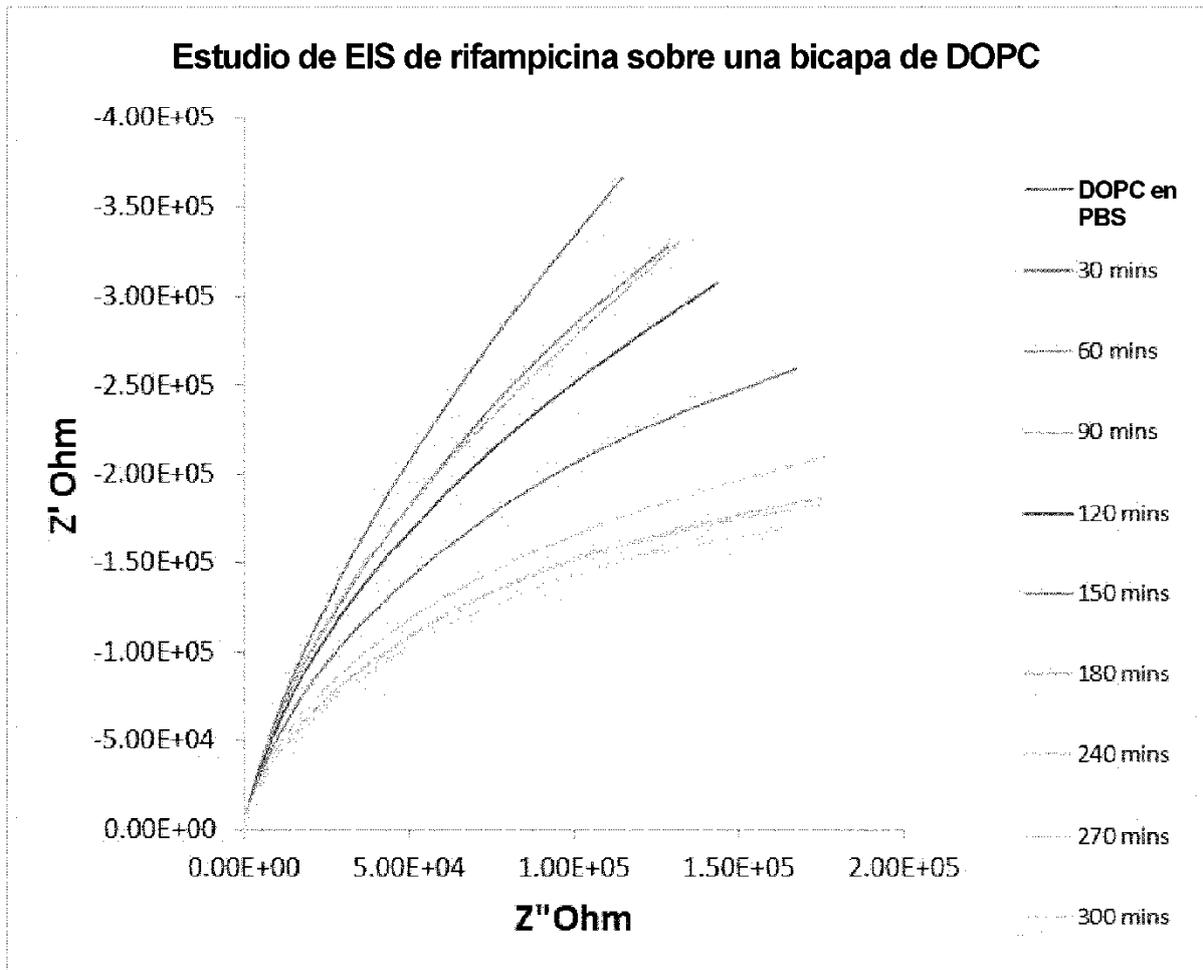


Figura 17

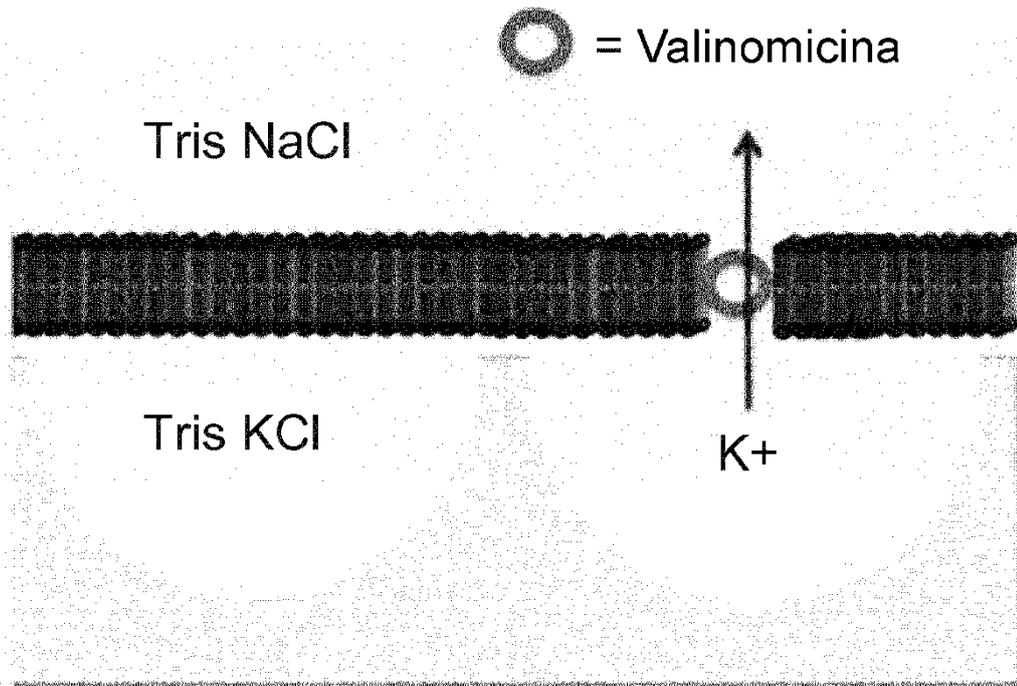
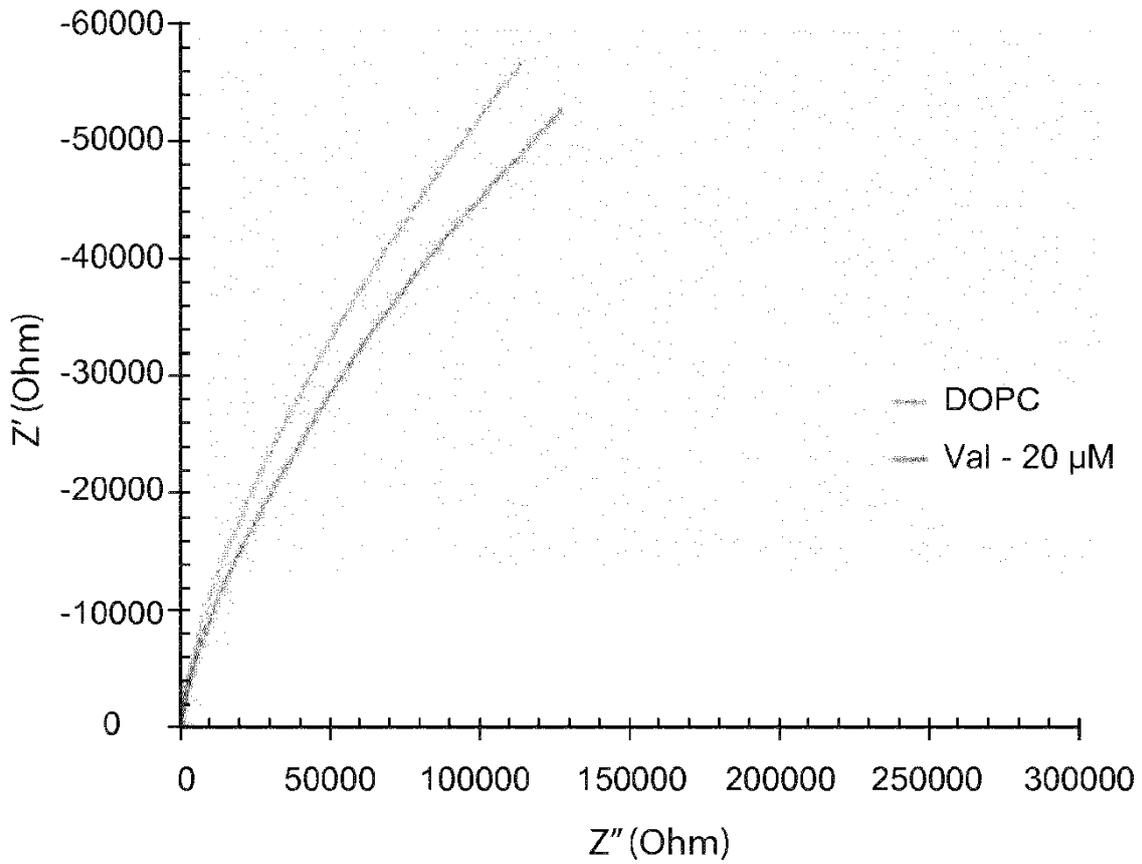


Figura 18

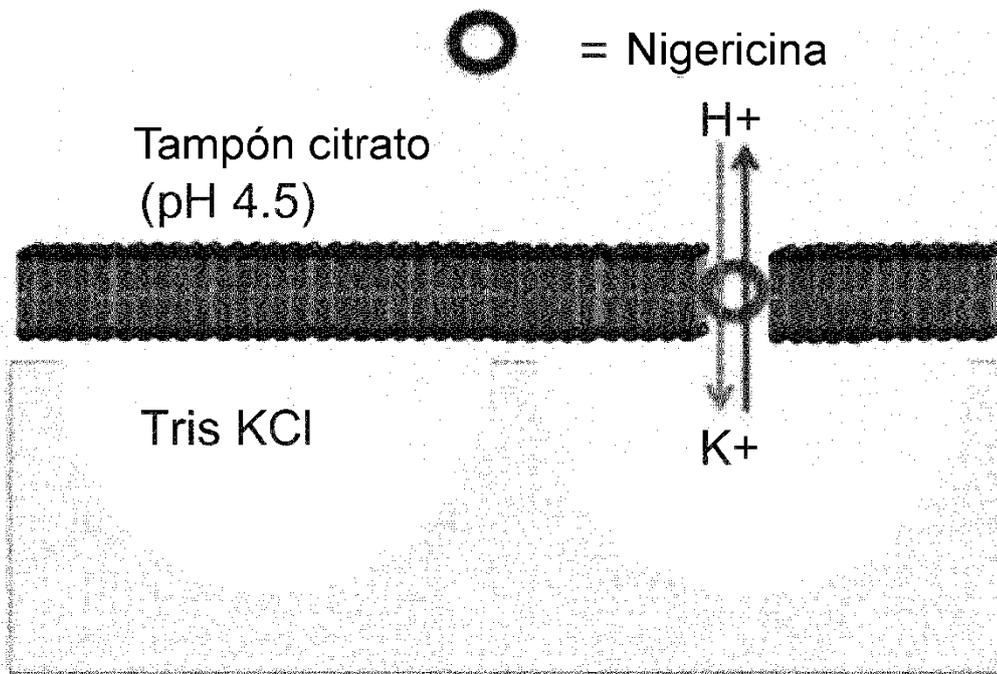
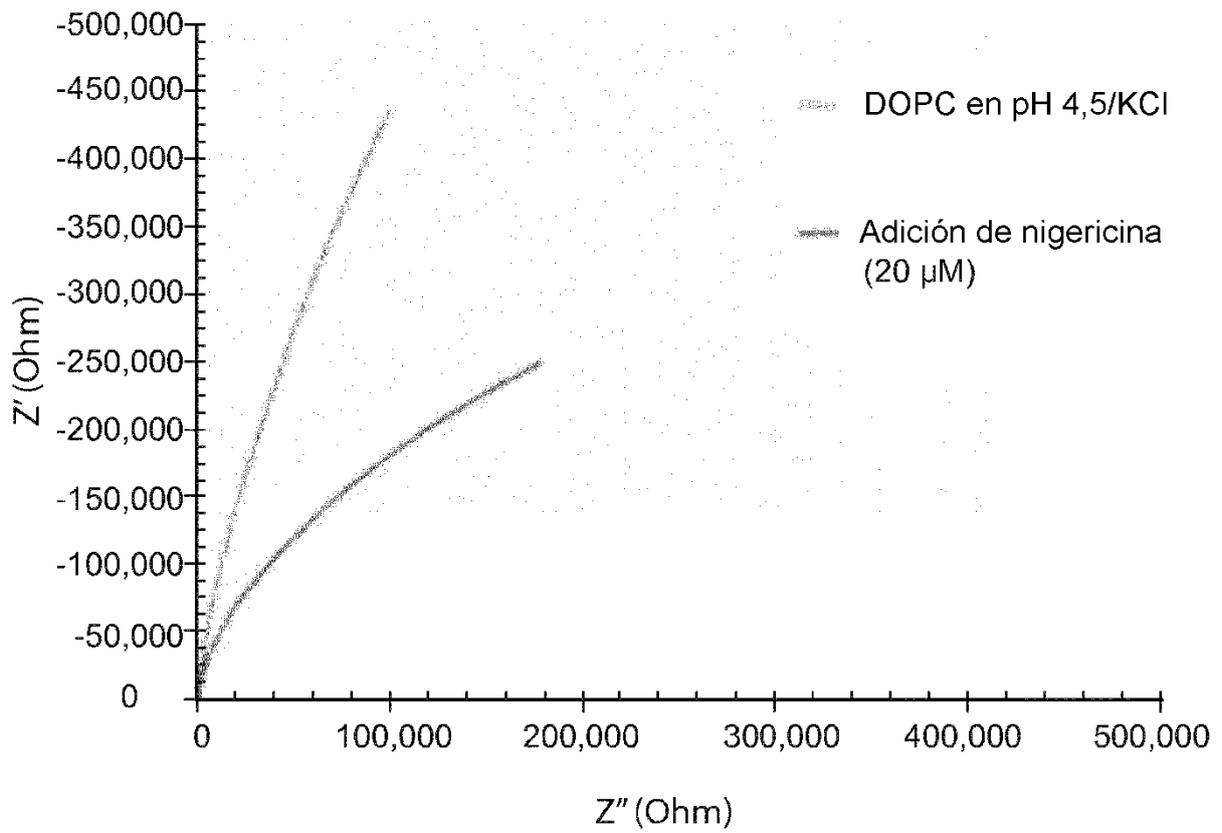


Figura 19