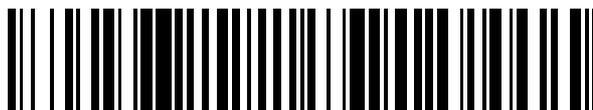


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 361**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

B82Y 35/00 (2011.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

B82Y 15/00 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.07.2014 PCT/EP2014/064482**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.01.2015 WO15007559**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2014 E 14737223 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018 EP 3021968**

54 Título: **Método y dispositivo para bioensayos**

30 Prioridad:

17.07.2013 EP 13176794

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

28.02.2019

73 Titular/es:

**ABIONIC SA (100.0%)
Biopôle, Esplanade SE-A, Route de la Corniche 3
1066 Epalinges, CH**

72 Inventor/es:

**DURAND, NICOLAS;
MÄRKI, IWAN;
MAYOR, ANNICK y
BROILLET, STÉPHANE**

74 Agente/Representante:

ZUAZO ARALUZE, Alexander

ES 2 702 361 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

MÉTODO Y DISPOSITIVO PARA BIOENSAYOS**5 Campo de invención**

La presente invención se refiere a un método y a un dispositivo para la detección de diversas biomoléculas marcadas de manera fluorescente en biosensores nanofluídicos funcionalizados de manera selectiva, por medio de un sistema óptico. La presente invención puede, por ejemplo, usarse ventajosamente para la cuantificación rápida de muestras biomédicas y biológicas.

Antecedentes de la invención

Los biosensores nanofluídicos son sistemas fluídicos con aberturas laterales y/o confinamientos de tamaño nanométrico, que se usan para cuantificar la presencia de biomoléculas en una disolución. La mayoría de desarrollos de biosensor nanofluídico se destinan para aplicaciones de bioingeniería y biotecnología. En el alcance de esta invención, los biosensores se usan, por ejemplo, para cuantificar la presencia de biomoléculas en una disolución para aplicaciones de diagnóstico *in vitro*.

La solicitud de patente suiza CH 01824/09 da a conocer biosensores con aberturas laterales para la detección de interacciones biomoleculares, la solicitud PCT WO 2011/107916 da a conocer el uso de tales biosensores con sistemas ópticos simples y la solicitud PCT WO 2012/120387 da a conocer un método para evitar largos tiempos de espera para lograr condiciones de medición estables. Sin embargo, en todas las configuraciones descritas en estos documentos, el número de tipo de biomarcador estaba limitado a uno por biosensor nanofluídico.

Los biomarcadores, también denominados marcadores biológicos, son sustancias usadas como indicadores específicos para detectar la presencia de biomoléculas específicas. Es una característica que se mide y evalúa de manera objetiva como indicador de procesos biológicos, procesos patógenos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica.

Los métodos para la detección de biomoléculas específicas pueden dividirse en dos categorías: (a) las técnicas con marcador y (b) las técnicas libres de marcador.

Entre las técnicas con marcador, las más ampliamente usadas son fluorescencia, colorimetría, radiactividad, fosforescencia, bioluminiscencia y quimioluminiscencia. Las perlas magnéticas funcionalizadas también pueden considerarse técnicas de marcaje. Ventajas de las técnicas con marcador en comparación con métodos libres de marcador son la sensibilidad y el reconocimiento molecular debido a marcaje específico.

Entre las técnicas libres de marcador, las más ampliamente usadas son biosensores electroquímicos, con referencia a sensores amperométricos, capacitivos, conductométricos o impedimétricos, que tienen la ventaja de ser rápidos y económicos. Miden el cambio en las propiedades eléctricas de estructuras de electrodo a medida que las biomoléculas quedan atrapadas o inmovilizadas en o cerca del electrodo. Estas tecnologías, sin embargo, carecen de contraste, sensibilidad y fiabilidad específicas moleculares.

El ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) es una técnica bioquímica importante usada principalmente para detectar la presencia de biomoléculas solubles en suero, y se usa, por tanto, ampliamente como herramienta de diagnóstico en medicina y comprobaciones de control de calidad en diversas industrias. Los análisis de ELISA son, sin embargo, costosos, requieren grandes cantidades de disolución y requieren mucho tiempo.

Las otras tecnologías relevantes para el diagnóstico biomolecular son inmunotransferencias de tipo Western y Northern, electroforesis de proteínas y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Sin embargo, estos métodos requieren analitos altamente concentrados y no permiten pruebas de muestras de alto rendimiento.

Además, el documento WO 2011/064701 describe un biosensor convencional.

Objetivos de la presente invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar biosensores nanofluídicos autocalibrados o multiplexados, económicos y rápidos, que no requieran manipulaciones complejas.

Todavía otro objeto de la presente invención es confinar geoméricamente el volumen de medición óptica a la escala nanométrica y obtener un biosensor de alta sensibilidad multiplexado.

Todavía otro objeto de la invención es proporcionar un biosensor capaz de proporcionar una curva de calibración, que luego puede usarse para restar el fondo del biosensor y proporcionar mediciones cuantitativas con el valor de concentración de mediciones específicas.

Estos y otros objetos de la presente invención resultarán evidentes con referencia a la siguiente descripción de realizaciones preferidas, ilustrada por las figuras.

5 Sumario de la invención

La invención se refiere a un biosensor tal como se define en las reivindicaciones.

También se refiere a un conjunto y un método usando dicho biosensor.

10

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una vista en perspectiva esquemática de un sistema 100 que comprende biosensores 200 nanofluidicos con aberturas laterales. Se deposita una disolución 300 que contiene biomoléculas marcadas de manera fluorescente en el sistema 100 mediante un sistema 400 de pipeta. Se usa un sistema 500 óptico que incluye un láser 510 de exploración para la medición.

15

La figura 2 es una vista en perspectiva de una realización de un biosensor 200 nanofluidico con una abertura 221 de entrada lateral y una abertura 222 de salida lateral. Un canal 223 de tamaño nanométrico se define por la altura de un material 230 estructurado intercalado entre un primer sustrato 210 y un segundo sustrato 220. Varias áreas 240 funcionalizadas están presentes en la ranura 223 de tamaño nanométrico.

20

La figura 3 es una representación esquemática de una sección transversal parcial del biosensor nanofluidico de la figura 2, que comprende dos sustratos 210 y 220 áreas 240 localmente estructuradas que se funcionalizan cada una mediante diferentes biomarcadores 331, 332, 333, 334, 335, 336 y otras áreas 250 que evitan esa funcionalización. La disolución 300 que contiene biomoléculas 311, 312, 313, 314, 315, 320 entra en la nanorendija 223 desde la abertura de entrada lateral del biosensor 221 hasta la abertura 222 de salida lateral, con un frente 301 de flujo. Las moléculas 311, 312, 313, 314, 315, 320 pueden interaccionar con los diferentes biomarcadores 331, 332, 333, 334, 335, 336 inmovilizados y pueden formar complejos 341, 343, 344, 345, 346 si son específicas para los biomarcadores. El haz 510 de láser monitoriza la concentración de las biomoléculas inmovilizadas sobre sus biomarcadores específicos en el volumen 520 de detección. Las moléculas 320 que no son específicas para ningún biomarcador funcionalizado no se medirán mediante el sistema. Finalmente, pueden usarse áreas 335 de control negativo y áreas 336 de control positivo, por ejemplo, para calibrar el biosensor.

25

30

Las figuras 4a, 4b y 4c son secciones transversales parciales vistas desde arriba de biosensores según diferentes realizaciones de la invención, donde el biosensor nanofluidico comprende una nanorendija 223 con una abertura 221 de entrada lateral, una abertura 222 de salida lateral y lados 223. La disolución 300 que contiene biomoléculas entra en la nanorendija 223 con un frente 301 de flujo. Varias áreas 240, 241, 242 funcionalizadas y áreas 250 no funcionalizadas están presentes en la nanorendija 223. Las áreas 240, 241, 242 funcionalizadas pueden tener diversas formas tales como líneas 240, polígonos 241 pequeños o áreas 242 redondeadas.

35

40

La figura 5 son secciones transversales parciales vistas desde arriba de un biosensor según todavía otra realización de la invención, con una primera área 240 funcionalizada para inmovilizar un tipo de biomarcador (detección específica), y otras áreas que se funcionalizan para la calibración de la prueba. Por ejemplo, el área 243 funcionalizada es el control positivo del 100%, el área 244 funcionalizada es el control positivo del 75%, el área 245 funcionalizada es el control positivo del 50%, el área 246 funcionalizada es el control positivo del 25% y el área 247 funcionalizada el control negativo. El haz 510 de láser monitoriza la concentración de las biomoléculas inmovilizadas sobre sus biomarcadores específicos en el volumen 520 de detección para cada área funcionalizada diferente.

45

La figura 6 ilustra las diversas secuencias para la detección usando un biosensor de la figura 5. En primer lugar, la detección específica se mide en el área funcionalizada A), luego el control positivo B), varios controles intermedios C), D), E), y finalmente el control negativo F).

50

La figura 7 representa una curva de calibración típica, establecida a partir de las áreas 243, 244, 245, 246 y 247 funcionalizadas, lo que permite calibrar el valor de detección específica (CA) en función del entorno del biosensor (fondo, valor máximo, etc.) y de las características de la disolución 300 (viscosidad, densidad de biomoléculas, etc.).

55

Descripción detallada de la invención

Tal como se usa en el presente documento, el término "sistema" se pretende que sea un término genérico, que incluye, por ejemplo (pero no se limita a) una cápsula, una superficie, un disco o cualquier medio que puede inmovilizar biosensores nanofluidicos.

60

Tal como se usa en el presente documento, el término "biomoléculas" se pretende que sea un término genérico, que incluye, por ejemplo (pero no se limita a) proteínas tales como anticuerpos o citocinas, péptidos, ácidos nucleicos, moléculas lipídicas, polisacáridos y virus.

65

Tal como se usa en el presente documento, el término “nanorendija” se pretende que sea un término genérico, lo que significa una estructura microfabricada bien definida con una dimensión de tamaño nanométrico. La dimensión de tamaño nanométrico de la nanorendija se define que es mayor de 2 nm debido al tamaño de las biomoléculas más pequeñas que va a detectarse que han de entrar en la rendija y que se encuentran en el mismo orden de magnitud. La presente invención se limita a una nanorendija con sólo una dimensión menor de un micrómetro, debido al intervalo del volumen de detección del sistema óptico que se encuentra normalmente en el mismo orden de magnitud.

Un objeto de la presente invención, según las realizaciones, es permitir la detección de varias sustancias, en particular de varias biomoléculas en un único biosensor nanofluídico.

Tal como se ilustra en la figura 1, según las realizaciones, varios biosensores 200 nanofluídicos se inmovilizan en un sistema 100. Se deposita una disolución 300 mixta que contiene biomoléculas de interés marcadas de manera fluorescente dentro del sistema 100, por ejemplo, con un sistema 400 de pipeta. Se usa una unidad 500 óptica para medir las interacciones biomoleculares dentro de los biosensores 200 enfocando el haz 510 de láser dentro de la nanorendija del biosensor.

La figura 2 ilustra la estructura de un biosensor nanofluídico según una realización. Se deposita una capa 230 de un grosor que oscila entre, por ejemplo, 2 y 1.000 nm sobre un sustrato 220 inferior y se estructura usando técnicas de fotolitografía convencionales con el fin de definir la geometría de una nanorendija 223. Se añade un sustrato 210 superior, o se apila, sobre el sustrato 220 inferior. Al menos uno de los sustratos inferior o superior ha de ser compatible con el objetivo del microscopio en cuanto a transparencia y aberraciones ópticas. El biosensor nanofluídico también comprende una abertura 221 de entrada lateral y una abertura 222 de salida lateral. La nanorendija 223 está en comunicación fluídica con dichas aberturas 221, 223 laterales y conecta la abertura 221 de entrada lateral con la abertura 222 de salida lateral. La altura de la nanorendija está determinada por el espaciado entre los sustratos 210, 220 superior e inferior, es decir por el grosor de la capa 230. Por tanto, la capa 230 actúa como espaciador para definir la altura de la nanorendija 223. Varias áreas 240 dentro de la nanorendija 223 se funcionalizan para la detección de biomoléculas.

La figura 3 ilustra el principio de detección y la sección transversal de una nanorendija 223 de un biosensor nanofluídico según una realización de la invención. El biosensor comprende una nanorendija 223 que se extiende desde una abertura 221 de entrada lateral hasta una abertura 222 de salida lateral, creando de ese modo una relación fluídica entre dichas aberturas. Se carga una disolución 300 fluídica que contiene biomoléculas (311, 312, 313, 314, 315) específicas marcadas de manera fluorescente y biomoléculas 320 inespecíficas en el biosensor, que entra en el biosensor desde la abertura 221 de entrada lateral, fluyendo a través de la nanorendija 223 y hasta la abertura 222 de salida lateral con un frente 301 de flujo. En las realizaciones, se inmovilizan diversos biomarcadores (331, 332, 333, 334, 335, 336) sobre varias superficies 240 estructuras y funcionalizadas de manera selectiva. Las superficies 250 restantes del biosensor nanofluídico se tratan, por ejemplo, para evitar la funcionalización indeseada de biomarcadores o unión inespecífica de biomoléculas. Durante el llenado de la abertura de salida lateral y gracias al movimiento browniano, las biomoléculas (311, 312, 313, 314, 315, 320) interaccionan con los biomarcadores (331, 332, 333, 334, 335, 336) inmovilizados dentro del nanocanal 223 y pueden crear complejos (341, 342, 343, 344, 346) moleculares. Las biomoléculas 320 inespecíficas también difunden en la nanorendija 222 pero no formarán complejos moleculares con los biomarcadores (331, 332, 333, 334, 335, 336) inmovilizados.

Con el fin de optimizar la detección de una biomolécula particular, un volumen 520 de detección se concentra dentro de la nanorendija 223 de modo que el volumen de intersección definido por el volumen de la nanorendija 223 y el volumen 520 de detección es máximo, y se sitúa en una de las áreas 240 funcionalizadas. Cuando se excita mediante un haz de láser, los complejos 341, 342, 343, 344, 346 de emisión fluorescente inmovilizados, respectivamente, y las biomoléculas 320 de emisión fluorescente de difusión que difunden a través del volumen 520 de detección óptico se detectan mediante el sistema óptico.

La presente invención, por tanto, permite detectar y/o medir diferentes biomarcadores o diferentes concentraciones del mismo biomarcador en un único biosensor nanofluídico. Esto permite beneficiarse del potencial de detecciones de multiplexación o de realizar calibración.

Las figuras 4a a 4c muestran una sección transversal vista desde arriba de un biosensor nanofluídico según las realizaciones de la invención. Se conecta una nanorendija 223 con una altura definida por el grosor de una capa 230 con una abertura 221 de entrada lateral y con una abertura 222 de salida lateral. Una disolución 300 que contiene biomoléculas llena el biosensor con un frente 301 de flujo. La nanorendija 223 comprende áreas 240, 241, 242 funcionalizadas y áreas 250 no funcionalizadas. Tal como se representa en la figura 4a, las áreas funcionalizadas pueden ser líneas o rectángulos 240, estructuras 241 de polígono pequeño tal como se ilustra en la figura 4b o estructuras 242 redondas u ovaladas tal como se propone en la figura 4c. Sin embargo, es posible cualquier otra forma dentro del alcance de la invención.

La figura 5 ilustra un ejemplo de otra realización de la presente invención. Según el ejemplo ilustrado, se prepara

- una primera área 240 funcionalizada con un primer tipo de biomarcador, y las otras áreas 243, 244, 245, 246, 247 funcionalizadas con otro tipo de biomarcador y se usan para calibrar el resultado obtenido con la primera área 240 funcionalizada. Por ejemplo, un área 243 funcionalizada se cubre al 100% con un biomarcador de control positivo y un área 247 funcionalizada se cubre al 100% con un biomarcador de control negativo. Las áreas 244, 245 y 246 funcionalizadas se cubren sólo parcialmente con un biomarcador de control positivo. La cobertura parcial se realiza, por ejemplo, aplicando diferentes patrones durante la microfabricación de las áreas 244, 245, 246 funcionalizadas o variando la concentración del biomarcador durante el proceso de inmovilización. El punto 520 de láser que mide la concentración de biomoléculas se ilustra en el área 247 funcionalizada de control negativo en la figura 5.
- La figura 6 ilustra esquemáticamente el método de calibración de un biosensor nanofluídico según las realizaciones de la invención. En primer lugar, el haz de láser mide la detección específica en el primer área funcionalizada (A). Entonces, mide un control positivo (B), varios controles intermedios n1 (C), n2 (D), nx (E) y finalmente un control negativo (F). También se representan patrones microfabricados de las áreas funcionalizadas (en negro) para cada etapa.
- Con el fin de calibrar el biosensor nanofluídico y, por tanto, obtener una detección específica cuantitativa exacta, se mide una curva de calibración para diferentes concentraciones de biomarcadores de control. La figura 7 ilustra una curva de calibración. A partir de las mediciones realizadas en las áreas 243, 244, 245, 246 y 247 funcionalizadas, el valor de detección específica (CA) se ajusta, por ejemplo, en función del entorno del biosensor (fondo, valor máximo, etc.) y de las características de la disolución 300, tales como, por ejemplo, la viscosidad de la disolución, la densidad de biomoléculas, etc.
- Según la presente invención, la definición de áreas de funcionalización precisas en una nanorendija proporciona grandes mejoras para la detección multiplexada y calibración de biomoléculas que interaccionan o no con otras biomoléculas inmovilizadas. Las aplicaciones de la presente invención incluyen, por ejemplo, análisis biomédicos, biológicos o de alimentos así como estudios fundamentales en química analítica y bioanalítica.

REIVINDICACIONES

1. Biosensor (200) para detectar y cuantificar biomoléculas (311-320) marcadas de manera fluorescente, comprendiendo dicho biosensor (200):
 - 5 - un sustrato (220) inferior;
 - un sustrato (210) superior apilado sobre dicho sustrato (220) inferior;
 - 10 - una nanorendija (223) que es una estructura microfabricada con una dimensión de tamaño nanométrico, formada entre dicho sustrato (220) inferior y dicho sustrato (210) superior, comprendiendo dicha nanorendija (223) una pluralidad de áreas (240-247) estructuradas locales dispuestas a lo largo de dicha nanorendija (223);
 - 15 - una abertura (221) de entrada lateral en contacto directo con dicha nanorendija (223), para permitir que una disolución que contiene biomoléculas entre en dicha nanorendija (223); y
 - una abertura (222) de salida lateral en contacto directo con dicha nanorendija (223), para conducir dicha disolución a través de dicha nanorendija (223),
 - 20 caracterizado porque la pluralidad de áreas (240-247) estructuradas locales están funcionalizadas cada una mediante diferentes biomarcadores (331-336).
2. Biosensor (200) según la reivindicación 1, en el que la pluralidad de áreas (240-247) funcionalizadas difieren entre sí en que están funcionalizadas mediante diferentes tipos de biomarcadores.
- 25 3. Biosensor (200) según la reivindicación 1 ó 2, en el que la pluralidad de áreas (240-247) funcionalizadas difieren entre sí en que están funcionalizadas mediante diferentes densidades de biomarcadores.
- 30 4. Biosensor (200) según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha pluralidad de biomarcadores (331-336) están adaptados para interaccionar biológica o químicamente con biomoléculas (311-315) específicas contenidas en dicha disolución (300).
- 35 5. Biosensor (200) según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha pluralidad de biomarcadores (331-336) están adaptados para no interaccionar biológica o químicamente con biomoléculas (320) inespecíficas contenidas en dicha disolución (300).
- 40 6. Biosensor (200) según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichos sustratos (201, 202) inferior y superior están hechos de un material seleccionado del grupo que comprende compuestos de silicio, vidrio, plástico y óxido.
- 45 7. Biosensor (200) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha abertura (221) de entrada lateral y dicha abertura (222) de salida lateral tienen cada una un área de desde 100 nm² hasta 20 mm² y dicha nanorendija (223) tiene al menos una dimensión de entre 2 nm y 1000 nm.
8. Matriz que comprende una pluralidad de biosensores (200) según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, estando dichos biosensores (200) en una posición fija unos con respecto a los otros dentro de un sistema (100).
- 50 9. Conjunto que comprende al menos un biosensor (200) según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y que comprende además medios (500) ópticos para excitación y detección de fluorescencia.
- 55 10. Conjunto según la reivindicación 9, en el que dichos medios (500) ópticos son una unidad de medición de fluorescencia que comprende un detector de un solo fotón.
- 60 11. Conjunto según la reivindicación 9, en el que dicho detector de un solo fotón es una matriz de detector CMOS o CCD.
12. Conjunto según la reivindicación 9, en el que dicho detector de un solo fotón es un fotodiodo de avalancha (APD).
13. Conjunto según la reivindicación 9, en el que dicho detector de un solo fotón es un tubo fotomultiplicador (PMT).
- 65 14. Método para detectar y cuantificar la presencia de biomoléculas (311-320) marcadas de manera fluorescente en una disolución (300), comprendiendo dicho método las etapas de:

- a) proporcionar al menos un biosensor (200) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5;
- 5 b) llenar dicho al menos un biosensor (200) con una disolución (300) acuosa, desde una abertura (210) de entrada lateral de dicho al menos un biosensor (200), a través de una nanorendija (223), que es una estructura microfabricada con una dimensión de tamaño nanométrico, de dicho al menos un biosensor (200), hacia una abertura (220) de salida lateral de dicho al menos un biosensor (200), depositando dicha disolución (300) acuosa en dicha abertura (210) de entrada lateral, en el que dicha disolución (300) acuosa
10 contiene biomoléculas (311-320) marcadas de manera fluorescente que pueden ser específicas para una pluralidad de biomarcadores (331-336) inmovilizados sobre una pluralidad de áreas (240-247) funcionalizadas de dicha nanorendija (223);
- c) detectar biomoléculas (341-346) específicas inmovilizadas sobre dicha pluralidad de biomarcadores (331-336) dentro de dicha nanorendija (223) midiendo con un sistema (500) óptico la intensidad de fluorescencia de fluoróforos unidos a dichas biomoléculas (341-346) específicas, en donde dicha pluralidad de áreas (240-247) funcionalizadas se disponen en patrón para inmovilizar diferentes densidades de biomarcadores (250-254).
- 15
- 20 15. Método según la reivindicación 14, en el que dichas biomoléculas (311-320) marcadas de manera fluorescente son proteínas, ADN, ARN, anticuerpos, aminoácidos, ácidos nucleicos, enzimas, moléculas lipídicas, péptidos, polisacáridos y/o virus.

FIG.1

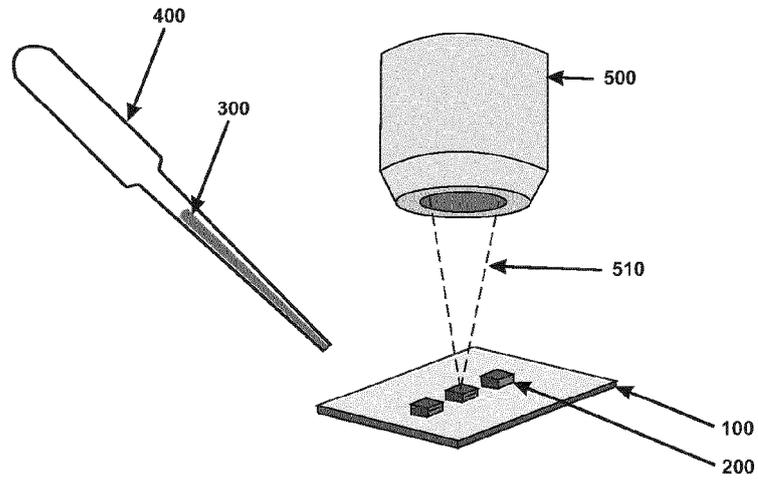


FIG.2

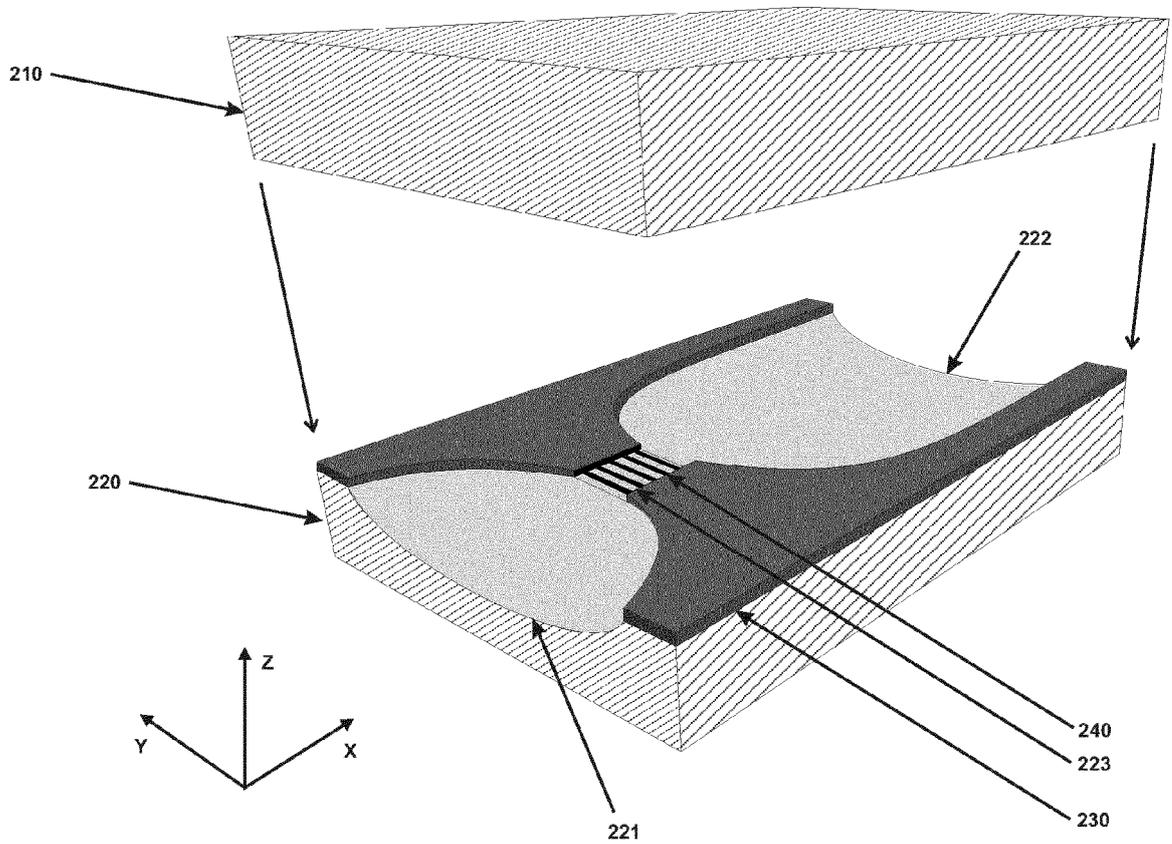


FIG.3

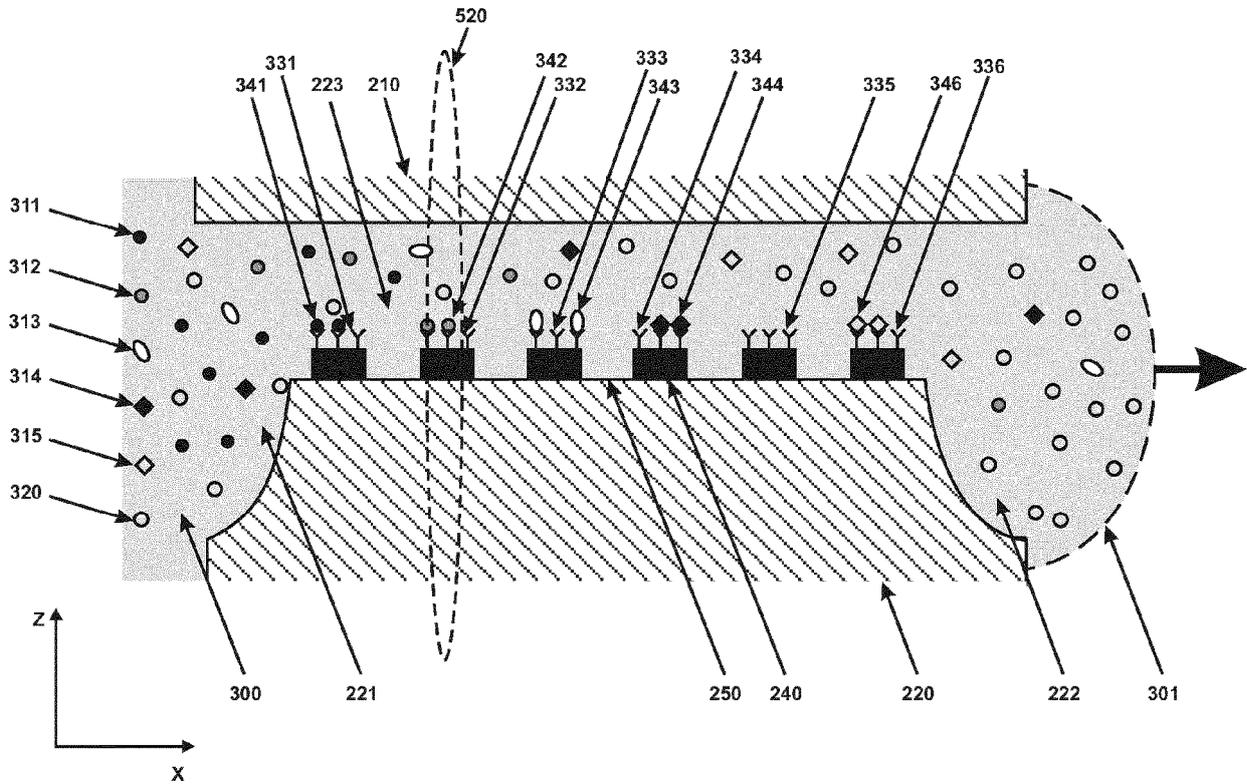


FIG.4a

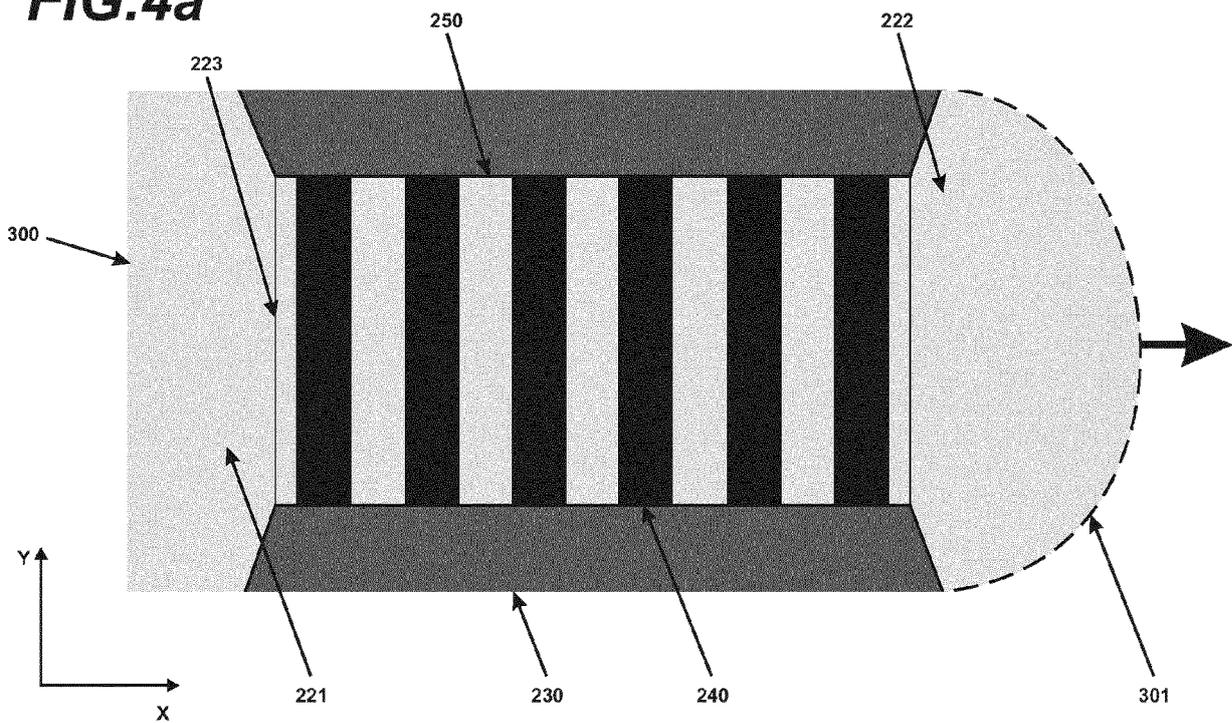


FIG.4b

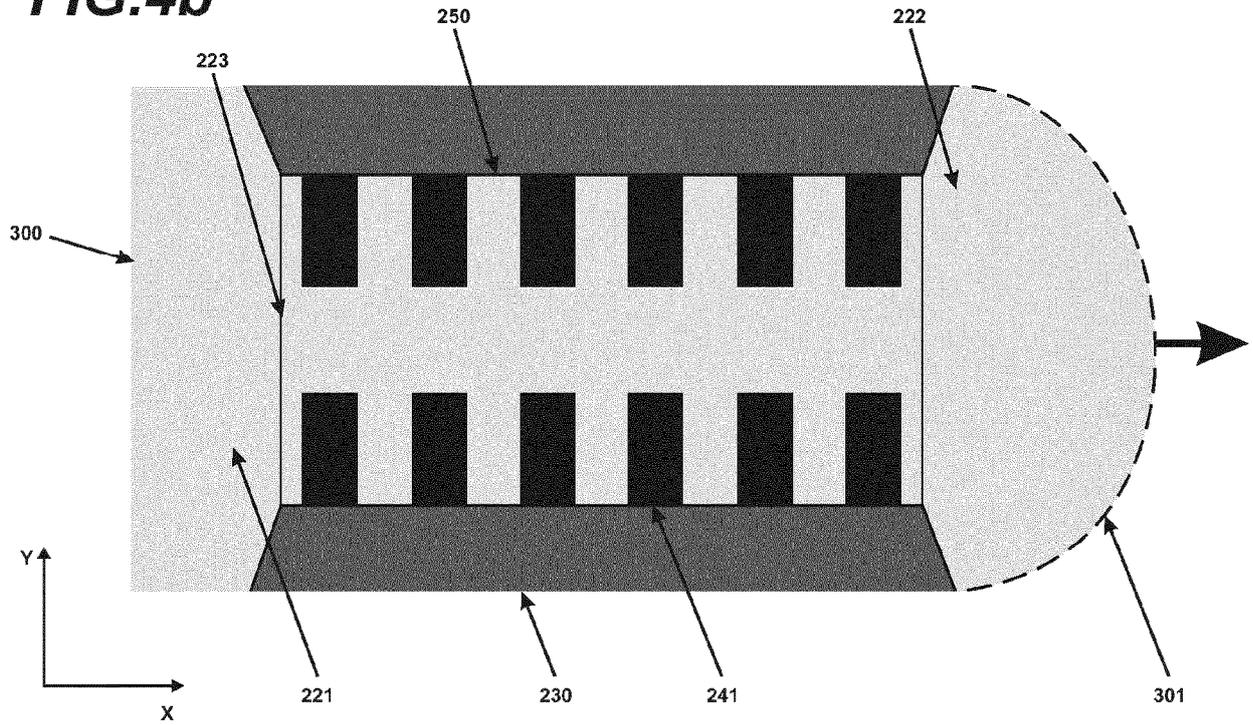
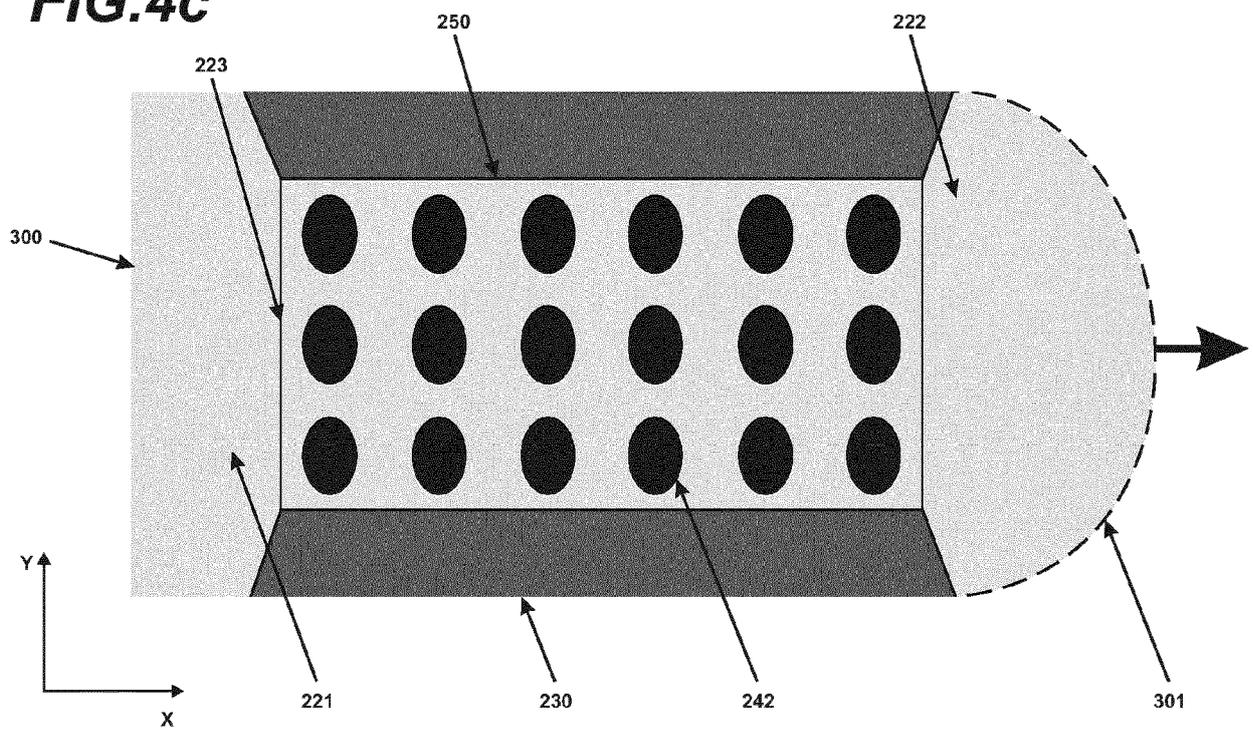


FIG.4c



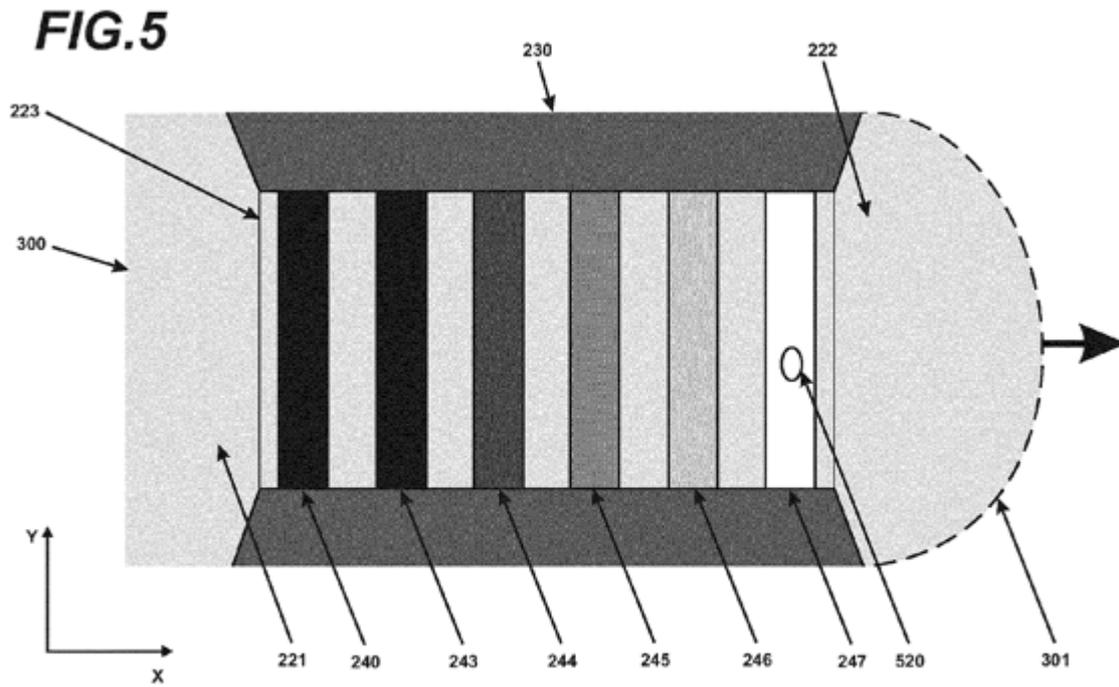


FIG.6

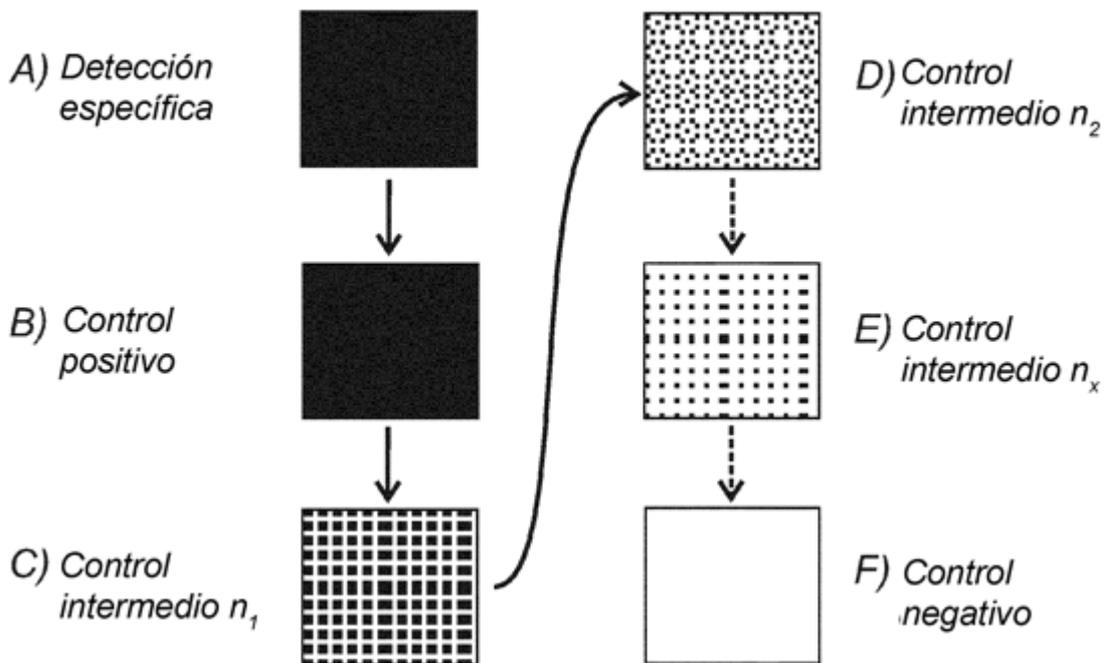


FIG.7

