

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 832**

51 Int. Cl.:

**G01N 21/64** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

**G01N 33/557** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2015 E 15169461 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 2950096**

54 Título: **Dispositivo de detección, y sistema de detección y método de detección que usan el mismo**

30 Prioridad:

**27.05.2014 US 201462003268 P**

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

**26.02.2019**

73 Titular/es:

**ACADEMIA SINICA (50.0%)  
128, Sec 2, Academia Road Nankang  
Taipei 11529, TW y  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CHOU, CHIA-FU;  
LEICHLÉ, THIERRY;  
LIN, YII-LIH y  
TEERAPANICH, PATTAMON**

74 Agente/Representante:

**ARIZTI ACHA, Monica**

ES 2 701 832 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 de detección, y sistema de detección y método de detección que usan el mismo

**5 Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La presente divulgación se refiere a un dispositivo de detección, a un sistema de detección y a un método de detección para nanorendijas biofuncionalizadas combinadas con microscopía de fluorescencia para estudios de cinética de detección ultrarrápida de moléculas marcadas pero con una configuración sencilla/de bajo coste.

**Técnica relacionada**

15 La monitorización de la cinética de interacciones proteicas ofrece percepciones fundamentales de sus funciones celulares y es una clave vital en el desarrollo de posibles pruebas de diagnóstico y tratamiento bioterapéutico. La resonancia de plasmón superficial (SPR) y el microequilibrio de cristales de cuarzo (QCM) son una tecnología comercializada actualmente convencional usada de manera rutinaria en el campo de las ciencias de la vida y farmacéutica, que ofrecen una detección en tiempo real de interacciones biomoleculares sin el requisito de  
20 marcadores. Sin embargo, estas técnicas requieren una superficie de detector especializado de alto coste y la integración de componentes ópticos y mecánicos, lo que a su vez aumenta los costes globales del ensayo y complica la configuración instrumental.

25 Más específicamente, la resonancia de plasmón superficial (SPR) requiere una superficie de detector de alto coste y una configuración sofisticada. La SPR carece de resolución espacial y es cara/complicada de implementar, tiene una baja sensibilidad ( $\sim$ nM), una cantidad mucho mayor ( $\sim$ 1000X) de consumo de reactivos (10  $\mu$ l), una baja capacidad de multiplexación, un alto coste del chip de SPR ( $\sim$ 300 \$/chip). El QCM (microequilibrio de cristales de cuarzo) no tiene resolución espacial y tiene baja sensibilidad. Además, el QCM no tiene capacidad de multiplexación y requiere una mayor cantidad de consumo de reactivos y un alto coste del chip ( $\sim$ 100 \$/chip).

30 La TIRFM (microscopía de fluorescencia de reflexión interna total) requiere un aparato complicado, una mayor cantidad de consumo de reactivos. Los detectores bioelectrónicos integrados implican una electrónica o un procedimiento de fabricación complicados.

35 Las plataformas típicas descritas anteriormente tienen una baja sensibilidad (intervalo de nM) y no son adecuadas para una pequeña cantidad de consumo de muestra.

40 El tiempo que se tarda en detectar biomoléculas específicas en una muestra está limitado principalmente por la sensibilidad del detector y el tiempo que tardan el número más bajo de moléculas que pueden detectarse en alcanzar el detector. Aunque ahora está disponible una amplia gama de dispositivos muy sensibles (detectores electroquímicos, detectores ópticos...), cuando se trabaja con áreas de detección pequeñas y muestras de concentración baja, el tiempo de difusión es el factor limitante principal para la mayoría de las plataformas de detección microfluídicas. Por tanto, superar la difusión es ahora obligatorio con el fin de lograr una detección ultrarrápida. Las soluciones técnicas usadas en sistemas de análisis micrototales, o microTAS, y las tecnologías de  
45 microalinamientos consisten en usar flujo de convección y alternativo en microcanales o nanocanales, en el mezclado de la disolución, y en el aumento local de la concentración de biomoléculas, por ejemplo, por medio de dielectroforesis. Aunque el tiempo de detección puede reducirse de varias horas a varios minutos usando estos métodos, la desventaja principal de la mayoría de estos métodos es que su implementación puede suponer un desafío con procedimientos de fabricación altamente complejos.

50 El documento US 2004/005582 A1 describe métodos y sistemas de microflujo de desorción bioespecíficos que emplean elementos unidos previamente inmovilizados de un par de unión que se usan en la detección de analitos en muestras, la identificación de sitios de unión y el estudio de interacciones bioespecíficas y sus inhibidores en células intactas, membranas celulares, orgánulos celulares, fragmentos celulares, proteínas y otros biopolímeros. El canal de reacción de microflujo está en conexión de fluido con uno o más depósitos que tienen cada uno un medio para transportar fluidos o muestra a un canal de microflujo que tiene un par de unión unido previamente. Las moléculas marcadas desorbidas bioespecíficamente pueden detectarse y cuantificarse de manera continua en línea.

60 El documento WO 2014/075016 A1 describe un dispositivo microfluídico para determinar si un analito está presente en una muestra que se proporciona. El dispositivo microfluídico incluye una trayectoria de flujo alargada que tiene un medio polimérico, en donde el medio polimérico incluye un primer dominio de detección de analitos que tiene un primer elemento de captura inmovilizado que se une específicamente a un primer analito y un segundo dominio de detección de analitos que tiene un segundo elemento de captura inmovilizado que se une específicamente a un segundo analito.

El documento WO 2012/118433 A1 describe un método de detección de una pluralidad de muestras de fluido para determinar la presencia de analitos que pueden unirse específicamente a un ligando inmovilizado sobre una superficie de detección de un detector, en el que se producen curvas de respuesta respectivas que representan el progreso de cada interacción con el tiempo, comprende someter un conjunto de curvas de respuesta resultantes a un procedimiento de evaluación que comprende determinar para cada curva de respuesta una clasificación de aglutinante basándose en al menos dos características relacionadas con la unión de la curva de respuesta, identificar curvas de respuesta para las que la clasificación de aglutinante se desvía significativamente de la de las curvas de respuesta restantes como grupo y clasificar estas curvas de respuesta que se desvían como que representan analitos de la muestra que son parejas de unión para el ligando.

El documento WO 2004/050247 A1 describe una disposición microfluídica que comprende A) varios dispositivos microfluídicos y B) un instrumento que comprende un motor giratorio y un elemento rotatorio dispuesto de manera que el flujo de líquido puede estar impulsado por la fuerza centrífuga en cada uno de los dispositivos haciendo girar el.

El documento WO 2011/134915 A1 describe un método para detectar y cuantificar un analito en un líquido de interés usando un sustrato sólido cuya superficie incluye al menos una zona activa sobre la que se inmoviliza al menos una sonda que puede unirse a dicho analito, y una disolución que contiene al menos un reactivo secundario que puede unirse al analito, incluyendo dicho método una etapa de recirculación de dicha disolución para colocar la misma en contacto con la superficie de nuevo, y en particular con la zona activa al menos una vez más. La presente invención se refiere asimismo a un dispositivo que puede implementarse en el marco de un método de este tipo.

### Sumario de la invención

Para hacer avanzar el estado de la técnica, la presente invención ha presenciado una notable investigación y desarrollo de dispositivos micro y nanofluídicos novedosos, que permiten el análisis de moléculas individuales, la clasificación de células, la separación de ADN y la detección de proteínas multiplexada rápida. La combinación de nanofluídica con una tecnología de biodetector avanzada abre nuevos caminos para diagnósticos clínicos en el punto de atención particularmente debido a su capacidad para integrar tales dispositivos en un laboratorio en un chip ya que las dimensiones se reducen. Los biodetectores basados en nanofluídica reducen predominantemente el consumo de reactivos biológicos costosos con velocidad de análisis potenciada gracias al acortamiento de la distancia de difusión entre moléculas de sonda inmovilizadas y analitos que fluyen en canales confinados.

Para lograr lo anterior, la presente invención da a conocer un dispositivo de detección aplicado a una molécula de analito de una muestra líquida y un flujo de tampón, que comprende: al menos una primera entrada, al menos una segunda entrada, un canal de microflujo y al menos un elemento de inmovilización. La primera entrada es para introducir la muestra líquida. La segunda entrada es para introducir el flujo de tampón. El canal de microflujo se comunica con la primera entrada y la segunda entrada. El elemento de inmovilización es para inmovilizar una molécula de detección para la molécula de analito y el flujo de tampón en el canal de microflujo.

En una realización de la presente invención, la molécula de detección puede generar una reacción de asociación con la molécula de analito de la muestra líquida, y generar una reacción de disociación con la molécula de analito y el flujo de tampón en sentido inverso.

En una realización de la presente invención, el canal de microflujo tiene una longitud suficiente para que la reacción de asociación de la molécula de detección y la molécula de analito pueda observarse.

En una realización de la presente invención, la reacción de asociación de la molécula de detección y la molécula de analito presenta fluorescencia.

En una realización de la presente invención, la molécula de detección y la molécula de analito de la muestra líquida generan la reacción de asociación tras fluir la muestra líquida al interior del canal de microflujo, luego la molécula de detección y la molécula de analito generan la reacción de disociación tras fluir el flujo de tampón de manera inversa al interior del canal de microflujo, concretamente, un flujo inverso con respecto a la reacción de asociación.

En una realización de la presente invención, el dispositivo comprende además un sustrato y una cubierta. El sustrato tiene una pluralidad de ranuras correspondientes a la primera entrada, la segunda entrada y el canal de microflujo. La cubierta se orienta hacia las ranuras y se combina con el sustrato, en el que la cubierta y las ranuras forman la primera entrada, la segunda entrada y el canal de microflujo. El elemento de inmovilización se dispone sobre la ranura correspondiente al canal de microflujo.

En una realización de la presente invención, el material del sustrato comprende silicio, dióxido de silicio, vidrio y/o plásticos, el material de la cubierta comprende polidimetilsiloxano, polidimetilsiloxano duro, polisilsesquioxano (PSQ)

y/o plásticos en forma desnuda o recubiertos sobre un portaobjetos de vidrio, y el elemento de inmovilización se forma mediante tratamiento de superficie sobre el sustrato con parche de oro, vidrio o plásticos.

5 En una realización de la presente invención, la muestra líquida fluye a lo largo de un primer sentido que se extiende desde la primera entrada hasta la segunda entrada, y el intervalo de la longitud del canal de microflujo entre la primera entrada y la segunda entrada es de entre 100  $\mu\text{m}$  ~ 5 cm, el intervalo de la distancia promedio entre el sustrato y la cubierta es de entre 50 nm ~ 10  $\mu\text{m}$  y el intervalo de la longitud del elemento de inmovilización en el primer sentido es de entre 1  $\mu\text{m}$  y la longitud de canal de microflujo completo.

10 En una realización de la presente invención, el dispositivo comprende además un recipiente que se comunica con la segunda entrada para almacenar el flujo de tampón.

En una realización de la presente invención, el canal de microflujo comprende una pluralidad de nanorendijas.

15 Para lograr lo anterior, la presente invención da a conocer un sistema de detección que comprende un dispositivo, un generador de flujo, una unidad de control de flujo, una unidad de captura y una unidad de computación. El generador de flujo se conecta con la primera entrada y la segunda entrada. La unidad de control de flujo controla el generador de flujo para generar flujo desde la primera entrada hasta la segunda entrada para impulsar la muestra líquida o el flujo de tampón para que fluya al interior del canal de microflujo. La unidad de captura capta al menos  
20 una imagen procedente del canal de microflujo. La unidad de computación genera un resultado de detección según la imagen.

25 En una realización de la presente invención, el generador de flujo incluye uno o más de los siguientes: bomba de presión o bomba de capilaridad para flujo impulsado por presión, flujo inducido por gradiente térmico o bomba electrocinética para flujo electroosmótico.

30 En una realización de la presente invención, la unidad de captura capta imágenes de periodos de tiempo del canal de microflujo para la reacción de asociación y capta un segundo conjunto de imágenes de periodos de tiempo del canal de microflujo para la reacción de disociación, y la unidad de computación utiliza la cinética de asociación y cinética de disociación para generar el resultado de detección según las primeras imágenes de periodos de tiempo y las segundas imágenes de periodos de tiempo.

35 Para lograr lo anterior, la presente invención da a conocer un método de detección que comprende las siguientes etapas: impulsar la muestra líquida al interior del canal de microflujo desde la primera entrada para asociar la molécula de analito de la muestra líquida con la molécula de detección; impulsar el flujo de tampón al interior del canal de microflujo desde la segunda entrada para disociar la molécula de analito de la molécula de detección; y generar un resultado de detección como sensograma según el resultado de asociación y el resultado de disociación.

40 En una realización de la presente invención, la etapa de generación comprende además: obtener una información de cinética de asociación según el resultado de asociación; obtener una información de cinética de disociación según el resultado de disociación; y obtener el resultado de detección según la información de cinética de asociación y la información de cinética de disociación.

45 En una realización de la presente invención, la etapa de generación comprende además: analizar una intensidad de fluorescencia a partir del resultado de asociación para obtener información de cinética de asociación; analizar otra intensidad de fluorescencia a partir del resultado de disociación para obtener una información de cinética de disociación; obtener el resultado de detección según la información de cinética de asociación y la información de cinética de disociación.

50 En una realización de la presente invención, el método de detección comprende además las siguientes etapas: impulsar una disolución de regeneración al interior del canal de microflujo; enjuagar el canal de microflujo con la disolución de regeneración; y retirar la disolución de regeneración del canal de microflujo.

55 La presente invención proporciona un dispositivo de detección, y un sistema de detección y un método de detección que son de manera práctica rendijas nanofluídicas biofuncionalizadas aplicadas con técnicas de microscopía de fluorescencia clásicas, que proporcionan una plataforma de biodetección sencilla, de bajo coste pero eficaz para estudios cinéticos. El dispositivo de detección incluye un canal cuya profundidad se reduce hasta el intervalo submicrométrico, proporcionando por tanto las siguientes ventajas de la presente invención: (1) la reducción drástica de la longitud de difusión permite el funcionamiento en un régimen de reacción limitada con eficacia de captura de dianas optimizada. Por tanto, todas las moléculas de analito inyectadas en el dispositivo de detección se analizan, y el estudio de disociación puede implementarse de manera sencilla tras la finalización de la fase de asociación reservando el flujo de fluido dentro del canal en lugar de inyectar nuevo tampón en la entrada, lo que da como resultado un protocolo de funcionamiento simplificado y un tiempo de análisis reducido; (2) una reducción del volumen de muestreo permite que el dispositivo examine directamente el elemento de inmovilización con  
60

microscopios de fluorescencia convencionales sin la necesidad de usar configuraciones complicadas y caras, tales como SPR, TIRFM o QCM; (3) la razón de señal con respecto a ruido es inversamente proporcional a la altura del canal: canales submicrométricos ofrecen por tanto una razón de señal con respecto a ruido de al menos 100 en una escala grande de constante de disociación  $K_D$ , desde el intervalo pM hasta el intervalo sub- $\mu$ M, que incluye la mayoría de las moléculas de interés.

Además, el dispositivo de detección, el sistema de detección y el método de detección de la presente invención permiten un área de muestreo grande de varios píxeles garantizando errores estadísticos mucho más reducidos (precisión superior) que plataformas de detección no resueltas espacialmente. De manera más importante, la microscopía de fluorescencia ofrece un límite de detección por debajo del pM sin efecto de la masa del analito, permitiendo por tanto el dispositivo de detección y el método de detección interacciones de muy alta afinidad y moléculas pequeñas.

La presente invención soluciona los problemas de la técnica anterior proporcionando: (1) un tiempo de ensayo cinético acortado debido a la operación de flujo invertido al tiempo que puede lograrse un mayor nivel de sensibilidad de detección con una configuración muy sencilla, (2) captura de dianas eficaz para el análisis de muestras minúsculas, y (3) cinética de reacción/unión resuelta espaciotemporalmente que permite un bajo error estadístico.

### Breve descripción de los dibujos

La presente invención se entenderá más completamente a partir de la posterior descripción detallada y dibujos adjuntos, que se facilitan a modo de ilustración solo, y por tanto no son limitativos de la presente invención y en los que:

la figura 1A es una representación esquemática de un dispositivo de nanorendijas biofuncionales usado en el estudio cinético de proteínas. Se inmovilizan moléculas de sonda de receptor sobre el elemento de inmovilización (superficie de detección) ubicado en el fondo del nanocanal. Se introducen moléculas diana marcadas con fluorescencia desde la entrada por medio de cualquier clase de flujo introducido para interactuar con el detector con sonda inmovilizada. La reacción cinética de unión de proteína-ligando se monitoriza en tiempo real usando microscopía de fluorescencia.

La figura 1B es un sensograma típico del análisis cinético realizado en el dispositivo nanofluídico de la figura 1. Durante la fase de asociación, el analito fluido se une a las moléculas de receptor inmovilizadas sobre la superficie del detector, dando como resultado un aumento en la intensidad de fluorescencia. Tras alcanzar el equilibrio, en donde la velocidad de asociación es igual a la velocidad de disociación, se introduce una disolución tampón desde un sentido invertido en el canal y se permite que el complejo de receptor-analito se disocie. En la etapa de regeneración, se usa una disolución de regeneración durante un corto periodo de tiempo para alterar la unión y regenerar el receptor libre para el siguiente ciclo de medición.

La figura 2 es un modelo bidimensional usado en la simulación de elementos finidos de inmunorreacción heterogénea en un canal nanofluídico con una longitud de canal (L) de 500  $\mu$ m y una altura de canal (H) de 450 nm, que contiene un área de detección de 50  $\mu$ m de longitud (W) en el fondo del canal. Se introduce el analito con una concentración de  $C_0$  en el canal desde la entrada izquierda con una velocidad de flujo de fluido (v). Se transportan moléculas de analito a lo largo de la longitud del canal en sentido x mediante el flujo por convección. Se permite que se difundan libremente en todas las direcciones y se capturen por moléculas de sonda inmovilizadas sobre la zona de reacción con una densidad de sonda en superficie ( $b_m$ ). Se definen las cinéticas de interacciones bioespecíficas por sus velocidades de asociación ( $k_a$ ) y velocidades de disociación ( $k_d$ ).

La figura 3 son diagramas que ilustran un procedimiento de encapsulación de nanorendijas biofuncionales y conexiones fluidicas. La disolución de analito se introduce desde una entrada mientras que la otra entrada se usa para la inyección de tampón, permitiendo el estudio de las fases de asociación y disociación de inmunorreacciones en un único experimento por medio de la manera de flujo de tampón invertido.

La figura 4 muestra ilustraciones esquemáticas (no a escala) de dos arquitecturas de funcionalización de superficies en detectores de oro usados para estudio cinético de proteínas en nanorendijas. (a) El modelo I muestra la interacción estreptavidina-biotina sobre superficie modificada con tiol biotinilado al 1%; (b) el modelo II muestra la interacción IgG de ratón anti-conejo/IgG anti-ratón por medio de la unión biotina-estreptavidina sobre superficie modificada con tiol biotinilado al 10%. El compuesto de tiol terminado en hidroxilo actúa como espaciador para reducir la adsorción no específica de proteínas sobre superficies de oro. También se muestra la fotografía del dispositivo de nanorendijas fabricado.

La figura 5A muestra respuestas de detector en tiempo real de la interacción estreptavidina-biotina medida

- 5 en nanorendijas biofuncionales. La curva cinética obtenida a partir de cada concentración se atribuye a la medición de un dispositivo nanofluídico diferente (las barras de error: errores estándar). Se normalizaron las respuestas del detector a la intensidad de fluorescencia relativa y se ajustaron con el modelo de computación basándose en el método de elementos finitos y modelo bien mezclado suponiendo una interacción 1:1 de Langmuir sencilla. Las líneas negras (-) y (----) representan las curvas predichas a partir del mejor ajuste de la simulación de elementos finitos y modelo bien mezclado, respectivamente. Debido a un tiempo de respuesta largo, también se representa gráficamente una curva de unión de la concentración más baja de estreptavidina (10 nM) por separado en la figura del recuadro.
- 10 La figura 5B es un gráfico de las constantes de velocidad aparente ( $K_{ap}$ ) determinadas a partir del ajuste de mínimos cuadrados no lineal en función de la concentración de estreptavidina. El gráfico muestra tendencias lineales con un valor de  $R^2$  de 0,9903.
- 15 La figura 6A son instantáneas de imágenes de fluorescencia tomadas durante los procesos de asociación y disociación tras la inyección de IgG de ratón anti-conejo con Alexa Fluor-647 (3 nM) en nanorendija modificada con anticuerpo anti-ratón. La fase de disociación se logra simplemente invirtiendo del flujo de líquido dentro del nanocanal tras el final de la fase de asociación.
- 20 La figura 6B muestra respuestas del detector en tiempo real de la interacción IgG de ratón/IgG anti-ratón medida en nanorendija biofuncional a diversas concentraciones de analito que oscilan entre 0,46 nM y 15 nM (las barras de error: errores estándar). Se normalizaron los datos a la intensidad de fluorescencia relativa y se ajustaron con tres modelos diferentes: (1) simulación de elementos finitos, (2) modelo bien mezclado y (3) ajuste global-local mediante el paquete de software BIAevaluation, suponiendo una interacción 1:1 de Langmuir sencilla. Las líneas negras (-), (----) y (·····) representan las curvas predichas a partir del mejor ajuste de simulación de elementos finitos, modelo bien mezclado y ajuste global-local, respectivamente. También se muestran gráficos de tiempo frente a residual para todas las concentraciones.
- 25 La figura 6C muestra un gráfico de constantes de velocidad aparente ( $K_{ap}$ ) en función de la concentración de IgG de ratón, que muestra tendencias lineales con un valor de  $R^2$  de 0,9959.
- 30 La figura 6D muestra sensogramas de la cinética de unión de IgG de ratón/IgG anti-ratón obtenidos a partir de la medición de SPR análoga. Se ajustaron las curvas cinéticas usando un modelo de análisis global 1:1 a partir del paquete de software BIAevaluation (línea negra). Se encuentra que las velocidades de asociación y disociación son de  $7,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  con SE de  $3,0 \times 10^3$  y  $1,9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  con SE de  $8,0 \times 10^{-6}$ , respectivamente.
- 35 La figura 7 muestra los cambios de intensidad de fluorescencia con el tiempo tras la introducción de diferentes concentraciones de diana de IgG de ratón anti-conejo con Alexa Fluor-647 (mIgG-AF 647) que oscilan entre 0 pM (tampón libre de analito) y 100 pM en nanorendija inmovilizada con IgG anti-ratón (las barras de error: errores estándar).
- 40 La figura 8 es un diagrama esquemático de la fabricación de nanorendijas biofuncionales y el procedimiento de encapsulación del chip.
- 45 La figura 9 es una presentación esquemática del ensamblaje del chip basándose en flujo impulsado por presión. El chip fluídico se coloca boca abajo en un soporte de junta realizado de aluminio, en el que se ubica una pieza de teflón que consiste en cuatro depósitos sobre la parte superior del chip fluídico, y se usa una entrada de presión realizada de teflón para sellar todo el sistema y conectarlo a un controlador de presión con la ayuda de una junta tórica y tornillos de teflón en cada superficie de contacto para evitar fugas.
- 50 La figura 10 muestra la extracción de constantes cinéticas para la interacción estreptavidina-biotina. Los datos experimentales de diversas concentraciones de estreptavidina (10, 30, 50 y 100 nM) (x) se representan gráficamente con las curvas simuladas (-) obtenidas a partir del modelo de computación de elementos finitos a constantes de velocidad de asociación y disociación diferentes. La densidad de sonda en superficie y la velocidad de flujo se mantienen iguales en todos los casos. Las constantes de velocidad extraídas se determinaron a partir del mejor ajuste de las curvas de unión predichas a los datos experimentales por medio del coeficiente de determinación.
- 55 La figura 11 muestra la repetibilidad del biodetector de nanorendija para múltiples detecciones de IgG de ratón anti-conejo con Alexa Fluor-647 5 nM (mIgG-AF 647). Los gráficos representan la intensidad de fluorescencia normalizada en función del tiempo para tres experimentos repetidos durante ensayos cinéticos en el mismo dispositivo (las barras de error: errores estándar). Se obtuvieron los datos a partir de la misma área (10x10 píxeles) sobre la superficie del detector de oro. Se regeneró el detector con la
- 60

disolución de regeneración (glicina-HCl 10 mM pH 2,0) y se enjuagó concienzudamente con disolución tampón antes de realizar el siguiente ciclo de medición. Se calculó que la desviación estándar relativa era del 2,28%.

## 5 Descripción detallada de la invención

La presente invención resultará evidente a partir de la siguiente descripción detallada, que se realiza con referencia a los dibujos adjuntos, en los que las mismas referencias se refieren a los mismos elementos.

10 La presente invención proporciona una plataforma de inmunobiodetector basada en nanofluídica rápida y rentable para la medición cinética en tiempo real de la unión proteína-proteína, que no es para limitar el sentido. Con la combinación de un sistema de detección de fluorescencia de sobremesa convencional y un flujo de tampón invertido, puede accederse a las cinéticas tanto de asociación como de disociación en un único experimento sin  
15 etapa de carga de tampón de enjuague, que es generalmente poco práctica para inmunoensayos basados en microfluídica típicos.

En la presente divulgación, se desarrolla un modelo basado en el método de elementos finitos para cuantificar constantes cinéticas de dos pares de unión proteína-ligando representativos: estreptavidina-biotina e IgG de  
20 ratón/IgG anti-ratón. La buena concordancia de las constantes de velocidad extraídas entre los dispositivos de la presente divulgación y la bibliografía frente a la medición de SPR indica que este enfoque podría aplicarse fácilmente para el estudio de las interacciones proteicas con sensibilidad por debajo de 1 pM.

La presente invención tiene las ventajas de capacidad de multiplexación, volumen muy pequeño de reactivo  
25 necesario y ausencia de lavado requerido. Además, la sensibilidad de detección puede ser de tan solo ~1 pM con un tiempo de análisis rápido (en 30 min), ventajoso en comparación con el método de ELISA convencional y la tecnología actual a continuación. Además, la presente invención logra un consumo de volumen de muestra bajo de 10,5 nL, lo que se traduce en un límite de detección en moles de al menos 10 zeptomoles y alta eficacia de captura (sin pérdida de moléculas diana).

30 La presente invención ofrece técnicas esenciales para el desarrollo de herramientas de diagnóstico mejoradas y nuevos tratamientos de terapia contra enfermedades. A lo largo de las últimas décadas, los biodetectores basados en afinidad, que se aprovechan de la interacción entre un analito diana libre y un receptor inmovilizado sobre una superficie sólida, han sido una solución clave en la caracterización de interacciones bioespecíficas. Este método  
35 revela la información de afinidad y cinética de diversos acontecimientos de unión, particularmente de proteína-ligando y ácidos nucleicos.

Haciendo referencia a la figura 1A, en esta realización, la presente invención proporciona un dispositivo 1 de  
40 detección aplicado para detectar una muestra líquida que incluye una pluralidad de molécula de analitos, especialmente biomoléculas (por ejemplo proteína, ADN...etc.). El dispositivo 1 de detección incluye un sustrato 11 que incluye al menos un elemento 12 de inmovilización (área de detección). Una pluralidad de moléculas 13 de detección se inmovilizan sobre el elemento 12 de inmovilización.

En términos específicos, el material del sustrato 11 incluye silicio, dióxido de silicio, vidrio y/o plásticos, y el elemento  
45 12 de inmovilización se forma realizando un tratamiento de superficie con oro, tratamiento de superficie con vidrio o tratamiento de superficie con plástico sobre parte del sustrato 11, que no es para limitar el sentido de la presente invención. La cantidad del elemento 12 de inmovilización se decide basándose en el requisito de experimento práctico. Por lo demás, las moléculas 13 de detección se eligen basándose en la especie de la molécula diana de los analitos.

50 El sustrato 11 tiene una pluralidad de ranuras (figura no mostrada) que son sustancialmente micro o nanoestructuras. El dispositivo 1 de detección también incluye una cubierta 14 que se orienta hacia las ranuras y se combina con el sustrato. La cubierta 14 y las ranuras sobre el sustrato 11 forman al menos una primera entrada 15,  
55 al menos una segunda entrada 16 y un canal de microflujo C. El elemento 12 de inmovilización se dispone sobre la ranura correspondiente al canal de microflujo C. La cantidad de la primera entrada 15, la segunda entrada 16 y el elemento 12 de inmovilización no son para limitar el conjunto de la presente invención. En esta realización, la cubierta 14 y las ranuras sobre el sustrato 11 forman una primera entrada 15, una segunda entrada 16 y un elemento 12 de inmovilización.

60 En referencia a la figura 1A, el flujo de muestra líquida se introduce desde la primera entrada 15, lo que se realiza de manera práctica mediante un generador de flujo (no mostrado en la figura), para asociar la molécula de analito de la muestra líquida con la molécula de detección. La muestra líquida fluye a lo largo de un primer sentido D1 que se extiende desde la primera entrada 15 hasta la segunda entrada 16. Se introduce un flujo de tampón desde la segunda entrada 16, lo que también se realiza mediante el generador de flujo mencionado anteriormente. El flujo de tampón fluye en un segundo sentido D2 que se extiende desde la segunda entrada 16 hasta el primer sentido 15, es

decir, la muestra líquida y el flujo de tampón fluyen juntos en sentidos completamente opuestos uno con respecto a otro. Por tanto, el flujo de tampón es un flujo invertido en contraposición al flujo de muestra líquida.

5 En uso práctico, el generador de flujo mencionado anteriormente incluye pero no se limita a una bomba de presión o bomba de capilaridad para flujo impulsado por presión, flujo inducido por gradiente térmico o bomba electrocinética para flujo electroosmótico.

10 Haciendo referencia a la figura 1A, el intervalo de la longitud del canal de microflujo C entre la primera entrada 15 y la segunda entrada 16 es de entre  $100\ \mu\text{m} \sim 5\ \text{cm}$ . En esta realización, la longitud del canal de microflujo C entre la primera entrada 15 y la segunda entrada 16 es de  $500\ \mu\text{m}$ . El intervalo de la distancia promedio entre el sustrato 11 y la cubierta 14 es de entre  $50\ \text{nm} \sim 10\ \mu\text{m}$ . En esta realización, la distancia promedio entre el sustrato 11 y la cubierta 14 es de  $450\ \text{nm}$ .

15 Además, el intervalo de la longitud del elemento 12 de inmovilización en el primer sentido D1 es de entre  $1\ \mu\text{m}$  y la totalidad de la longitud del canal de microflujo C. En esta realización, la longitud del elemento 12 de inmovilización en el primer sentido D1 es de  $50\ \mu\text{m}$ .

20 La presente invención proporciona además un sistema de detección y un método de detección aplicados con el dispositivo 1 de detección mencionado anteriormente. El sistema de detección incluye un dispositivo 1 de detección mencionado anteriormente, un generador de flujo que se conecta con la primera entrada 15 y la segunda entrada 16, una unidad de control de flujo que controla el generador de flujo para presionar la primera entrada 15 o la segunda entrada 16 para impulsar la muestra líquida o el flujo de tampón para que fluya al interior del canal de microflujo C, una unidad de captura que capta al menos una imagen del canal de microflujo C y una unidad de computación que genera un resultado de detección según la imagen. Las técnicas y los detalles de implementación del sistema de detección se han dado a conocer mediante la descripción mencionada anteriormente y se hace referencia a los mismos mediante el ejemplo experimental mencionado más adelante, por tanto, en este caso, los detalles no se repiten.

30 El método de detección incluye las siguientes etapas: impulsar la muestra líquida al interior del canal de microflujo desde la primera entrada para asociar la molécula de analito de la muestra líquida con la molécula de detección; impulsar el flujo de tampón al interior del canal de microflujo desde la segunda entrada para disociar la molécula de analito de la molécula de detección; y generar un resultado de detección según el resultado de asociación y el resultado de disociación. Las técnicas y los detalles de implementación del método de detección se han dado a conocer mediante la descripción mencionada anteriormente y se hace referencia a los mismos mediante el ejemplo experimental mencionado más adelante, por tanto, en este caso, los detalles no se repiten.

40 Haciendo referencia a la figura 1B, los dispositivos de la presente divulgación pueden generar un sensograma cinético completo que incluye las fases tanto de asociación como de disociación en un único experimento con una única inyección por medio de un flujo de tampón invertido. Además, se desarrolló un modelo basado en el método de elementos finitos usando el software COMSOL multiphysics para predecir las respuestas de unión de la inmunorreacción dentro de las nanorendijas. Finalmente, se determinaron las constantes de velocidad de asociación/disociación de interacciones proteína-ligando y se validaron los valores extraídos con los de la bibliografía y mediciones de SPR análogos.

45 Lo que viene a continuación y las figuras adjuntas toman varios experimentos como ejemplos para describir los detalles principales del método para detectar moléculas de analitos diana según las realizaciones de la presente invención.

## 50 Experimentos

### Materiales y reactivos

55 Se adquirió tri(etilenglicol)undecanotiol biotilado (BAT) ( $\text{HS}-(\text{CH}_2)_n\text{-OEG-biotina}$ ) de Nanoscience Instruments (EE.UU.). Se adquirió 11-mercapto-1-undecanol (MUD) ( $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}\text{-OH}$ ), albúmina sérica bovina (BSA) de Sigma-Aldrich (Francia). Se adquirió Tween-20 de ACROS Organics (Francia). Se adquirieron IgG anti-ratón biotilada e IgG de ratón anti-conejo monoclonal conjugada con Alexa Fluor 647 de Jackson ImmunoResearch (RU). Se adquirieron estreptavidina conjugada con Alexa Fluor 488 y anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 660 de Invitrogen, Inc. Se diluyeron todas las proteínas en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (PBS 10 mM, NaCl 0,138 M, KCl 0,0027 M, pH 7,4) adquirida de Sigma-Aldrich (Francia). Se adquirieron cinco composiciones de productos para la preparación de PDMS duro, copolímero de vinilo-PDMS, resina de sílice Q modificada con vinilo, platino-diviniltetrametildisiloxano, prepolímero de hidrosilano y 2,4,6,8-tetrametiltetrasiloxano de abcr GmbH & Co. Kg (Alemania) y Sigma-Aldrich (Francia). Todos los demás productos químicos eran de calidad analítica y se usaron sin purificación adicional. Se realizaron las mediciones de SPR en un aparato BIACORE 3000 (Biacore AB, Uppsala, Suecia) y el kit de Au-SIA se adquirió de Biacore AB. Se

usó el limpiador de plasma Pico de Diener electronic GmbH + Co. Kg (Alemania) para la activación de la superficie.

#### Diseño y fabricación del chip nanofluídico

5 Haciendo referencia a la figura 8, se muestra un diagrama esquemático de la fabricación de nanorendijas biofuncionales y el proceso de encapsulación del chip. Se diseñó el chip nanofluídico en un editor de diseño gráfico CleWin4 (Wieweb software, Países Bajos) y se imprimió sobre una máscara de cromo. El dispositivo consiste en nanocanales paralelos, de 50  $\mu\text{m}$  de anchura y 450 nm de profundidad conectados por dos microcanales, de 400  $\mu\text{m}$  de anchura y 5  $\mu\text{m}$  de profundidad. Se fabricó el chip sobre una oblea de silicio de tipo P de 100 mm con  
10 fotolitografía convencional. Se usó la fotolitografía para definir la anchura y la longitud de nano y microcanales.

En primer lugar, se recubrió por centrifugación un fotoprotector de ECI positivo de 2,6  $\mu\text{m}$  de grosor sobre una oblea de silicio pretratada con hexametildisilazano (HMDS), se expuso a UV y se reveló, seguido por ataque con iones reactivos (RIE) para lograr nanocanales de 450 nm de profundidad. Se realizaron los procesos similares alineando  
15 un patrón fotoprotector de microcanales sobre la oblea atacada, creando estructuras de nanorendijas y microcanales en la misma oblea. Entonces se oxidó térmicamente la oblea creando una capa de óxido delgada de 200 nm para facilitar el llenado con líquido y la unión del chip. Para inmovilizar selectivamente receptores de proteína en el fondo de los nanocanales, se evaporó una película de Cr/Au de 5/100 nm sobre la oblea de silicio atacada limpia y se retiró. Finalmente, se taladraron los orificios de entrada/salida desde el lado posterior de la oblea mediante una  
20 máquina de chorro de arena y se cortó la oblea en los chips de silicio individuales.

#### Protocolo de inmovilización de la presuperficie y ensamblaje del chip

El protocolo de inmovilización de la presuperficie usado en este estudio se basa en monocapa autoensamblada (SAM) de tioles mezclados sobre la superficie de oro. Este método ofrece una estabilidad a largo plazo, reproducibilidad y buena orientación de la proteína inmovilizada así como una densidad de sonda en la superficie deseada ajustando la razón de mezcla en las disoluciones de carga. La formación de una monocapa bien organizada requiere un periodo de incubación largo (~12-48 horas). Como resultado, se eligió el protocolo de inmovilización descubierto para introducir un grupo funcional biotina sobre los parches de oro estampados antes de  
25 la encapsulación del chip. Resumidamente, se incubaron los chips limpiados piraña durante la noche con una mezcla de 0,1:9,9 en moles (el 1% de BAT para modelo de unión de estreptavidina-biotina) o de 1:9 en moles (el 10% de BAT para el modelo de unión de IgG de ratón/IgG anti-ratón) de tiol terminado en biotina y 11-mercapto-1-undecanol con una concentración total de 0,5 mM en etanol absoluto, sellado bajo nitrógeno. Entonces se retiraron los sustratos, se lavaron concienzudamente en etanol, seguido por agua desionizada para eliminar compuestos de tiol en exceso y se secaron con nitrógeno.  
30

Para la encapsulación del chip, se recubrió por centrifugación una capa delgada de PDMS duro a 3000 rpm durante 30 s sobre vidrio de cubierta limpiado piraña seguido por 1 hora de curado a 75°C. El vidrio de cubierta recubierto con PDMS duro (h-PDMS) se activó mediante exposición a oxígeno plasmático (120 s, 35 W, 0,5 mbar de  $\text{O}_2$ ) y luego se colocó inmediatamente sobre una nanorendija modificada con biotina para lograr una unión covalente por  
40 medio de unión de siloxano. Entonces se coció el chip a 75°C durante 5 min y se cargaron 10  $\mu\text{l}$  de disolución de tampón de bloqueo (BSA al 1% en tampón IX PBS + Tween-20 al 0,02%) en el chip fluido mediante fuerzas capilares y se incubaron durante 3 horas para impedir la unión inespecífica de proteínas sobre zonas de dióxido de silicio y h-PDMS.  
45

Haciendo referencia a la figura 9, se muestra una presentación esquemática del conjunto del chip basado en flujo impulsado por presión. El chip fluido se coloca boca abajo en un soporte de junta realizado de aluminio. Se ubica una pieza de teflón que consiste en cuatro depósitos sobre la parte superior del chip fluido. Se usa una entrada de presión realizada de teflón para sellar todo el sistema y conectarlo a un controlador de presión con la ayuda de una  
50 junta tórica y tornillos de teflón en cada superficie de contacto para evitar fugas.

Finalmente, se montó el chip sobre el soporte fluido y se conectaron los depósitos con un sistema de controlador de presión (MFCS-8C Fluigent, Francia) para inducir el flujo de líquido. Se diseñó un soporte rígido y compacto para ensamblar el chip proporcionando la unión a los componentes fluidicos externos.  
55

#### Adquisición de datos de fluorescencia y análisis

Se obtuvieron imágenes de la cinética de unión de proteínas dentro de las nanorendijas usando un microscopio invertido (Olympus IX 70) con un instrumento iXonEM+885 EMCCD (1004x1002 píxeles activos, tamaño de píxel de 8x8  $\mu\text{m}^2$ ) de ANDOR equipado con una fuente de luz blanca (Lumencore SOLA light engine®, EE.UU.). Se adquirieron imágenes de fluorescencia con un objetivo LCPlanF1 20x/0,40 Ph1 (Olympus Optical, Japón) y conjuntos de filtros apropiados (U-MWIB3 de Olympus y U-M41008 de Chroma). Se empleó un tiempo de exposición de 1 s, usando un obturador externo (Lambda SC, Shutter Instrument) disparado por la cámara, para evitar el fotoblanqueo y se llevaron a cabo todas las mediciones a temperatura ambiente.  
60

El dispositivo fabricado tiene varios nanocanales idénticos en paralelo. Por tanto, sólo un nanocanal se considera como un inmunoensayo representativo de este sistema. La figura 2 muestra un esquema de la inmunorreacción heterogénea en un canal nanofluídico. En este trabajo, las dimensiones del nanocanal son de 450 nm de profundidad (H) y 500  $\mu\text{m}$  de longitud (L). Se ubica un parche de detector de 50  $\mu\text{m}$  de longitud que inmoviliza ligandos de captura en el centro del fondo del nanocanal. La entrada y salida se definen como la abertura del nanocanal al comienzo y al final de la geometría, excluyéndose el transporte de masa en el microcanal puesto que no hay ningún efecto sobre el perfil de velocidad de flujo dentro del nanocanal. Las moléculas de analito se introducen desde la entrada izquierda hasta la salida derecha con una velocidad de flujo ( $v$ ). Se permite que se difundan con un coeficiente de difusión (D) y se capturen por el detector con sonda inmovilizada con constantes de velocidad de asociación/disociación ( $k_a$ ,  $k_d$ ). Para los intervalos de parámetros de simulación, se usaron una concentración de analito a granel ( $C_0$ ) de 0,46-100 nM y una velocidad de flujo ( $v$ ) de 155-200  $\mu\text{m/s}$  determinada mediante análisis de perlas y cálculo teórico. Se obtuvo la densidad de sonda en la superficie eficaz ( $b_m$ ) a partir de mediciones de SPR análogas en un intervalo de  $1 \times 10^{-9}$  a  $4 \times 10^{-8}$  mol/m<sup>2</sup>. Los coeficientes de difusión (D) fueron de  $7,4 \times 10^{-11}$  m<sup>2</sup>/s para la molécula de estreptavidina (53 kDa) y  $1 \times 10^{-11}$  m<sup>2</sup>/s para IgG de ratón (150 kDa). Los intervalos de constante de velocidad de asociación  $k_a$  y constante de velocidad de disociación  $k_d$  para las interacciones de unión de estreptavidina-biotina fueron de  $1,5 \times 10^5$  a  $1,4 \times 10^6$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> y de  $1,0 \times 10^{-7}$  a  $8,8 \times 10^{-6}$  s<sup>-1</sup>, respectivamente. Los intervalos de  $k_a$  y  $k_d$  para las interacciones de unión de IgG de ratón/IgG anti-ratón fueron de  $6,0 \times 10^5$  a  $9,0 \times 10^5$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> y de  $5,0 \times 10^{-4}$  a  $7,0 \times 10^{-4}$  s<sup>-1</sup>, respectivamente. Estos intervalos de parámetros cinéticos se obtuvieron a partir de valores de la bibliografía.

#### Fabricación del dispositivo y manipulación fluidica

Los dispositivos consisten en canales microfluídicos unidos por nanocanales idénticos paralelos fabricados en oblea de silicio usando métodos sencillos y directos que incluyen fotolitografía convencional y ataque con iones reactivos. Una capa de óxido delgada formada sobre el sustrato de silicio promueve una fácil encapsulación del chip y llenado con disolución acuosa. Comparable a una medición de SPR, se eligió una superficie de oro para la inmovilización de la sonda de biorreceptor que es selectiva para moléculas de analitos diana. Se usa comúnmente elastómero de PDMS para fabricar dispositivos microfluídicos debido a sus propiedades deseables. Sin embargo, el PDMS es poco práctico para la fabricación de dispositivo nanofluídicos con alta razón de aspecto. Un PDMS duro, debido a una propiedad y funcionalidad similares a PDMS pero un polímero más reticulado o más duro, es un material alternativo que ofrece un módulo de Young 4,5 veces mayor que el de un PDMS convencional. Debido a su dureza, la deformación inducida por presión en h-PDMS puede reducirse drásticamente, conduciendo a una encapsulación de chip fluidico satisfactoria particularmente en dispositivos a nanoescala. Como resultado, se empleó un vidrio de cubierta recubierto con h-PDMS en lugar de un PDMS regular para evitar el colapso de los canales tras el sellado del dispositivo en este estudio.

Se utilizó la presión positiva generada por un sistema Fluigent a lo largo de todos los experimentos para introducir las muestras líquidas o biológicas en nanorendijas. Se eligió un método de flujo impulsado por presión puesto que puede lograrse un control del flujo preciso y una manipulación de fluidos fácil que son indispensables para un inmunoensayo. Además, es sencillo de implementar y es insensible a contaminantes de superficie, fuerza iónica y pH en comparación con flujo electrocinético. Básicamente, el chip nanofluídico se compone de dos microcanales usados para introducir líquido y conectarse al aparato de fluido externo (tubos y generador de presión) al tiempo que se usan nanocanales rectos paralelos para realizar la cinética de unión de la interacción proteica. Hay dos entradas y dos salidas situadas al final de los microcanales.

Haciendo referencia a la figura 3, en experimentos cinéticos, la primera entrada se usó para introducir la muestra líquida (disolución de analito diana) y la disolución tampón se inyectó desde la segunda entrada. Basándose en esta configuración, la presión puede aplicarse sobre ambas entradas o bien por separado o bien simultáneamente. Como resultado, puede lograrse un sensograma cinético completo (curvas de asociación y disociación) usando una manera de flujo invertido con el fin de cambiar de disolución de analito a disolución tampón sin eliminar la configuración fluidica, lo que es comúnmente poco práctico en el caso de una configuración microfluídica clásica.

#### Modelo I: modelo de unión de estreptavidina-biotina

Se investigaron la biofuncionalidad y compatibilidad de la modificación de superficie descubierta en combinación con la técnica de unión asimétrica usando reacción de estreptavidina-biotina basándose en flujo impulsado por presión dentro del dispositivo nanofluídico. Para estudiar esta interacción biomolecular específica, se suministró una disolución 100 nM de estreptavidina conjugada con Alexa Fluor 488 (ST-AF 488) a un canal modificado con tiol biotinilado al 10% cargado con un tampón de bloqueo (BSA al 1% en tampón PBS 10 mM + Tween-20 al 0,02%, pH 4) a una velocidad de flujo constante de 155  $\mu\text{m/s}$  durante 15 min. Tras enjuagar con tampón (tampón PBS 10 mM + Tween-20 al 0,05%, pH 7,4) para eliminar las moléculas de estreptavidina en exceso del canal y cualquier adsorción no específica sobre la superficie, se registraron imágenes de fluorescencia. Se observó un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia sobre los parches de detector que contenían moléculas de biotina preinmovilizadas,

mientras que el área adyacente sobre la pared del canal permanece con intensidades de fluorescencia relativamente bajas. También se realizó un experimento de control (sin biotina) sobre superficies de detector modificadas con tiol terminado en hidroxilo (un espaciador). No se observó adsorción física inespecífica significativa tras la etapa de lavado (datos no mostrados). Esto indica el reconocimiento específico entre biotina preinmovilizada y moléculas diana de estreptavidina que fluyen. Estos resultados confirman que las moléculas de sonda premodificadas mantenían su biorreactividad hacia una diana específica tras el procedimiento de encapsulación del chip, proporcionando una capacidad de detección con una alta razón de señal con respecto a ruido y adsorción inespecífica disminuida.

La interacción entre moléculas de biotina y moléculas de estreptavidina marcadas fluorescentemente que fluyen se estudió en el nanocanal modificado con tiol biotinilado. En la figura 4A se muestra la construcción de inmovilización de superficie sobre áreas de detección. Puesto que la interacción estreptavidina-biotina presenta de manera natural una afinidad extremadamente alta ( $K_d = 10^{-13}$  M), se eligió un contenido en biotina del 1% (en moles) para modificar la superficie de oro con el fin de minimizar el problema de la limitación del transporte de analito y el impedimento estérico particularmente a una alta densidad de sonda en superficie y para evitar el uso de una alta velocidad de flujo de inyección lo que a su vez potencia el consumo de reactivos. La evaluación de dos números adimensionales clave, los números de Peclet y Damköhler, desempeña un papel crucial en un diseño de biodetector de alto rendimiento. Es esencial garantizar que la información cinética obtenida a partir de la inmunorreacción es una representación verdadera de los acontecimientos de unión dentro del dispositivo nanofluidoico puesto que las constantes de unión pueden verse influidas directamente por transferencia de masa del analito diana. El número de Peclet ( $P_e$ ) de las condiciones experimentales con respecto a la velocidad de flujo y altura de canal de reacción aplicadas se calculó como próximo a la unidad ( $P_e = U_m H/D$ , donde D es el coeficiente de difusión de biomoléculas), lo que significa que el tiempo para que el analito se difunda por toda la altura del canal será igual al tiempo para que el analito se transporte sobre el detector por medio de convección. Teóricamente, todas las moléculas de analito en el canal deben tener la posibilidad de interactuar con la sonda sobre la superficie del detector, y el sistema se aproximará al límite de la recogida completa donde  $P_e < 0,5$ . Esto dilucida un alto rendimiento de detección con eficacia de unión al analito potenciada y un corto tiempo de respuesta del sistema de nanorendijas. Según el número de Damköhler calculado usando una densidad de sonda eficaz obtenida a partir de una medición de SPR análoga ( $b_m = 4 \times 10^8$  mol/m<sup>2</sup>), las reacciones cinéticas se encuentran en un régimen de reacción limitada y de difusión limitada.

Se realizaron las mediciones cinéticas tras la modificación con biotina sobre superficies de detector. Se introdujeron de manera continua disoluciones de ST-AF 488 que oscilaban en concentración entre 10 nM y 100 nM a una velocidad de flujo constante de 155  $\mu\text{m/s}$  y se permitió que se unieran con la biotina inmovilizada sobre superficies de detector. Se registraron las imágenes de fluorescencia en tiempo real para monitorizar el proceso de asociación de este acontecimiento de unión específico. Debido a la muy alta afinidad de unión y al tiempo de disociación excepcionalmente largo del sistema de reconocimiento de estreptavidina-biotina, se emplearon cuatro dispositivos diferentes para medir las constantes de unión de estreptavidina en cada concentración.

Se normalizaron las intensidades de fluorescencia y se ajustaron con los datos simulados logrados a partir del modelo de elementos finitos. En la figura 5A se muestran las respuestas de detector relativas de la unión de estreptavidina-biotina a diversas concentraciones ajustadas con un modelo de simulación. Se observó que los datos experimentales de la unión de estreptavidina a baja concentración (10-50 nM) se ajustaban bien a los datos de la simulación con R-cuadrado en un intervalo de 0,99. No obstante, una alta concentración de estreptavidina (100 nM) muestra un ajuste relativamente malo con los resultados de la simulación (R-cuadrado = 0,95). Esto podría deberse a varios motivos pronunciados a una alta concentración de analito incluyendo impedimento estérico, heterogeneidad de la superficie, unión no específica, desviación del modelo de interacción 1:1, etc. Para determinar la afinidad de unión basándose en un modelo computacional, se extrajeron las constantes de velocidad de asociación y disociación en cada concentración a partir del mejor ajuste de las curvas de unión predichas a los datos experimentales (figura 10). Se determinó que la constante de velocidad de asociación promedio ( $k_a$ ) era de  $7,1 \times 10^5$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> y se observó una constante de velocidad de disociación ( $k_d$ ) de  $0,80 \times 10^{-6}$  s<sup>-1</sup> a partir del mejor ajuste para todas las concentraciones. Adicionalmente, también se aplicó una velocidad de disociación inferior en el modelo de simulación, pero no hubo ningún cambio en las respuestas del detector. Como resultado, la constante de disociación ( $K_D$ ) para la interacción estreptavidina-biotina puede estimarse como  $K_d \leq 1,2 \times 10^{-12}$  M.

También se investigó el efecto de diversas velocidades de flujo que oscilan entre 155-465  $\mu\text{m/s}$  (asociadas al número  $P_e$  en el intervalo de 0,94-2,8) sobre la cinética de unión, sin embargo las respuestas del detector no mostraron ninguna diferencia significativa, indicando ausencia de limitación de transporte de masa tal como se esperaba. Por tanto, la constante de unión también puede determinarse usando un modelo "bien mezclado" sencillo, suponiendo una interacción de primer orden biomolecular sencilla. La unión del analito a la superficie del detector con una constante de velocidad de asociación  $k_a$  y una constante de velocidad de disociación  $k_d$  viene dada por b

$$C_b = \frac{k_a C_{\max} C (1 - e^{-(k_a C + k_d)t})}{k_a C + k_d}$$

donde C es la concentración de analito en disolución a granel,  $C_b$  es la concentración del complejo unido sobre la superficie y  $C_{\max}$  es la densidad de sonda o sitios de unión sobre la superficie, lo que implica que es el valor máximo de  $C_b$ . Este modelo se define como modelo "bien mezclado" que supone que la cinética de detección está limitada por la velocidad de reacción y la concentración de analito es constante y uniforme en todas partes por encima de la superficie del detector. La constante de tiempo aparente viene dada por  $K_{ap} = k_a C + k_d$  que puede derivarse ajustando las curvas cinéticas a la ecuación 8. En la figura 5B se muestra un gráfico de la constante de tiempo aparente en función de la concentración de analito diana. Se observa que la constante de tiempo aparente aumenta con el aumento de la concentración de analito. El gráfico proporcionó un ajuste lineal con una pendiente de 0,0003 y R-cuadrado de 0,9903. Una pendiente derivada de 0,0003  $\text{nM}^{-1}\text{s}^{-1}$  da como resultado una constante de velocidad de asociación  $k_a$  de  $3,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Este valor de  $k_a$  derivado concuerda bien con el valor extraído a partir del modelo de elementos finitos y está dentro del intervalo notificado en la bibliografía basada en una plataforma microfluidica, lo que confirma la validez del modelo computacional cinético para predecir las respuestas de unión de interacciones biospecíficas.

#### Modelo II: modelo de unión de IgG de ratón/IgG anti-ratón

Para validar adicionalmente el modelo cinético, se considera inmunoglobulina G de ratón (IgG) e IgG anti-ratón como otro par de proteína-receptor. En la figura 4B se describe el diagrama de la arquitectura de superficie usada en el estudio cinético para este modelo. Puentes de estreptavidina-biotina están ampliamente implicados en la estrategia de inmovilización de superficie de proteína y chips de ADN debido a su robustez frente a la temperatura y el pH. En este estudio, se empleó una superficie modificada con tiol biotinilado al 10% para obtener una cobertura de superficie completa de la monocapa de estreptavidina que maximiza los sitios de unión de biotina expuestos para receptores biotinilados adicionales tal como se notificó en otra parte. Generalmente, las moléculas de estreptavidina actúan como elementos estructurales en el ensamblaje de la sonda de captura monomolecular organizada, permitiendo un anclaje óptimo de las moléculas de sonda biotiniladas con adsorción inespecífica minimizada de otras biomoléculas tales como inmunoglobinas (IgG) o albúmina sérica humana (HSA). Esta química de superficie optimizada es crucial para los rendimientos del biodetector.

Tras la biotinilación de la superficie, se funcionalizó la estreptavidina sobre una capa de SAM biotinilada introduciendo una disolución 100 nM de ST-AF 488 a una velocidad de flujo constante de 155  $\mu\text{m/s}$  durante 15 min hasta que se logró la saturación, seguido por una etapa de lavado con tampón. Posteriormente, se sometió el detector a IgG de ratón anti-conejo biotinilada (100 nM en tampón PBS) durante 15 min y se enjuagó con disolución tampón durante 5 min. Se realizaron las mediciones cinéticas introduciendo diversas concentraciones de analito diana de IgG de ratón anti-conejo conjugada con Alexa Fluor-647 (mIgG-AF 647) (diluido en tampón PBS) que oscilan entre 0,46 y 15 nM en un chip de detector modificado con IgG anti-ratón bajo velocidad de flujo continua de 200  $\mu\text{m/s}$ . Se permitió que la IgG de ratón unida se disociara del receptor de superficie mediante la inyección de una disolución tampón pura por medio de una manera de flujo invertido. Se registraron las imágenes de fluorescencia en tiempo real para monitorizar los procesos de asociación y disociación dentro de la nanorendija (figura 6A). En este estudio, se fijó el tiempo de asociación igual para todas las concentraciones de diana permitiendo un análisis global usando el paquete de software BIAevaluation. Se regeneró la superficie del detector inyectando la disolución de glicina-HCl 10 mM pH 2,0 durante un corto periodo de tiempo y se enjuagó concienzudamente con disolución tampón antes de realizar el siguiente ciclo de medición. Adicionalmente, se introdujo un analito diana irrelevante (IgG de cabra anti-conejo con Alexa Fluor-600) en la nanorendija con IgG anti-ratón inmovilizada para verificar la interacción inespecífica, sin embargo, no se observó ningún aumento significativo en la intensidad de fluorescencia.

Se normalizaron entonces los datos cinéticos resultantes y se ajustaron con tres modelos diferentes: i) simulación de elementos finitos, ii) modelo bien mezclado y iii) ajuste global-local mediante el software BIAevaluation (figura 6B). Basándose en el modelado computacional de elementos finitos, se determinaron las constantes de velocidad de unión a partir del mejor ajuste de las curvas cinéticas predichas a los datos experimentales por medio del coeficiente de determinación. Puede observarse que el modelo cinético simulado describe bien el ensayo de inmunorreacción en nanorendija ya que cada curva de unión experimental se ajustó de manera precisa (R-cuadrado en un intervalo de 0,99). Se determinó que la constante de velocidad de asociación ( $k_a$ ) promedio era de  $8,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  y se logró una constante de velocidad de disociación ( $k_d$ ) de  $6,2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , proporcionando una constante de disociación en equilibrio  $K_D$  de 0,77 nM. Además, también se investigó el efecto de la velocidad de flujo sobre la cinética de unión, pero las respuestas del detector no mostraron ningún cambio significativo, indicando la ausencia de limitación de transporte de masa. Por consiguiente, los datos experimentales se ajustaron posteriormente al modelo analítico 'bien mezclado' con el método de mínimos cuadrados no lineal y se representó gráficamente la constante de tiempo aparente ( $K_{ap}$ ) en función de la concentración de analito, proporcionando un buen ajuste con R-cuadrado de 0,9959 (figura 6C). Se estimó la desorción del analito unido del receptor de superficie usando un decaimiento exponencial

de primer orden. Esto da como resultado las constantes de velocidad de asociación y disociación de  $6,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y  $5,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , respectivamente. Finalmente, se examinaron los datos cinéticos usando un análisis global-local a partir del software BIAevaluation. Comparable a la simulación, se encontró el mejor ajuste usando un modelo de unión 1:1 de Langmuir. Se determinó que los valores promedio de  $k_a$  y  $k_d$  eran de  $12 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  con SE de  $2,0 \times 10^4$  y  $5,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  con SE de  $1,8 \times 10^{-5}$ , respectivamente, apoyando la validez del modelo de elementos finitos para una buena descripción cuantitativa de los datos cinéticos.

Para evaluar adicionalmente la plataforma, se realizó una medición cinética en tiempo real análoga de IgG de ratón/IgG anti-ratón usando una configuración de resonancia de plasmón superficial. En la figura 6D se muestran sensogramas que contienen información cinética de estos acontecimientos de unión a diversas concentraciones que oscilan entre 1,6 y 26 nM. Se utilizó el análisis global para identificar el modelo de unión y cuantificar los parámetros cinéticos usando el paquete de software BIAevaluation. Se encontró el mejor ajuste para todos los datos con un modelo de Langmuir 1:1 sin influencia del transporte de masa, proporcionando  $k_a$  y  $k_d$  de  $7,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  con SE de  $3,0 \times 10^3$  y  $1,9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , con SE de  $8,0 \times 10^{-6}$ , respectivamente. Además, también se realizaron mediciones cinéticas repetidas a diferentes densidades de sonda en superficie inmovilizada para garantizar la exactitud de los parámetros cinéticos determinados a partir de los datos de unión. Las constantes de velocidad de unión estimadas eran todavía consistentes. En resumen, la plataforma de biodetector basado en nanorendijas proporcionó constantes cinéticas que concuerdan bien con la medición de SPR y en el intervalo con valores de la bibliografía (tabla 1), extendiendo por tanto la validez del modelo para cuantificar de manera precisa la cinética de unión de interacciones biomoleculares.

Tabla 1 Comparación de la constante de velocidad de asociación ( $k_a$ ) para la unión de estreptavidina-biotina y la unión de IgG/anti-IgG obtenida a partir de la plataforma nanoflúidica biofuncional, SPR y la bibliografía.

Tabla 1

Modelo de unión	Biodetector de nanorendijas ( $\times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )			SPR ( $\times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	Bibliografía ( $\times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )
	FEM	Bien mezclado	Global-local		
Estreptavidina-biotina	7,1	3,0	N/A	N/A	4,4-450
IgG/IgG anti-ratón	8,0	6,0	12	7,3	2,5-13

#### Determinación del límite de detección

Para garantizar que el dispositivo puede emplearse no sólo para investigar la cinética de unión de interacciones proteína-ligando sino que también puede aplicarse como inmunodetector sobre chip altamente sensible y rápido, el límite de detección (LOD) es otra característica de rendimiento importante para la validación. En este estudio, se determinó el límite de detección introduciendo diferentes concentraciones de disoluciones de analito diana mIgG-AF 647 en una nanorendija modificada con IgG anti-ratón y se registró la intensidad de fluorescencia. Los cambios de intensidad de fluorescencia con la introducción de analito diana en función del tiempo se representan gráficamente en la figura 7. No se observó ningún cambio significativo en la intensidad de fluorescencia cuando se inyectó una disolución tampón libre de analito, mientras que la introducción de 1 pM dio como resultado un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia tras 30 min ( $S/N \sim 3$ ). Con un volumen de muestra de 10,5 nL, puede determinarse un límite de detección en moles como de 10 zeptomoles. Notablemente, aumentando la concentración de analito hasta 10 pM, el detector puede detectar fácilmente la señal de respuesta de unión en el plazo de 5 min. El valor de límite de detección obtenido a partir del sistema para la detección de IgG de ratón es significativamente mejor que o comparable a los formatos de inmunodetección microfluídicos existentes. Adicionalmente, este inmunodetector sobre chip muestra buena repetibilidad con una desviación estándar del 2,28% a la concentración de analito de 5 nM (figura 11). Además, el tiempo de inmunoensayo total (incluyendo las etapas de inyección, inmovilización y detección) requerido para la detección de IgG de ratón basándose en la unión estreptavidina-biotina para la inmovilización de IgG anti-ratón se encontró que era de aproximadamente 40 min en el estudio mientras que el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) tradicional tarda de horas a días en completar el ensayo completo. Por tanto, el enfoque también demuestra una plataforma de inmunodetección rápida y sensible para la detección de proteínas con bajo consumo de reactivos, indicando un gran potencial en diagnóstico clínico.

La presente invención proporciona un dispositivo de detección y un método de detección que son de manera práctica unas rendijas nanoflúidicas biofuncionalizadas aplicadas con técnicas de microscopía de fluorescencia clásicas, proporcionando una plataforma de biodetección sencilla, de bajo coste pero eficaz para estudios cinéticos. El dispositivo de detección incluye un canal cuya profundidad se reduce hasta el intervalo submicrométrico, proporcionando así las siguientes ventajas de la presente invención: (1) la reducción drástica de la longitud de difusión permite funcionar en un régimen de reacción limitada con eficacia de captura de la diana optimizada. Por tanto, todas las moléculas de analito inyectadas en el dispositivo se analizan, y el estudio de disociación puede implementarse de manera sencilla tras la finalización de la fase de asociación reservando el flujo de fluido dentro del canal en lugar de inyectar nuevo tampón en la entrada, lo que da como resultado un protocolo de funcionamiento simplificado y un tiempo de análisis reducido; (2) la reducción del volumen de muestreo permite que el dispositivo

5 explore directamente la superficie de detección con microscopios de fluorescencia convencionales sin la necesidad de usar configuraciones complicadas y caras, tales como SPR, TIRFM o QCM; (3) la razón de señal con respecto a ruido es inversamente proporcional a la altura del canal: canales submicrométricos ofrecen por tanto una razón de señal con respecto a ruido de al menos 100 en una escala grande de constante de disociación  $K_D$ , desde el intervalo pM hasta sub- $\mu$ M, que incluye la mayoría de las moléculas de interés.

10 Además, el dispositivo de detección y el método de detección de la presente invención permiten un área de muestreo grande de varios píxeles garantizando errores estadísticos mucho más reducidos (mayor precisión) que plataformas de detección no resueltas espacialmente. De manera más importante, la microscopía de fluorescencia ofrece un límite de detección bajo el pM sin efecto de la masa del analito, permitiendo por tanto el dispositivo de detección y el método de detección interacciones de muy alta afinidad y moléculas pequeñas.

15 La presente invención soluciona los problemas de la técnica anterior proporcionando: (1) un tiempo de ensayo cinético acortado debido a la operación de flujo invertido al tiempo que puede lograrse un mayor nivel de sensibilidad de detección con una configuración muy sencilla, (2) una captura de la diana eficaz para análisis de muestras minúsculas y (3) cinética de reacción/unión resulta espaciotemporalmente que permite un bajo error estadístico.

## REIVINDICACIONES

1. Dispositivo (1) de detección adaptado para aplicarse a una molécula de analito de una muestra líquida y un tampón, que comprende:
  - 5 al menos una primera entrada (15), para introducir la muestra líquida;
  - al menos una segunda entrada (16), para introducir el tampón;
  - 10 un canal de microflujo (C), que se comunica con la primera entrada (15) y la segunda entrada (16); y
  - al menos un elemento (12) de inmovilización adaptado para inmovilizar una molécula (13) de detección para la molécula de analito en el canal de microflujo (C),
  - 15 en el que la molécula (13) de detección puede generar una reacción de asociación con la molécula de analito de la muestra líquida, y generar una reacción de disociación con la molécula de analito y el tampón en sentido inverso,
  - 20 en el que la molécula (13) de detección y la molécula de analito de la muestra líquida pueden generar la reacción de asociación tras fluir la muestra líquida al interior del canal de microflujo (C),
  - en el que entonces la molécula (13) de detección y la molécula de analito pueden generar la reacción de disociación tras fluir el tampón de manera inversa al interior del canal de microflujo (C), y
  - 25 en el que el canal de microflujo (C) tiene dos extremos que están conectados respectivamente a la primera entrada (15) y la segunda entrada (16), concretamente el canal de microflujo (C) está entre la primera entrada (15) y la segunda entrada (16).
- 30 2. Dispositivo (1) de detección según la reivindicación 1, en el que el canal de microflujo (C) tiene una longitud suficiente para que la reacción de asociación de la molécula (13) de detección y la molécula de analito pueda observarse.
3. Dispositivo (1) de detección según la reivindicación 1, en el que la reacción de asociación de la molécula (13) de detección y la molécula de analito presenta fluorescencia.
- 35 4. Dispositivo (1) de detección según la reivindicación 1, que comprende además:
  - 40 un sustrato, que tiene una pluralidad de ranuras correspondientes a la primera entrada (15), la segunda entrada (16) y el canal de microflujo (C); y
  - una cubierta, que se orienta hacia las ranuras y se combina con el sustrato, en el que la cubierta y las ranuras forman la primera entrada (15), la segunda entrada (16) y el canal de microflujo (C),
  - 45 en el que el elemento (12) de inmovilización se dispone sobre la ranura correspondiente al canal de microflujo (C).
- 50 5. Dispositivo (1) de detección según la reivindicación 4, en el que el material del sustrato comprende silicio, dióxido de silicio, vidrio y/o plásticos, el material de la cubierta comprende polidimetilsiloxano, polidimetilsiloxano duro, polisilsesquioxano (PSQ) y/o plásticos en forma desnuda o recubiertos sobre un portaobjetos de vidrio, y el elemento (12) de inmovilización se forma mediante tratamiento de superficie sobre el sustrato con parche de oro, vidrio o plásticos.
- 55 6. Dispositivo (1) de detección según la reivindicación 4, en el que la muestra líquida fluye a lo largo de un primer sentido que se extiende desde la primera entrada (15) hasta la segunda entrada (16), y el intervalo de la longitud del canal de microflujo (C) entre la primera entrada (15) y la segunda entrada (16) es de entre 100  $\mu\text{m}$  ~ 5 cm, el intervalo de la distancia promedio entre el sustrato y la cubierta es de entre 50 nm ~ 10  $\mu\text{m}$  y el intervalo de la longitud del elemento (12) de inmovilización en el primer sentido es de entre 1  $\mu\text{m}$  y la totalidad de la longitud de canal de microflujo.
- 60 7. Dispositivo (1) de detección según la reivindicación 1, que comprende además: un recipiente, que se comunica con la segunda entrada (16) para almacenar el tampón.
8. Dispositivo (1) de detección según la reivindicación 1, en el que el canal de microflujo (C) comprende una pluralidad de nanorendijas.

9. Sistema de detección, que comprende:
- 5 un dispositivo (1) de detección como en una cualquiera de las reivindicaciones 1-8;
- un generador de flujo, que se conecta con la primera entrada (15) y la segunda entrada (16);
- 10 una unidad de control de flujo, que controla el generador de flujo para generar flujo desde la primera entrada (15) hasta la segunda entrada (16) para impulsar la muestra líquida o el tampón para que fluya al interior del canal de microflujo (C);
- una unidad de captura, adaptada para captar al menos una imagen del canal de microflujo (C); y
- 15 una unidad de computación, adaptada para generar un resultado de detección según la imagen.
10. Sistema de detección según la reivindicación 9, en el que el generador de flujo incluye uno o más de los siguientes: bomba de presión o bomba de capilaridad para flujo impulsado por presión, flujo inducido por gradiente térmico, o bomba electrocinética para flujo electroosmótico.
- 20 11. Sistema de detección según la reivindicación 9, en el que la unidad de captura está adaptada para captar primeras imágenes de periodos de tiempo del canal de microflujo (C) para la reacción de asociación y para captar segundas imágenes de periodos de tiempo del canal de microflujo (C) para la reacción de disociación, y la unidad de computación está adaptada para utilizar cinética de asociación y cinética de disociación para generar el resultado de detección según las primeras imágenes de periodos de tiempo y las segundas imágenes de periodos de tiempo.
- 25 12. Método de detección aplicado al dispositivo (1) de detección como en una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende:
- 30 impulsar la muestra líquida al interior del canal de microflujo (C) desde la primera entrada (15) para asociar la molécula de analito de la muestra líquida con la molécula (13) de detección;
- impulsar el tampón al interior del canal de microflujo (C) desde la segunda entrada (16) para disociar la molécula de analito de la molécula (13) de detección; y
- 35 generar un resultado de detección como sensograma, según el resultado de asociación y el resultado de disociación.
- 40 13. Método de detección según la reivindicación 12, en el que la etapa de generación comprende además:
- obtener una información de cinética de asociación según el resultado de asociación;
- obtener una información de cinética de disociación según el resultado de disociación; y
- 45 obtener el resultado de la detección según la información de cinética de asociación y la información de cinética de disociación.
14. Método de detección según la reivindicación 12, en el que la etapa de generación comprende además:
- 50 analizar una intensidad de fluorescencia a partir del resultado de asociación para obtener una información de cinética de asociación;
- analizar otra intensidad de fluorescencia a partir del resultado de disociación para obtener una información de cinética de disociación;
- 55 obtener el resultado de detección según la información de cinética de asociación y la información de cinética de disociación.
- 60 15. Método de detección según una de las reivindicaciones 12-14, que comprende además:
- impulsar una disolución de regeneración al interior del canal de microflujo (C);
- enjuagar el canal de microflujo (C) con la disolución de regeneración; y
- retirar la disolución de regeneración del canal de microflujo (C).

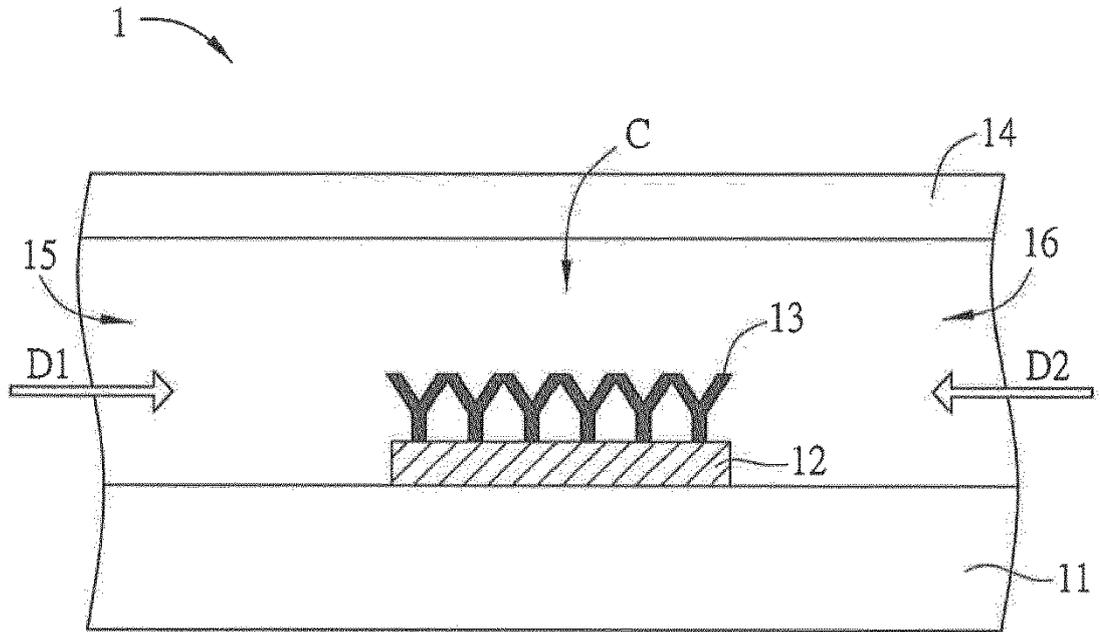


FIG.1A

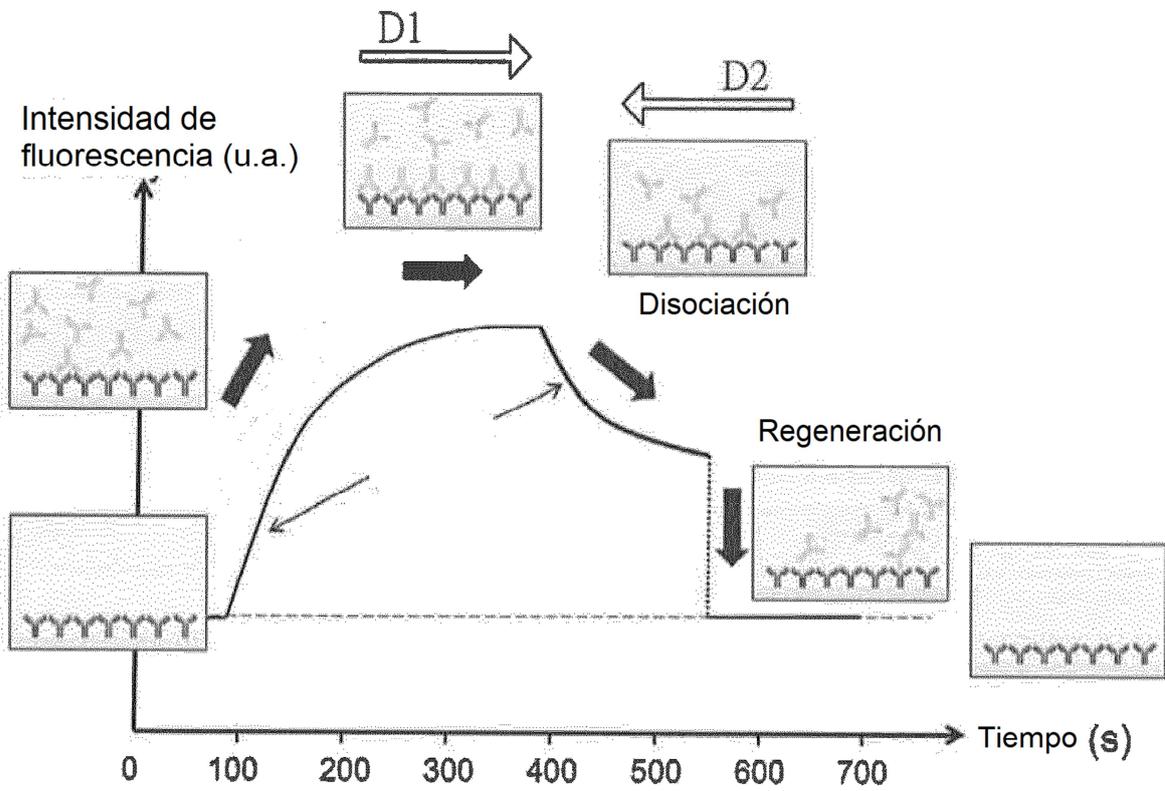


FIG.1B

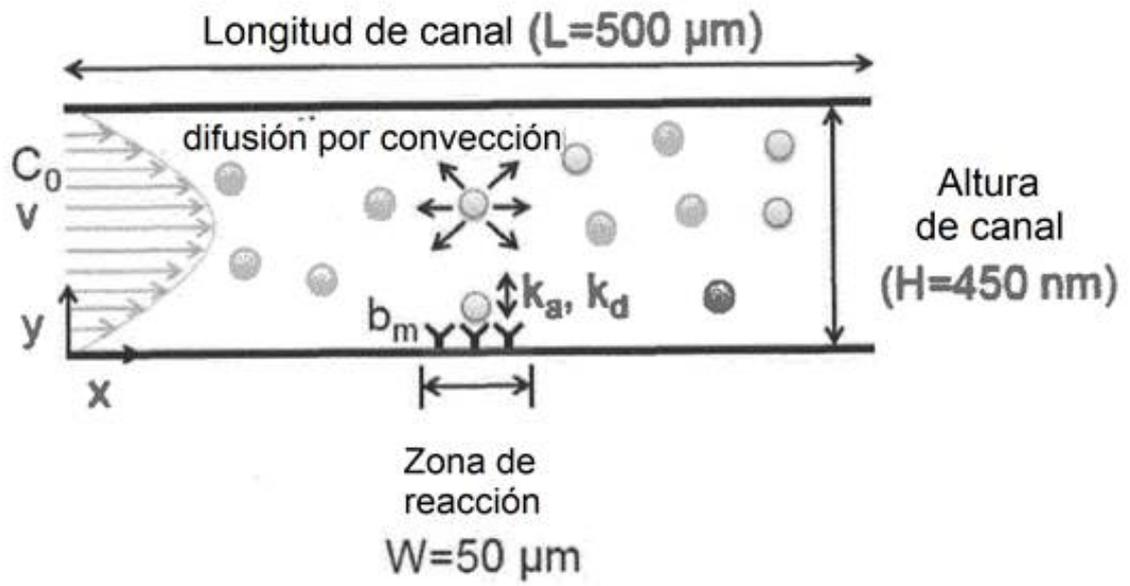


FIG.2

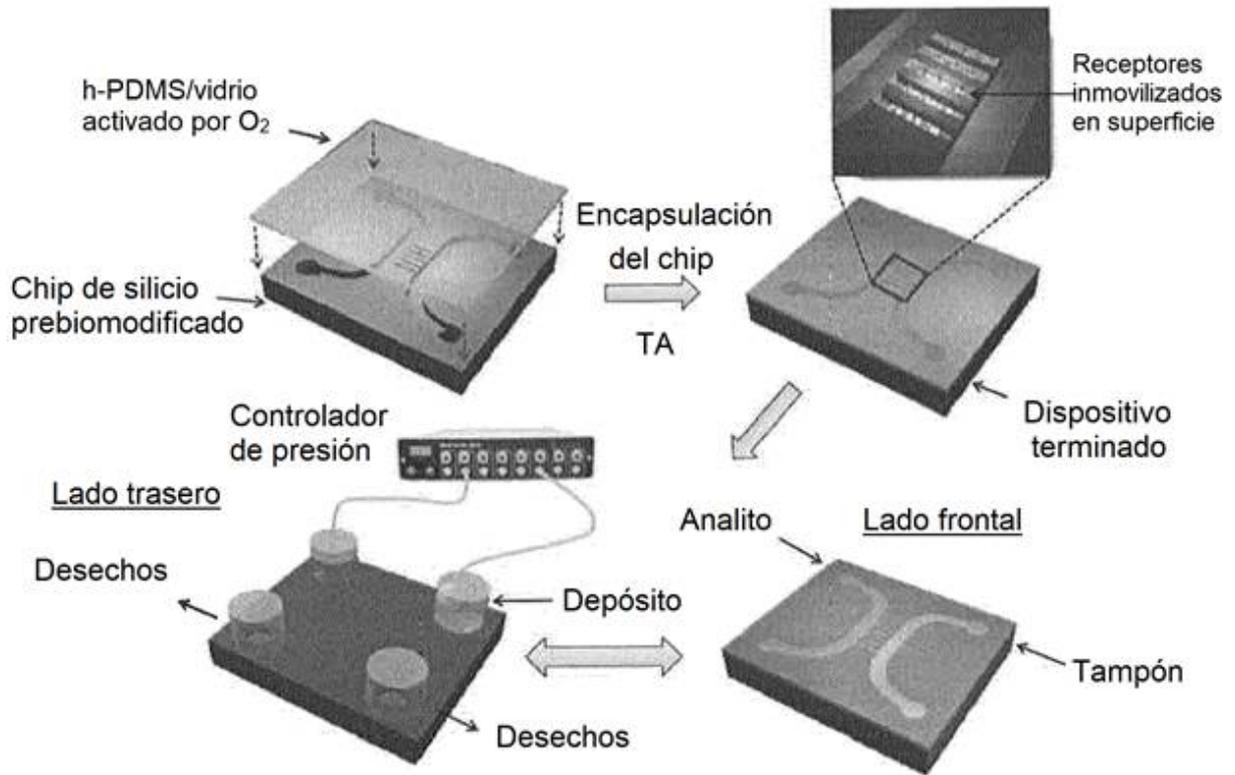


FIG.3

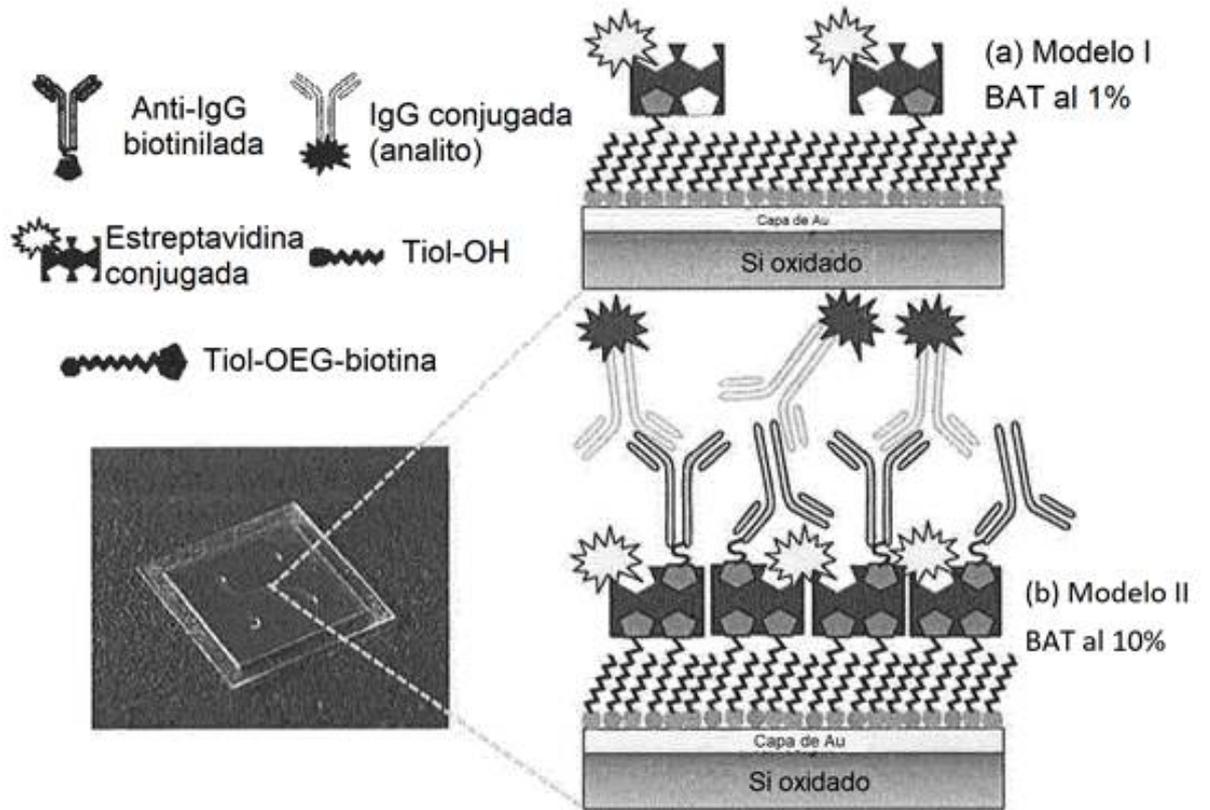


FIG.4

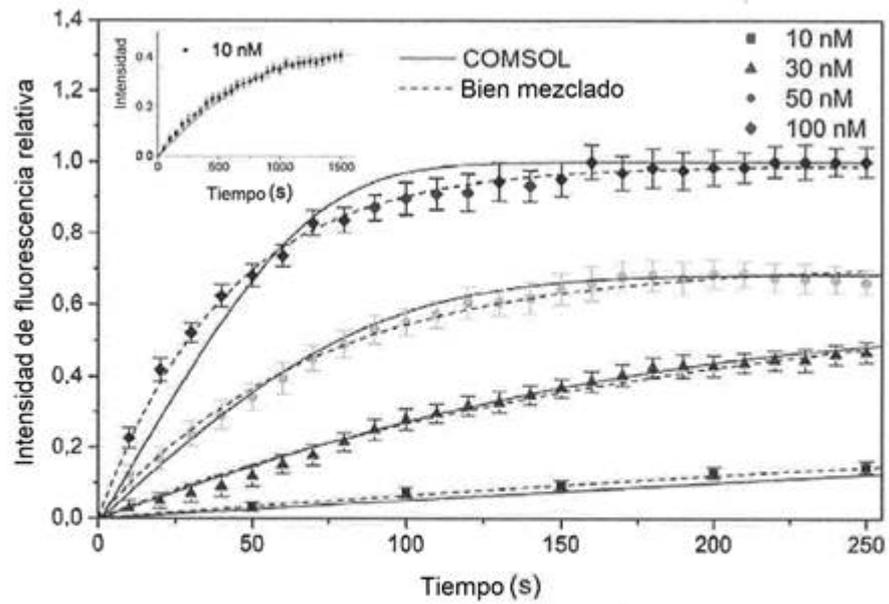


FIG.5A

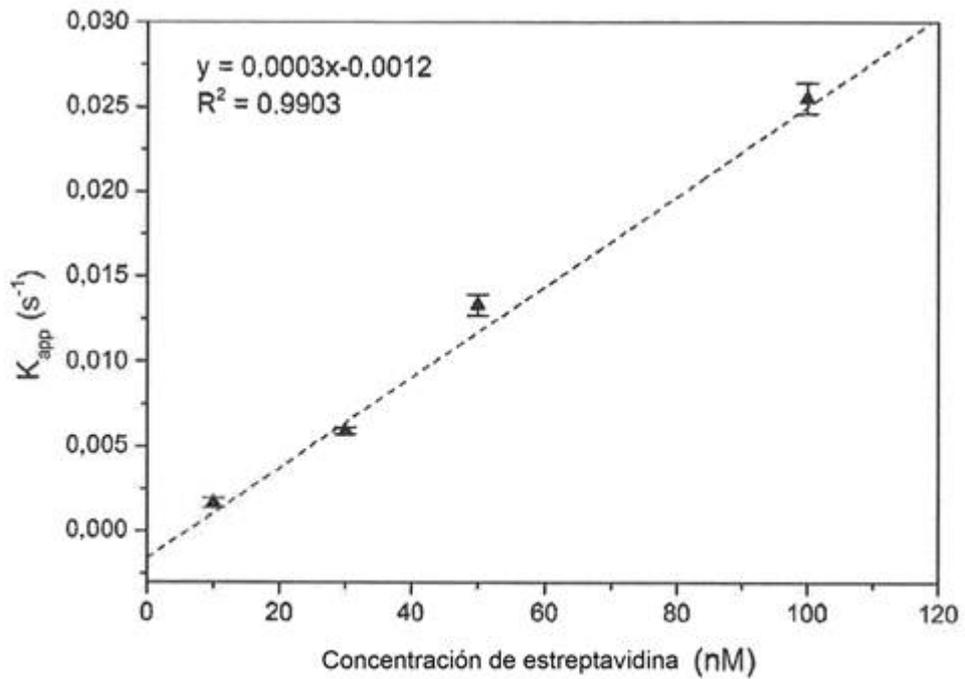


FIG.5B

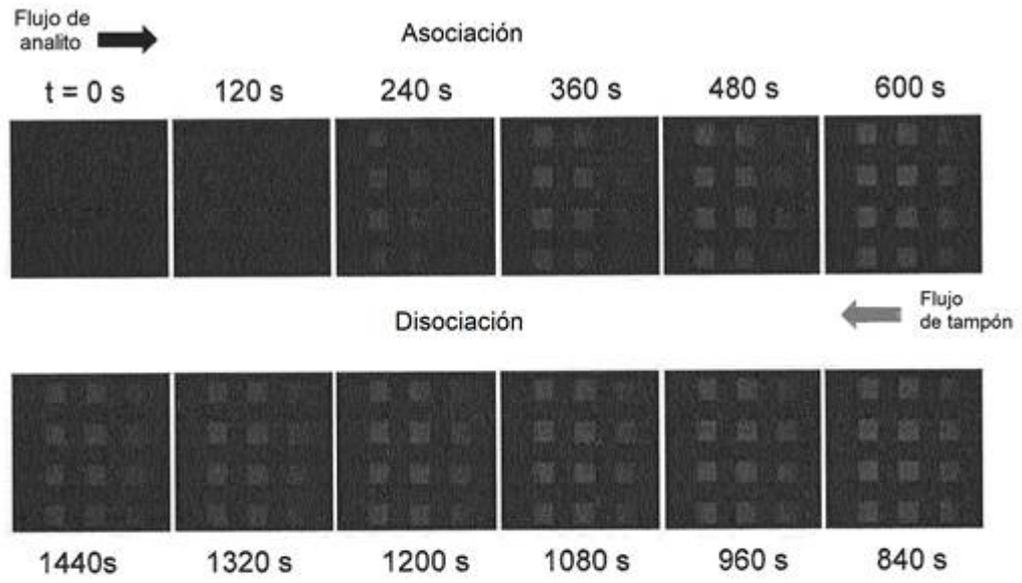


FIG.6A

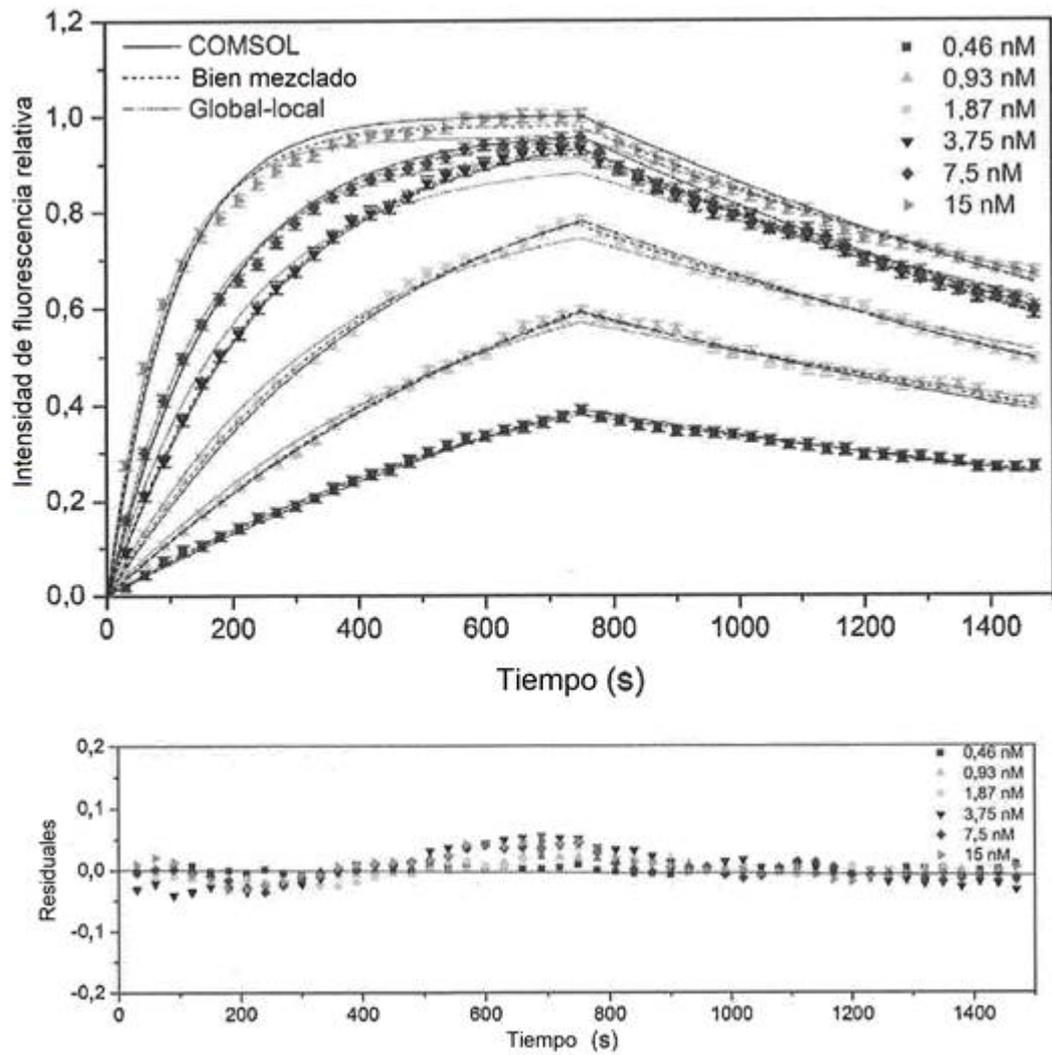


FIG.6B

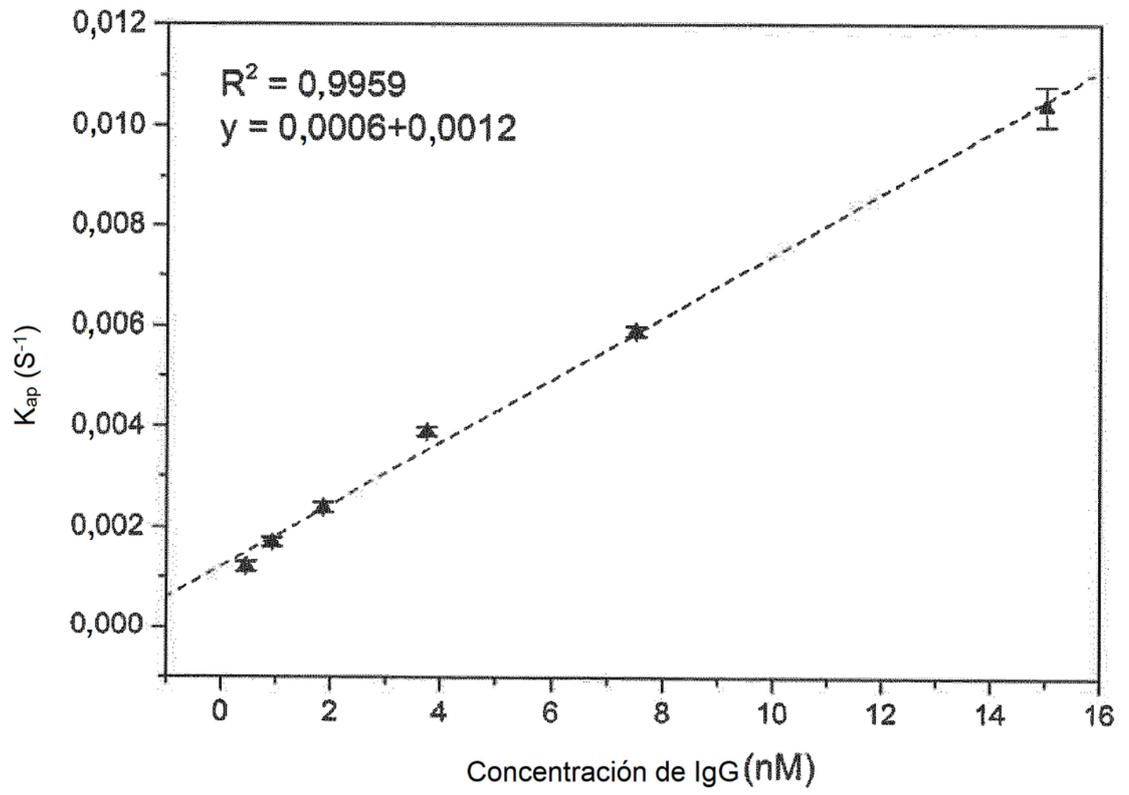


FIG.6C

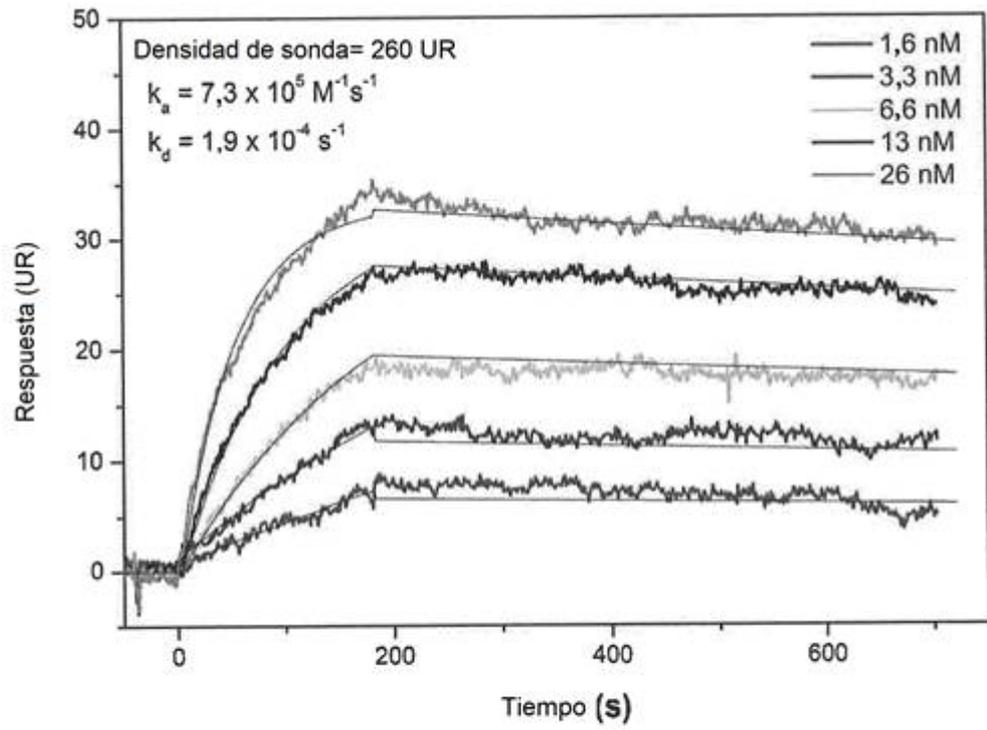


FIG.6D

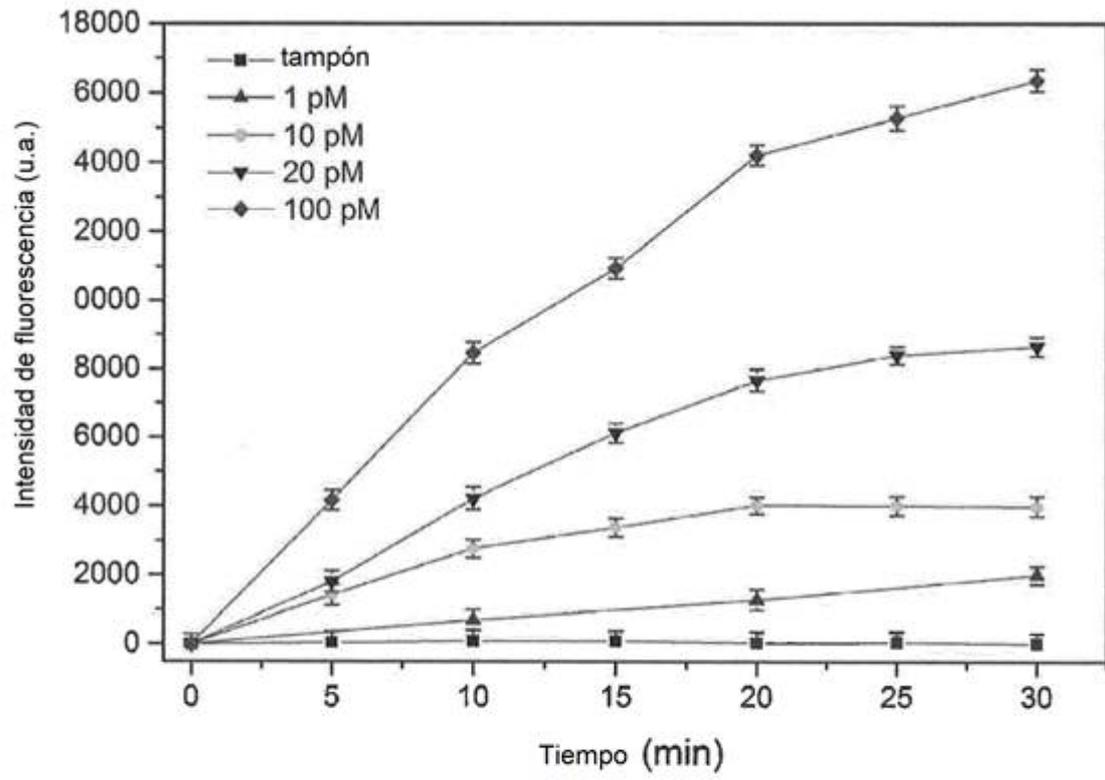


FIG.7

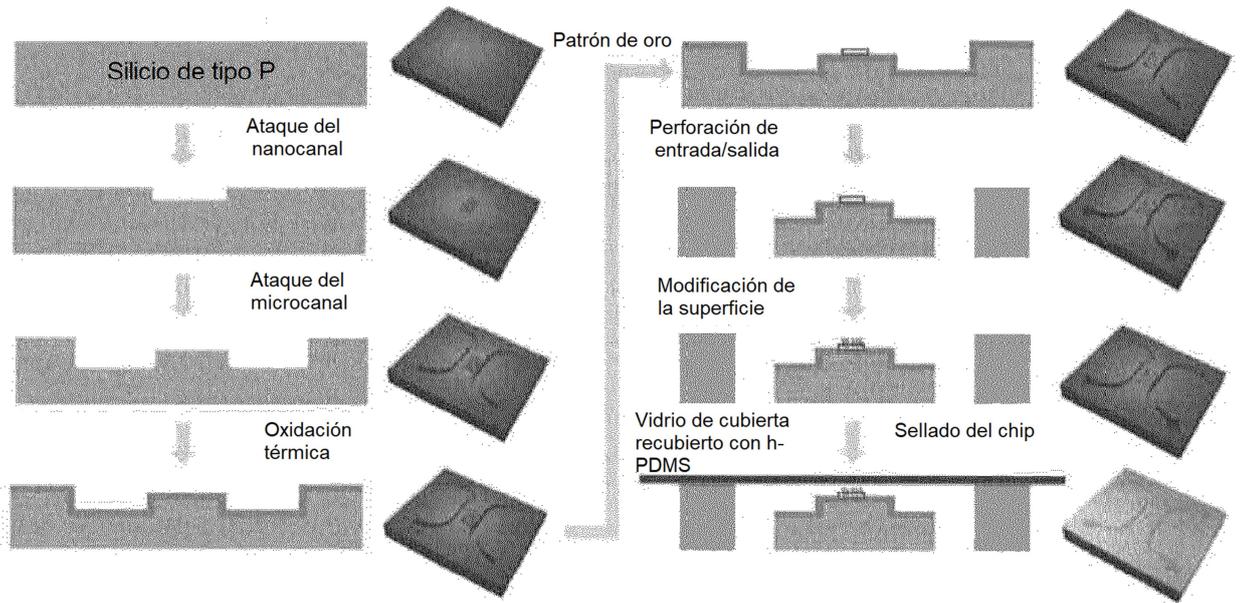


FIG.8

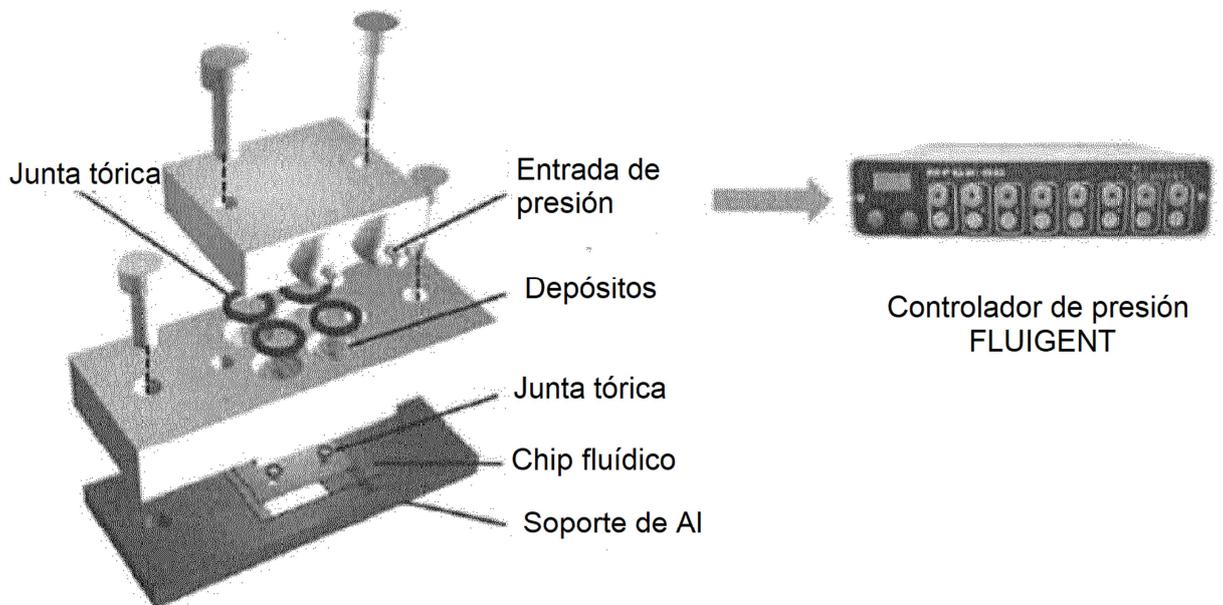


FIG.9

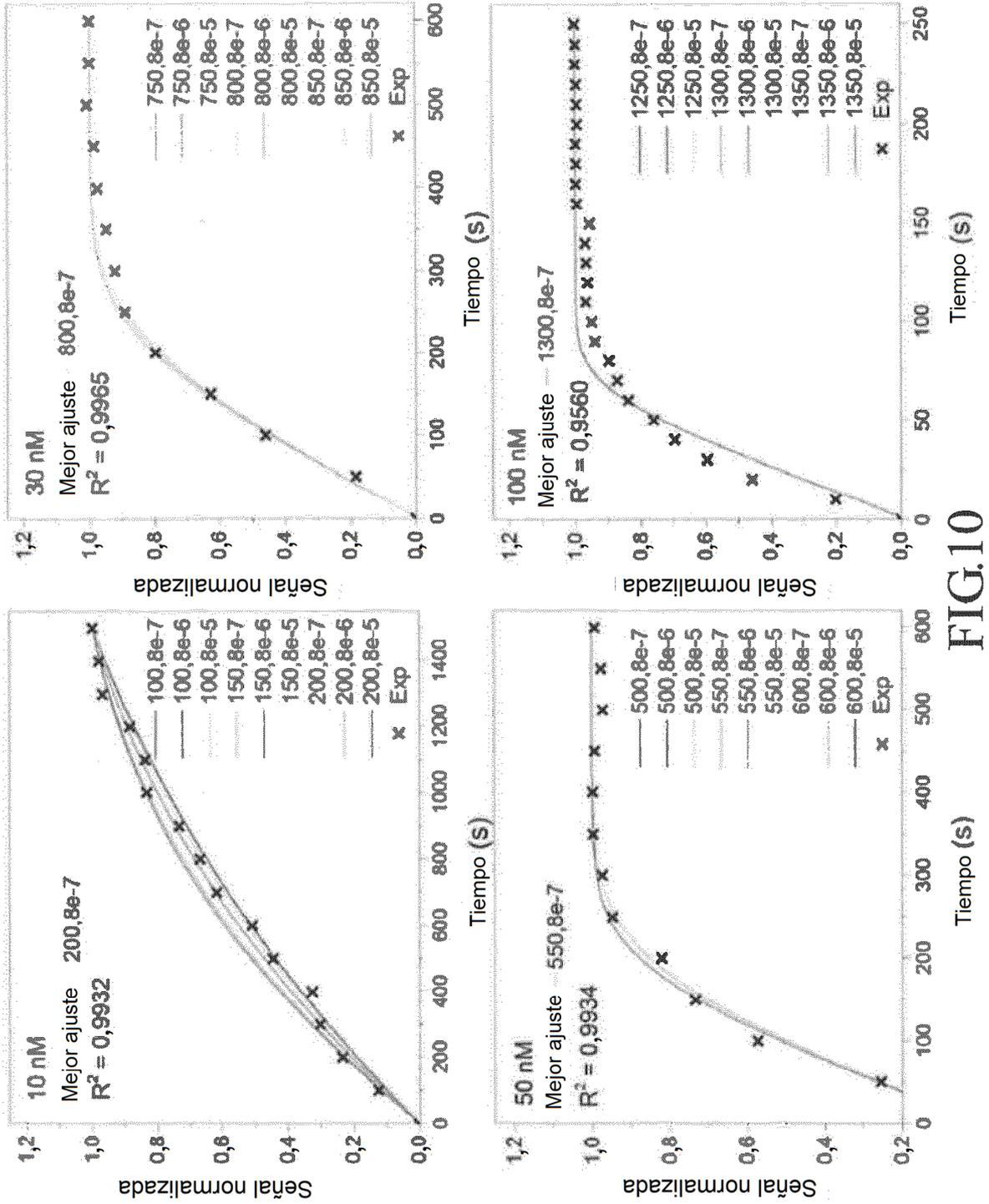


FIG.10

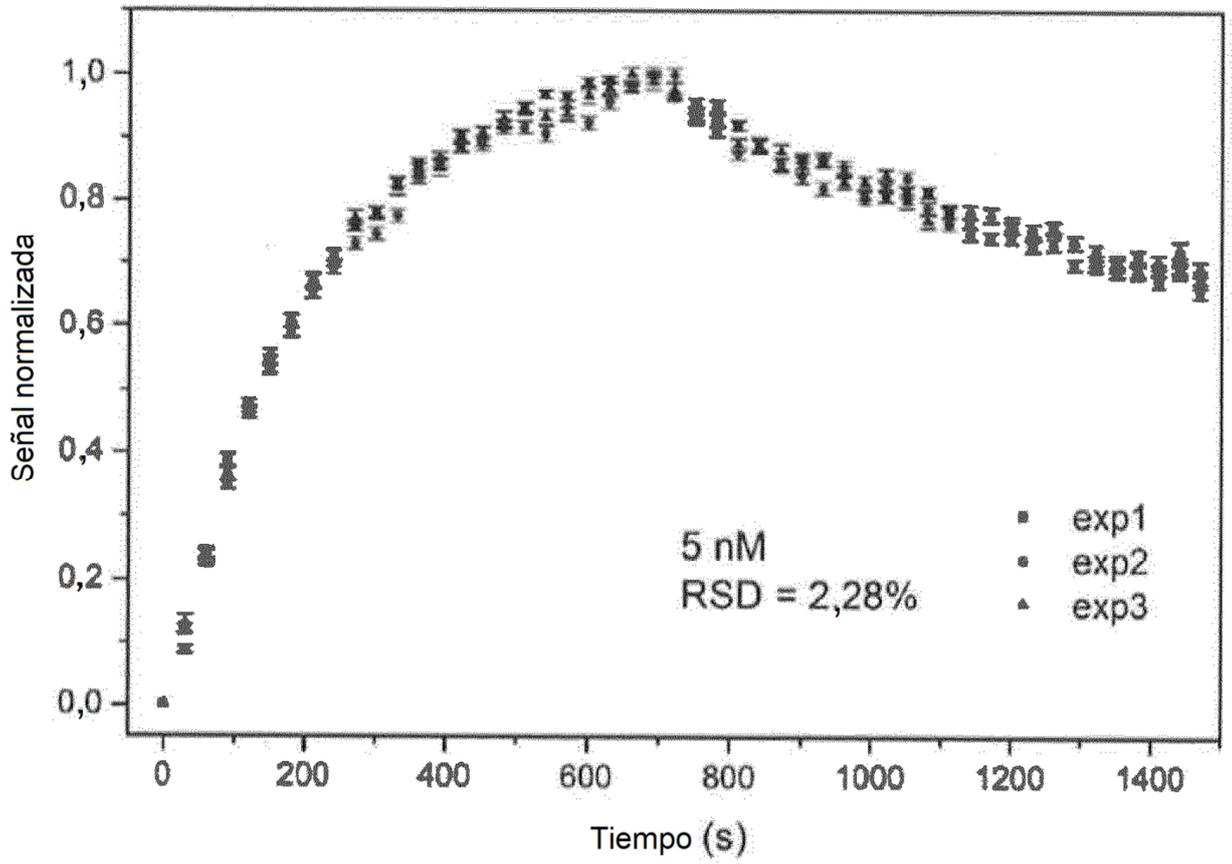


FIG.11