

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 908**

51 Int. Cl.:

**B01L 3/00** (2006.01)

**G01N 21/552** (2014.01)

**G01N 21/65** (2006.01)

**B82Y 30/00** (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2012 PCT/CA2012/000203**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2012 WO12122628**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2012 E 12757703 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 2686154**

54 Título: **Sistema para microfluidos que tiene estructuras nanoplasmonicas monolíticas**

30 Prioridad:

**15.03.2011 US 201161452868 P**

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

**29.04.2019**

73 Titular/es:

**NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA  
(100.0%)**

**1200 Montreal Road  
Ottawa, ON K1A 0R6, CA**

72 Inventor/es:

**MALIC, LIDIJA;  
MORTON, KEITH y  
VERES, TEODOR**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 710 908 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

Sistema para microfluidos que tiene estructuras nanoplasmónicas monolíticas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a sistemas y dispositivos para microfluidos que tienen características nanoplasmónicas, en particular para su uso en aplicaciones de cultivo celular, y a procesos para producir tales sistemas y dispositivos.

Antecedentes de la invención

10 El análisis de la unión molecular y el comportamiento celular son importantes para el diagnóstico de enfermedades, la investigación biomédica y el descubrimiento de fármacos. La gran mayoría de los estudios basados en matrices de interacciones de bioafinidad emplean biomoléculas marcadas con fluorescencia o ensayos colorimétricos ligados a enzimas. Sin embargo, existe la necesidad de métodos que detecten las interacciones de bioafinidad sin marcadores moleculares, especialmente para las interacciones biomoleculares y celulares, en las que la marcación es problemática y puede interferir con sus propiedades biológicas. El desarrollo de biosensores simples y específicos para detectar biomarcadores y medir la respuesta celular tiene implicaciones de gran alcance en su detección oportuna, lo que es una gran preocupación para la salud y la seguridad humanas.

15 Los avances en genómica y proteómica han revelado un catálogo exhaustivo de biomarcadores que pueden usarse potencialmente como indicadores de diagnóstico y pronóstico de enfermedades genéticas e infecciosas. Los enfoques de detección basados en la fluorescencia de anticuerpos y ácidos nucleicos actualmente consisten en formatos de ensayos complejos, de varias etapas, que requieren mucho tiempo y trabajo, y un análisis de analitos objetivo para asegurar la especificidad de la detección. Además, estos métodos no son adecuados para la detección rápida de patógenos o cáncer ya que requieren un extenso hemocultivo del patógeno o tejido enfermo en el laboratorio central antes de la detección de anticuerpos.

20 El análisis de las interacciones biomoleculares también es una parte clave del proceso de descubrimiento de fármacos que implica determinar la afinidad de unión del fármaco a la proteína objetivo de interés. A pesar de que los desarrollos en el campo del cribado de alto rendimiento (HTS) y la química computacional aceleraron y facilitaron enormemente el proceso de búsqueda de fármacos, existen importantes limitaciones que superar. Un ejemplo es el ensayo HTS basado en fluorescencia, que puede generar falsos positivos (por ejemplo, unión a la enzima informadora o interacción hidrofóbica directa del marcador con el objetivo) o resultados falsos negativos (por ejemplo, oclusión del sitio de unión). La aplicación de tecnologías nuevas y eficientes sin marcadores es de gran importancia para el proceso de descubrimiento de medicamentos, ya que reducirán los costos de desarrollo y disminuirán el tiempo de comercialización.

25 Para el descubrimiento de fármacos, así como en la investigación biomédica, el estudio del efecto de las señales específicas (por ejemplo, química, topográfica, de flujo, etc.) sobre la unión y motilidad celular, la viabilidad celular, la proliferación celular y el ciclo celular es de primordial importancia. La inducción y la medición subsiguiente de una respuesta celular específica requiere proporcionar a las células las indicaciones adecuadas, controlar las condiciones en el microambiente celular y monitorear las respuestas celulares en múltiples niveles jerárquicos dentro de un gran número de experimentos paralelos. Los ensayos actualmente empleados que se basan en el cultivo celular en placas de Petri y la posterior detección de biomoléculas y de imágenes de células vivas con base en fluorescencia son lentos, engorrosos y no pueden cumplir estos requisitos. Los análisis de placas de múltiples pozos pueden aumentar el rendimiento a través de imágenes automáticas proporcionadas por el cribado de células de alto contenido (HCCS). Sin embargo, una consideración importante para los ensayos de múltiples pozos es asegurar un patrón o tratamiento uniforme de cada pozo, lo que a menudo se ve impedido por las variaciones en el volumen de líquido dispensado en cada pozo. La variabilidad resultante en la concentración de reactivos aplicados dificulta las comparaciones justas y cuantitativas y limita la capacidad del HCCS para resolver pequeñas diferencias en las respuestas de señalización celular. Este problema se exagera en protocolos más complejos, como la exposición secuencial de células a diferentes medios, debido a los errores que se acumulan al cambiar los medios. Además, las aspiraciones repetidas de los medios pueden eliminar involuntariamente las células de los pozos. Debido a que estos ensayos también son difíciles de miniaturizar, los experimentos de HCCS pueden consumir grandes cantidades de células y reactivos costosos o valiosos. Finalmente, el HCCS todavía se basa en marcadores fluorescentes que pueden desencadenar efectos de impedimento estérico no deseados.

30 En consecuencia, la investigación sobre el efecto de las señales (únicas o múltiples) en la respuesta celular hasta la fecha se ha visto limitada por la falta de métodos robustos y reproducibles para la producción homogénea de material, el control preciso de las condiciones de cultivo celular y el monitoreo libre de la respuesta celular sin marcadores en tiempo real *in situ*, el comportamiento celular, la viabilidad celular o las interacciones de unión biomolecular. Específicamente, los métodos de producción de material han carecido del control requerido para fabricar de manera reproducible superficies homogéneas que permitan investigaciones sobre interacciones específicas entre células y variables aisladas, es decir, patrones a nanoescala definidos con precisión en un espacio definido con control sobre el cambio inducido en la topografía y los cambios asociados a energía superficial. Los métodos de cultivo celular

basados en pozos comúnmente empleados son costosos y sufren errores en la dispensación de líquidos, tanto de forma manual como robótica, lo que impide el manejo uniforme de cada pozo, lo que a su vez limita la forma en que tan finamente se pueden resolver las respuestas de señalización. Finalmente, aunque el uso de técnicas de imágenes fluorescentes para el análisis celular puede proporcionar información que no se puede alcanzar fácilmente con otros métodos, generalmente se confunden por la necesidad de sobreexpresar la proteína de señalización de interés y por los posibles efectos del marcador fluorescente en la función de la proteína. Por lo tanto, debido a la naturaleza fenomenológica de los estudios actuales, las respuestas logradas han sido heterogéneas tanto a nivel de población de células como de células individuales (Balasundaram 2007; Barbucci 2003; Blümmel 2007; Curtis 2006; Dalby 2007a; Ernstring 2007; Kimura 2007; Salber 2007).

La detección de fluorescencia y quimioluminiscencia son los métodos más comunes empleados para el reconocimiento de biomoléculas. Ambos esquemas requieren el uso de un elemento de reconocimiento marcado que se une a una molécula de interés, produciendo así una señal selectiva al unirse (Marquette, 2006). Actualmente, la detección y cuantificación de biomarcadores genómicos y proteómicos a partir de suero u otras muestras fisiológicas se basan en la detección en fase sólida, donde a menudo se necesita una fuerte química de amplificación para producir una lectura. En el caso de los marcadores de ADN, el estado de la técnica se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), mientras que para los marcadores de proteínas prevalece el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Se han informado muchos intentos de miniaturizar sistemas de laboratorio usando microfluidos para aumentar los límites de detección y reducir los tiempos de incubación, el consumo de reactivos y el tamaño de la muestra (Zhang 2009a; Zhang 2009b; Lim 2007; Lee 2006; Malic 2007). Sin embargo, a pesar del creciente enfoque de la comunidad de investigación de microfluidos, tanto la PCR como el ELISA se basan en marcadores de fluorescencia, que aumentan la complejidad y el costo del ensayo. Además del requisito de un elemento de reconocimiento marcado, estas técnicas requieren típicamente sistemas ópticos complejos que consisten típicamente en un microscopio grande o un lector de microplacas. Como resultado, el campo de los microfluidos aún tiene que producir muchos dispositivos comerciales para el diagnóstico de enfermedades (Myers, 2008). Existe la necesidad de acoplar e integrar microfluidos con métodos de detección directa sin marcadores que se basan en las características físicas de los fenómenos biológicos y tienen el potencial de reducir los costos de los reactivos y la complejidad de las pruebas (Weigl, 2008).

El desarrollo de técnicas mínimamente invasivas para inducir una respuesta celular específica se centra en controlar el contacto directo y la interacción entre un tipo de célula dado y un material bien definido. Una forma de controlar la adhesión celular y la morfología posterior es mediante la nanotopografía. La investigación ha demostrado que las células pueden detectar y responder a una variedad de topografías y pueden verse afectadas por el nivel de orden de una topografía inducida, con efectos claros sobre la funcionalidad celular (Dalby, 2009; Dalby, 2008; Dalby, 2007b; Dalby, 2007c; Dalby, 2007d; Hochbaum, 2010). De manera similar, las bacterias también responden a señales topográficas (espaciales y mecánicas) y recientemente se ha mostrado el patrón espontáneo de bacterias en una matriz periódica de nanoestructuras (Hochbaum, 2010). Otro método emplea una superficie modificada químicamente para inducir la respuesta celular (Cavalcanti-Adam, 2008). Para que ambas estrategias tengan éxito, el material debe ser homogéneo, robusto y fabricado o funcionalizado de manera reproducible. Hasta la fecha, se han utilizado varios métodos para este propósito, que incluyen litografía por haz de electrones, litografía de nanoimpresión y nanolitografía por inmersión de pluma (Cavalcanti-Adam, 2007; Curran, 2010). Sin embargo, los ensayos en estos estudios se realizaron utilizando métodos tradicionales de cultivo celular y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia en vivo con los inconvenientes inherentes a estas técnicas, lo que puede haber resultado en una interpretación engañosa de los resultados debido al error en el manejo del líquido, la perturbación causada por marcadores fluorescentes y bajo rendimiento en el que solo se tomaron imágenes de algunas células para cada procedimiento experimental.

La citometría de flujo (FC) y la citometría de barrido con láser (LSC) son las técnicas más utilizadas para el análisis celular con distribuciones bien caracterizadas del comportamiento celular. Ambas técnicas usan tintes fluorescentes para marcar biomoléculas de interés dentro de la célula para revelar la información sobre la cantidad de biomoléculas dentro de la célula. La citometría de flujo implica el aislamiento hidrodinámico de células individuales, lo que permite un análisis en serie de alto rendimiento. Sin embargo, la FC se limita a caracterizar señales fluorescentes (proteínas de fusión con GFP, inmunofluorescencia y sustratos fluorogénicos para enzimas intracelulares) (Fayet, 1991; Nolan, 1998; Krutzik, 2006), que pueden conducir a un impedimento estérico y son incapaces de realizar mediciones importantes que dependen del tiempo de la población celular. Por el contrario, la citometría de barrido con láser (LSC) se basa en el uso de un láser de barrido para excitar los colorantes en células inmovilizadas en la superficie (Griffin, 2003; Bedner, 1993), lo que permite la medición cinética de la información dependiente del tiempo en células individuales. Sin embargo, solo se puede escanear una región limitada de una placa, lo que limita el desempeño de la técnica. Además, la introducción de reactivos se realiza con una pipeta y solo son significativos los cambios dependientes del tiempo lento después del intercambio de la solución. Esto se debe particularmente a la introducción desigual de la solución en todo el portaobjetos o placa, y al proceso en serie del escaneo con láser. Además, las células analizadas utilizando ambos métodos generalmente se cultivan en matraces, portaobjetos o placas de Petri tradicionales antes del análisis, por lo que la uniformidad del entorno se limita a la del matraz o la placa. En particular, el contacto célula-célula no es controlable, y las secreciones que pueden difundirse se mantienen en el ambiente del cultivo.

Para superar algunas de estas limitaciones, la investigación se ha desplazado recientemente hacia la explotación de las capacidades precisas de suministro de productos químicos de los dispositivos para microfluidos. El enfoque más

popular para la fabricación de dispositivos para microfluidos para ensayos basados en células se basa en la litografía suave de polidimetilsiloxano (PDMS). El PDMS es un elastómero que se moldea sobre un molde fabricado típicamente con fotolitografía y se cura durante varias horas, lo que da como resultado una transferencia de características del molde al PDMS. Su amplio uso como material de elección se debe a su propiedad mecánica, que es susceptible de integración de válvulas de fluidos, elementos esenciales para las principales aplicaciones de microfluidos. Las plataformas de PDMS para cultivos celulares se informaron en el pasado, especialmente para células morfológicas bidimensionales, como las células epiteliales, y varios diseños han sido objeto de solicitudes de patentes (Jin, 2010; Lee, 2010). Sin embargo, la mayoría de estos estudios acoplaron el dispositivo de microfluidos al equipo tradicional a escala macro (es decir, microscopios de fluorescencia) y se basaron en el uso de imágenes de fluorescencia para el análisis de respuesta celular.

Además, hay sorprendentemente poco trabajo informado sobre la combinación de superficies nanomodeladas y microfluidos, especialmente de una manera ventajosa para estudiar la respuesta celular inducida topográficamente. Esto se debe en parte a la dificultad en la fabricación reproducible de superficies nanoestructuradas dentro de dispositivos para microfluidos de cultivo celular. Se han informado varios procesos de producción para la fabricación de nanoestructuras dentro de microcanales, incluida la deposición de vapor de nanopartículas (Song 2009), la formación *in situ* de nanopartículas dentro de los canales de la reacción catalítica (Fonverne, 2009) y la polimerización de un polímero alrededor de una plantilla de óxido de aluminio anódico (Soper, 2008). Sin embargo, es difícil lograr el control de la regularidad, la geometría y/o el espaciado de las matrices de nanopartículas utilizando estas técnicas, limitando la reproducibilidad de las mediciones experimentales.

Para obtener una geometría espacialmente controlada y el espaciado de las nanoestructuras dentro de un canal para microfluidos de PDMS, se requieren moldes multicapa que comprenden nano y microestructuras con procedimientos de fabricación que incluyen litografía de haz de electrones secuencial, litografía de interferencia o litografía por nanoimpresión en combinación con fotolitografía SU-8 resist. La compatibilidad de los materiales y reactivos involucrados en estos procesos es difícil de lograr. Además, una vez que se fabrica el molde y se definen los microcanales, el menor cambio en el diseño para microfluidos requerirá la repetición del proceso completo de fabricación, comenzando con el sustrato nanoestructurado. Esto puede dar lugar a variaciones topográficas de la superficie inducidas por las diferencias de fabricación de una muestra a otra. Además, la técnica de fabricación de litografía suave de PDMS en sí misma no es adecuada para la producción en masa de dispositivos para microfluidos, lo que dificulta su aplicación en la industria, incluido el diagnóstico médico y la farmacia. Finalmente, el uso de PDMS como material para modelos *in vitro* para cultivo celular debe considerarse en un contexto biológico debido a la lixiviación de oligómeros no curados de la red de polímeros a los medios de microsistemas (Regehr, 2009).

Además, se han desarrollado dispositivos para microfluidos con superficies hidrofóbicas nanoestructuradas para controlar la tensión superficial y la presión del líquido en los canales de flujo del fluido (Extrand, 2005), pero las técnicas estándar utilizadas para nanomodelar las superficies del canal no son lo suficientemente flexibles para permitir el modelado simple y rápido de nanoestructuras, especialmente diferentes patrones nanoestructurados, en ubicaciones específicas en los canales o cámaras del dispositivo pero no en otros. Por lo tanto, las diferentes características de diseño dentro del mismo dispositivo son difíciles de lograr y los diseños son difíciles de adaptar a los requisitos de las técnicas de detección plasmónica.

El documento WO 2009/022985 A1 describe un chip sensor de resonancia de plasmón de superficie acoplado a la rejilla que tiene un cuerpo de sustrato que comprende al menos un canal de fluido formado integralmente en la superficie del mismo mediante un sello de impresión, y una capa de material reflectante que se transfiere integralmente a al menos parte de dicho canal de fluido al mismo tiempo de la etapa de impresión. El dispositivo para microfluidos de acuerdo con el documento WO 2009/022985 A1 muestra estructuras de rejilla unidimensionales que dependen de la polarización y, por lo tanto, se pueden usar para la lectura de resonancia de plasmón de superficie solo en el modo de reflexión. En consecuencia, el documento WO 2009/022985 A1 también divulga un método para usar el chip sensor anterior que comprende las etapas de dirigir una fuente de luz que incide en una capa de material reflectante, transmitiendo un fluido de muestra a través de al menos dicho canal de fluido, detectando la luz reflejada desde dicha capa de material reflectante, y midiendo la intensidad de dicha luz reflejada, en donde un cambio en la intensidad de dicha luz reflejada durante el flujo de dicho fluido de muestra a través de al menos dicho canal indica un cambio en el índice de refracción de dicha capa de material reflectante.

El documento US 2007/0015288 A1 describe un sustrato que comprende (a) una película polimérica monolítica que comprende una base que tiene una primera y una segunda superficies principales opuestas, en la que al menos una parte de la primera superficie principal está definida al menos parcialmente por una microestructura modelada exteriormente que se extiende desde la base; y una nanoestructura que tiene una altura promedio de al menos 100 y menos de 200 nanómetros, en la que la nanoestructura se engloba al menos parcialmente dentro de, o se superpone, a la microestructura modelada, y (b) una capa de metal dispuesta de forma conformable en al menos una parte de la nanoestructura, en la que el sustrato estructurado es flexible. Dicho sustrato se usa en un método para analizar una sustancia que comprende proporcionar un analito en estrecha proximidad a al menos una porción de la capa metálica; y observar una propiedad óptica del analito mejorada en la superficie. Los canales del dispositivo para microfluidos de acuerdo con el documento US 2007/0015288 A1 comprenden nanoestructuras distribuidas al azar adecuadas para la detección con SERS.

En general, los sistemas de la técnica anterior tienen una o más deficiencias. Hace falta un sistema para microfluidos integrado que se base en tecnologías de detección no invasivas y sin marcadores que incluya técnicas plasmónicas, como la resonancia de plasmón de superficie (SPR) (por ejemplo, SPR en modo de reflexión, SPR de modo de transmisión, resonancia de plasmón de superficie localizada (LSPR)) y la espectroscopia Raman mejorada en la superficie (SERS) para monitorear el comportamiento celular, las interacciones célula-sustrato, la respuesta celular a los estímulos y la detección de biomoléculas. Faltan técnicas de fabricación que permitan un sistema de cultivo celular nanoestructurado monolíticamente integrado en materiales biocompatibles a largo plazo con funcionalidad de guía celular simultánea y capacidad de detección plasmónica utilizando señales topográficas y respuesta plasmónica de nanoestructura, respectivamente. Hay un pobre control del microambiente celular en las placas de Petri o de micropozos. Hay una falta de topografía de superficie reproducible y robusta (nanomodelado) para el control preciso de la respuesta celular y los estudios de interacción célula-sustrato. Existe una falta de superficie nanoestructurada integrada dentro de los canales para microfluidos. Y, hay una falta de técnicas rápidas y de bajo costo de fabricación de moldes que permitan el diseño de nano y microestructuras intercambiables.

Sigue existiendo la necesidad de un sistema integrado que pueda cumplir uno o más de los siguientes requisitos: (i) control eficiente de la adhesión celular inicial; (ii) control eficiente de la respuesta celular al estímulo específico durante un período prolongado; (iii) monitoreo *in situ*, sin marcadores y en tiempo real de la respuesta celular, la movilidad celular, el comportamiento celular, la viabilidad celular o la detección de biomoléculas para evitar una respuesta falsa debida a la secreción celular de las moléculas a las que responden y el impedimento estérico inducido por los marcadores fluorescentes. Además, el sistema es idealmente de bajo costo, portátil y susceptible de producción en serie.

#### Sumario de la invención

En un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso para producir un sustrato polimérico modelado que comprende: grabar uno o más patrones ordenados en un sustrato duro, comprendiendo los patrones ordenados matrices ordenadas de elementos a escala nanométrica que tienen dimensiones de sección transversal en un intervalo de 10 nm a 1.000 nm, teniendo las matrices una distancia de separación entre sus elementos respectivos en las que la relación de la dimensión de la sección transversal con respecto a la distancia de separación es mayor a 0,2; micromodelado de una película polimérica para formar una membrana que comprende una primera superficie con un patrón de características de escala micrométrica y/o escala mesométrica para definir uno o más canales y/o cámaras, comprendiendo una o más de las características de escala micrométrica y/o a escala mesométrica agujeros pasantes y una o más de las características de escala micrométrica y/o escala mesométrica que no son agujeros pasantes; colocando la membrana en el sustrato duro con una superficie opuesta a la primera superficie contra el sustrato duro, los agujeros pasantes alineados para exponer uno o más patrones ordenados, y aplicando suficiente presión para sellar los bordes de la membrana que rodea los agujeros pasantes contra el sustrato duro; colocar un polímero o metal líquido fraguable en los agujeros pasantes y sobre la primera superficie y colocar el polímero o metal líquido fraguable para formar un sello, comprendiendo el sello relieves a escala micrométrica y/o a escala mesométrica para definir uno o más canales y/o cámaras para microfluidos y que además comprenden uno o más patrones de relieve a escala nanométrica en los relieves de escala micrométrica y/o escala mesométrica que complementan uno o más patrones ordenados; modelar un sustrato polimérico estampando el sustrato polimérico con el sello para formar uno o más canales y/o cámaras para microfluidos en el sustrato polimérico y para formar, en una o más superficies del sustrato polimérico, uno o más patrones ordenados de elementos a escala nanométrica que son sustancialmente idénticos a los uno o más patrones ordenados grabados en el sustrato duro; y metalizar los elementos a escala nanométrica en una o más superficies del sustrato polimérico para la lectura de resonancia plasmónica.

En otro aspecto de la divulgación, que no se reivindica, se proporciona un sello para modelar un sustrato polimérico, comprendiendo el sello: un polímero o metal de dureza suficiente para poder modelar el sustrato polimérico; y, un patrón de relieves de escala micrométrica y/o escala mesométrica para formar uno o más canales y/o cámaras para microfluidos, teniendo uno o más de los relieves de escala micrométrica y/o escala mesométrica superficies en la parte superior que comprenden uno o más patrones de relieve a escala nanométrica para formar una o más matrices ordenadas de elementos a escala nanométrica en el sustrato polimérico, teniendo los elementos a escala nanométrica dimensiones transversales en un intervalo de 10 nm a 1.000 nm, teniendo las matrices una distancia de separación entre los elementos donde la relación entre la dimensión de la sección transversal y la distancia de separación es mayor que 0,2.

En un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un dispositivo para microfluidos como se define en la reivindicación 10, que comprende un sustrato polimérico monolítico producido por el proceso del primer aspecto, siendo dicho sustrato polimérico monolítico modelado con uno o más canales a escala micrométrica en comunicación fluida con una o más cámaras para microfluidos, una superficie en el sustrato polimérico que comprende una matriz ordenada de elementos a escala nanométrica que tienen dimensiones de sección transversal en un intervalo de 10 nm a 1.000 nm, teniendo la matriz una distancia de separación entre los elementos donde la relación entre la dimensión de la sección transversal y la distancia de separación es mayor que 0,2, en donde los elementos a escala nanométrica se metalizan para la lectura de resonancia plasmónica en modo de reflexión o transmisión, y en donde la matriz ordenada de elementos a escala nanométrica está en al menos uno, pero no todos, de los uno o más canales y una o más cámaras.

Los dispositivos para microfluidos de la presente invención son estructuras para microfluidos monolíticas en un sustrato polimérico que tiene nanoestructuras monolíticamente integradas en el sustrato. Los dispositivos tienen al menos un canal de escala micrométrica en comunicación fluida con al menos una cámara para microfluidos. Los canales incluyen, por ejemplo, canales de carga de muestras, canales de carga de células, canales de perfusión de medios, canales de mezcla, canales de separación o fraccionamiento de partículas, canales de generación de gradiente y conductos de perfusión de alta resistencia, que pueden tener diferentes dimensiones de canal dictadas por la aplicación específica. Las cámaras para microfluidos incluyen, por ejemplo, cámaras de cultivo celular, cámaras de captura de bacterias o células, cámaras de interacción biomolecular o cámaras de mezcla. También pueden estar presentes otras estructuras para microfluidos, por ejemplo, válvulas y bombas para controlar el flujo de fluido, conductos, entradas, salidas y similares.

Al menos una superficie en un canal o cámara para microfluidos del dispositivo está modelada con una serie ordenada de elementos a escala nanométrica adecuados para la lectura de la resonancia plasmónica de un fluido en la superficie. Se puede modelar más de una superficie y el patrón puede ser igual o diferente. La superficie o superficies modeladas pueden estar en cualquier parte del dispositivo, e incluso podrían estar en todas partes del dispositivo. La ubicación de la superficie o superficies modeladas está dictada por el uso final del dispositivo. Dichas superficies modeladas pueden denominarse "superficies nanoplasmónicas" y los elementos pueden denominarse "elementos nanoplasmónicos". Los elementos a escala nanométrica pueden servir para un doble propósito como elementos nanoplasmónicos y señales nanotopográficas. Para funcionar como una superficie nanoplasmónica, la matriz ordenada de elementos a escala nanométrica tiene un patrón altamente regular o periódico diseñado para tener una resonancia plasmónica específica para permitir la lectura óptica en tiempo real sin marcadores usando técnicas plasmónicas. La regularidad del patrón se refleja en un tamaño, espaciado y/o geometría muy consistentes de los elementos a escala nanométrica, y surge del proceso altamente reproducible empleado en la presente invención para producir el sustrato polimérico modelado del dispositivo. Preferiblemente, para cada uno del tamaño, espaciado y/o geometría de los elementos en la matriz, la desviación estándar del promedio respectivo no es más de aproximadamente el 3%, preferiblemente no más de aproximadamente el 2,5%, y puede no ser más que aproximadamente el 1%.

Los elementos a escala nanométrica tienen dimensiones de sección transversal en un intervalo de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 1.000 nm, que está en el intervalo a escala nanométrica. Preferiblemente, las dimensiones de la sección transversal están en un intervalo de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 750 nm. Los elementos individuales a escala nanométrica tienen preferiblemente una relación de aspecto (altura con respecto a anchura) de aproximadamente 100 o menos, más preferiblemente 50 o menos, y aún más preferiblemente 10 o menos. Las relaciones de aspecto pueden estar en un intervalo de 100:1 a 1:100, 50:1 a 1:50 o 10:1 a 1:10.

El espaciado de los elementos a escala nanométrica en la matriz ordenada es un factor importante para mantener una regularidad adecuada para las técnicas de lectura de resonancia plasmónica. La distancia de separación ideal depende del tamaño de los elementos a escala nanométrica. Para las técnicas plasmónicas, la relación entre la dimensión transversal y la distancia de separación generalmente es mayor que aproximadamente 0,2. Preferiblemente, la relación de la dimensión de la sección transversal a la distancia de separación está en un intervalo de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 1,5, o aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1. La relación de la dimensión de la sección transversal a la distancia de separación es comúnmente de aproximadamente 0,5 o aproximadamente 1.

Los elementos a escala nanométrica pueden tener cualquier geometría de nanoestructura adecuada para la técnica de lectura a utilizar. Las geometrías adecuadas incluyen, por ejemplo, nanopilares, nanopostes, nanopuntos, nanobarras, nanopirámides, nanomedialunas, nanodiscos, nanocúpulas, nanoagujeros, nanorejillas o nanosurcos. Se pueden integrar múltiples matrices con diferentes geometrías de nanoestructura para diferentes funciones (por ejemplo, rejillas para acoplamiento de luz o nanopilares para la mejora del campo electromagnético de SPR) dentro del mismo dispositivo. Múltiples matrices que tienen diferentes geometrías de nanoestructura pueden combinarse para ocupar la misma superficie, o diferentes matrices pueden estar en diferentes superficies en el dispositivo. Diferentes matrices pueden resonar a diferentes longitudes de onda permitiendo la implementación de un esquema de interrogación de frecuencia múltiple para la detección multicanal en paralelo de diferentes objetivos.

Las matrices ordenadas de elementos a escala nanométrica pueden integrarse en una superficie de características de escala micrométrica (por ejemplo, micropilares) en el dispositivo. En aplicaciones de cultivo celular, esto puede proporcionar dos niveles de señales topográficas (señales espaciales y mecánicas) en las escalas micro y nanométricas para el control de la unión celular y el movimiento, al tiempo que conserva la capacidad de detección plasmónica para estudiar el comportamiento y las interacciones celulares. Además, las características microópticas (por ejemplo, microlentes, rejillas resplandecientes, etc.) se pueden formar en el dispositivo para microfluidos para diversos propósitos, incluyendo mejorar el acoplamiento de la luz o mejorar la eficiencia de recolección de luz, dependiendo de las técnicas de lectura particulares utilizadas.

Los elementos a escala nanométrica pueden tratarse adicionalmente para mejorar o alterar las propiedades de la matriz ordenada. Tales tratamientos incluyen la metalización de los elementos a escala nanométrica para aumentar la reflectividad de la matriz o la modificación química de la superficie para permitir la unión de biomoléculas. Para las técnicas plasmónicas, se prefiere particularmente la metalización de un lado de los elementos a escala nanométrica

para formar nanoelementos metálicos de un solo lado. Plata, oro, cobre, platino y paladio son los metales preferidos para la metalización, particularmente para aplicaciones SERS. La metalización se puede lograr mediante cualquier método adecuado, por ejemplo, evaporación, pulverización o electrodeposición. La modificación química de la superficie incluye la modificación con grupos finales reactivos específicos, por ejemplo -COOH, -OH, -NH<sub>3</sub>, -biotina, -silano, etc., para permitir la posterior unión de anticuerpos, oligonucleótidos, aptámeros o proteínas para captura de células, bacterias o biomoléculas.

El sustrato polimérico puede comprender cualquier material polimérico que sea lo suficientemente suave para ser estampado por el sello. Preferiblemente, el material polimérico es adecuado para la fabricación de dispositivos para microfluidos. Preferiblemente, el material polimérico comprende un polímero de cicloolefina (por ejemplo, Zeonor<sup>MR</sup>), un polímero termoplástico (por ejemplo, poliolefinas), un polímero biodegradable (por ejemplo, almidón, ácido poliláctico), un elastómero (por ejemplo, elastómero termoplástico (TPE) o cualquier mezcla de los mismos. Más preferiblemente, el material polimérico comprende un polímero de cicloolefina (COP) (por ejemplo, Zeonor<sup>MR</sup>) o un elastómero termoplástico (TPE).

El sello puede comprender cualquier polímero o metal que se pueda fraguarse en forma líquida para producir un polímero o metal que sea más duro que el sustrato polimérico y lo suficientemente duro para imprimir el patrón ordenado en el sustrato polimérico. Si se usa un metal, el metal en su estado líquido no debe estar lo suficientemente caliente como para fundir el sustrato duro y la película polimérica. Preferiblemente, se usa un polímero fraguable y el polímero es un polímero curable, preferiblemente un polímero termoestable curable. El polímero para el sello puede ser fraguable o curable térmicamente, químicamente o con luz. Los polímeros fotocurables, especialmente los curados por luz UV, son particularmente preferidos. Algunos ejemplos de polímeros fotocurables incluyen MD-700 y mezcla Darcour<sup>MR</sup>. El sello se utiliza para transferir todas las características del dispositivo para microfluidos al sustrato polimérico en una etapa de procesamiento. La etapa de procesamiento puede involucrar cualquier método adecuado para modelar sustratos poliméricos utilizando moldes o matrices, por ejemplo, estampado en caliente, litografía por nanoimpresión o moldeo por inyección. El sello puede tratarse para facilitar el modelado del sustrato, por ejemplo, tratar los sellos con un agente de liberación puede facilitar la separación del sustrato polimérico modelado del sello. Dado que el sello comprende relieves para todas las características del dispositivo para microfluidos, el dispositivo para microfluidos se puede formar completamente en una etapa, lo que da como resultado un dispositivo monolítico que tiene todas las características del dispositivo integrado en el sustrato polimérico. Además, el sello se puede reutilizar para hacer más dispositivos y el uso del sello proporciona un patrón y consistencia dimensional entre los dispositivos producidos en diferentes procesos de producción. Estas son ventajas claras sobre los procesos de la técnica anterior para producir dispositivos para microfluidos.

El sello se puede fabricar a partir de un molde maestro transfiriendo características del molde maestro al polímero fraguable. El molde maestro comprende un sustrato duro y una o más membranas colocadas sobre el sustrato duro. El sustrato duro puede comprender un metal, una oblea de silicio, un sustrato de vidrio o un polímero duro. El término "sustrato duro" se refiere a un sustrato que es más duro que las membranas colocadas sobre el sustrato. Preferiblemente, el sustrato duro comprende un polímero duro, por ejemplo, un polímero de cicloolefina (por ejemplo, Zeonor<sup>MR</sup>), un polimetilmetacrilato (PMMA), un policarbonato (PC) o una polieterecetona (PEEK). Las una o más membranas comprenden películas poliméricas de un polímero blando, por ejemplo, polidimetilsiloxano (PDMS), un polímero termoplástico blando (por ejemplo, una poliolefina blanda) o un elastómero termoplástico blando (por ejemplo, Kraton<sup>MR</sup>, Mediprene<sup>MR</sup>, CL-30 o estireno-etileno-butadieno-estireno (SEBS)). Las películas poliméricas son preferiblemente películas de elastómero termoplástico blando (TPE). El término "polímero blando" se refiere a un polímero que es más blando que el sustrato duro.

Uno o más patrones ordenados que comprenden elementos a escala nanométrica se graban sobre el sustrato duro. El grabado puede realizarse por cualquier medio adecuado apropiado para el sustrato duro. Por ejemplo, el grabado puede realizarse con láseres, con bombardeo iónico o con grabado químico, por ejemplo, grabado iónico reactivo, grabado iónico reactivo profundo, grabado químico en húmedo, litografía por haz de electrones, litografía por nanoimpresión, fresado por haz de iones, ablación láser o litografía de interferencia. Las membranas comprenden películas poliméricas que tienen una superficie sobre la cual se han micromodelado las características de escala micrométrica y/o escala mesométrica. El modelado de las películas poliméricas se puede realizar por cualquier medio adecuado, por ejemplo, estampado en caliente, moldeo por inyección, litografía por nanoimpresión o replicación en rodillo. Las características de escala micrométrica y/o escala mesométrica en las membranas definen uno o más microcanales y/o cámaras para microfluidos que eventualmente se crearán en el dispositivo final para microfluidos. Una o más de las características modeladas en la película polimérica pueden ser agujeros pasantes que están alineados para exponer uno o más patrones ordenados en el sustrato duro. Los agujeros pasantes tienen la forma de las características para microfluidos (por ejemplo, microcanales, cámaras para microfluidos, micropilares, etc.) que están destinados a portar los patrones ordenados en el dispositivo final.

Las membranas se colocan sobre el sustrato duro de modo que las superficies que tienen las características de escala micrométrica también estén expuestas. Se puede apilar más de una membrana sobre el sustrato duro y los agujeros pasantes alineados con los patrones ordenados para obtener las características microestructurales deseadas en el dispositivo. El uso de membranas apiladas es particularmente útil para formar características microestructurales, tales como micropilares, que tienen una superficie superior cubierta con los elementos a escala nanométrica. Cuando se colocan las membranas en el sustrato duro, se puede lograr un sello alrededor de los agujeros pasantes aplicando

suficiente presión para sellar los bordes de la membrana que rodea los agujeros pasantes contra el sustrato duro.

El molde maestro así formado se puede usar para fabricar el sello colocando el polímero fraguable en los agujeros pasantes y en la superficie de la membrana en la que las características de escala micrométrica y/o escala mesométrica han sido micromodeladas. El polímero fraguable normalmente se vierte o se inyecta en forma líquida sobre y dentro del molde maestro y luego se fragua como se describió anteriormente. De esta manera, el polímero fraguable está en contacto con las características de la membrana y el patrón ordenado sobre el sustrato duro, por lo que cuando el polímero fraguable se endurece, las características de escala micrométrica y/o escala mesométrica y el patrón ordenado de elementos a escala nanométrica se transfieren al polímero fraguado. Una vez que el polímero fraguable se ha endurecido, el sello así fabricado se puede desmoldar y luego usar para modelar el sustrato polimérico para formar el dispositivo final. Por lo tanto, el molde maestro es una réplica exacta del dispositivo final, y el sello es el peaje utilizado para transferir el patrón en el molde maestro al sustrato polimérico para producir el dispositivo final. Una ventaja de la presente invención es que cuando se necesita usar un diseño de canal diferente con el mismo patrón ordenado de elementos a escala nanométrica, el nuevo molde maestro se puede fabricar fácilmente deslaminando las membranas blandas del sustrato duro y reemplazando las membranas con membranas que tienen el nuevo diseño.

La presente invención proporciona ventajosamente sistemas monolíticos integrados de bajo costo para microfluidos con capacidad de multiplexación (por ejemplo, mediante válvulas, bombeo) para un control preciso de las condiciones de cultivo celular que pueden integrar simultáneamente técnicas plasmónicas mejoradas sin marcadores, como la resonancia de plasmones de superficie (SPR) (por ejemplo, SPR en modo de reflexión, SPR en modo de transmisión, resonancia de plasmón superficial localizada (LSPR)) o dispersión Raman mejorada en la superficie (SERS). El presente sistema monolítico integrado para microfluidos a base de polímeros tiene micro y nanoestructuras que proporcionan señales topográficas para la unión celular y el cultivo para controlar el comportamiento celular al tiempo que permite el monitoreo del comportamiento celular, la motilidad, la unión, la viabilidad, las interacciones de biomoléculas o cualquier combinación de éstas utilizando detección plasmónica. El sistema se fabrica utilizando un proceso simple, robusto y rentable en una sola etapa.

El sistema presente es ventajoso tanto para los procesos convencionales como para los recientemente informados empleados para el cultivo celular y el monitoreo del comportamiento celular, ya que el sistema actual se integra en un solo sustrato biocompatible monolítico, tanto como una superficie nanoestructurada requerida para el monitoreo de la respuesta plasmónica, como una red de microcanales para control preciso del entorno celular, con ventajas adicionales de bajo consumo de volumen, fabricación rápida a bajo costo de moldes con diseños de canales para microfluidos fácilmente intercambiables, capacidad de producción en masa y detección en tiempo real sin marcas *in situ* de la respuesta celular, viabilidad, comportamiento y enlace biomolecular mediante SPR mejorado (SPR en modo de reflexión, SPR en modo de transmisión, LSPR) o SERS.

La presente invención tiene aplicación para problemas tales como el cribado molecular u objetivos celulares, la identificación celular, el cribado de células individuales para la expresión de ARN o proteínas, el monitoreo de la respuesta celular a diferentes estímulos (químicos, topográficos, flujos, etc.), el cribado de diagnóstico genético a nivel de células individuales, o realizando estudios de transducción de señal de células individuales.

Otras características de la invención se describirán o se harán evidentes en el transcurso de la siguiente descripción detallada.

#### Breve descripción de los dibujos

Con el fin de que la invención pueda entenderse más claramente, las realizaciones de la misma se describirán ahora detalladamente a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La Fig. 1 representa un diagrama esquemático de un proceso de la presente invención para producir un sistema monolítico integrado nanoplasmonico de cultivo celular para microfluidos.

La Fig. 2a-d representa esquemas de sección transversal de un sistema de cultivo celular nanoplasmonico nanoestructurado para microfluidos, en los que (a) es una sección transversal de una cámara a través de un canal de perfusión y un conducto de perfusión, (b) es una sección transversal de una cámara a través de un canal de carga celular, (c) es una sección transversal a través de una cámara que muestra micropilares integrados con superficie superior nanoestructurada y (d) es una sección transversal a través de una cámara que muestra un elemento microóptico integrado en el lado inferior del sustrato de capa de flujo.

La Fig. 2e-f representa vistas en tres dimensiones del fondo de la cámara representado en la Fig. 2a que contiene micropilares con un área de superficie superior nanoestructurada utilizada para (e) controlar la unión/motilidad de las células y (f) estudiar las interacciones célula-sustrato.

La Fig. 3 muestra micrografías de SEM de estructuras fabricadas que muestran (a) diferentes nanoestructuras nanoplasmonicas posibles que incluyen nanoagujeros, nanopilares, nanopostes y nanorejillas, (b y c) micro y nanoestructuras tridimensionales definidas en un solo sustrato utilizando un proceso de fabricación de una etapa de la presente invención.

La Fig. 4 muestra un esquema de un sistema de cultivo celular nanoplasmonico para microfluidos con capacidad de detección plasmónica.

Descripción de realizaciones preferidas

Ejemplo 1: Proceso para fabricar un sistema de cultivo celular monolítico integrado nanoplasmonico para microfluidos

5 Un sistema de cultivo celular monolítico integrado nanoplasmonico para microfluidos de la presente invención se puede producir generalmente como se muestra en la Fig. 1, que ilustra el proceso que muestra una cámara de una sola célula y ninguno de los canales, conductos, válvulas u otras características para microfluidos para mayor claridad. Una película de elastómero termoplástico blando se estampa en caliente para formar características de escala micrométrica y escala mesométrica (microcanales, conductos, cámaras, etc.) en la membrana 10 de TPE, incluido el agujero 11 pasante. Esto se realiza a una presión aplicada que varía de 5 kN a 15 kN, durante 5-30 minutos, a una temperatura en un intervalo de 100°C a 160°C, dependiendo de las características deseadas. El sustrato 12 Zeonor<sup>MR</sup> duro está modelado por estampado en caliente a una presión aplicada de 10 kN a 20 kN durante 10-30 minutos a una temperatura que varía de 140°C a 170°C, dependiendo del grado específico de Zeonor<sup>MR</sup> para formar una matriz regular de elementos 13 de rejilla a escala nanométrica. Con las características de escala micrométrica y escala mesométrica hacia arriba, la membrana de TPE se coloca sobre el sustrato Zeonor<sup>MR</sup> de manera que el agujero pasante esté alineado con los elementos de la rejilla. La membrana luego se une de manera reversible al sustrato Zeonor<sup>MR</sup> para sellar la membrana alrededor del agujero pasante contra el sustrato Zeonor<sup>MR</sup> para formar el molde 14 maestro a temperatura ambiente. El polímero 15 fotocurable se vierte en el agujero pasante y sobre la membrana para cubrir la membrana y las características de escala micrométrica y escala mesométrica del mismo. La placa 16 de soporte de vidrio o metal se coloca sobre la parte superior del polímero fotocurable y el polímero fotocurable se expone luego a la radiación 17 UV para curar el polímero. Cuando se utiliza una placa de soporte de metal, el conjunto se volteo al revés para curar el polímero con UV. Después del curado, el molde 14 maestro y la placa 16 de vidrio (o metal) se retiran para proporcionar el sello 18 de trabajo que tiene relieves 19 que comprenden una imagen inversa de las características de escala micrométrica y escala mesométrica y la matriz regular de elementos de rejilla a escala nanométrica. El sello de trabajo se utiliza luego para estampar en caliente el sustrato 20 del polímero termoplástico "duro o blando" (por ejemplo, Zeonor<sup>MR</sup>, PMMA o un elastómero termoplástico como CL-30, Mediprene<sup>MR</sup>, etc.) para proporcionar, en una sola etapa, un sistema de cultivo celular monolítico para microfluidos con características 21 de escala micrométrica y escala mesométrica y una matriz regular de elementos 22 de rejilla a escala nanométrica en su interior.

30 Los sistemas de cultivo celular para microfluidos producidos de esta manera pueden comprender cualquier número de cámaras de cultivo celular, microcanales, conductos, válvulas, etc. Dibujos esquemáticos más detallados de una cámara de cultivo celular en el sistema de cultivo celular monolítico integrado nanoplasmonico para microfluidos producido por este proceso se muestran en la Fig. 2. Haciendo referencia a las Figs. 2a a 2d, la capa 40 de flujo del sistema de cultivo celular comprende canales 41 de carga celular, canales 42 de perfusión, conductos 43 de perfusión y cámaras 44 de cultivo, que tienen diferentes dimensiones dictadas por la aplicación específica. Como se muestra en las Figs. 2a, 2b y 2d, la parte inferior de las cámaras de cultivo celular puede estar modelada con una matriz ordenada de nanoestructuras 45, en este caso un nanorejilla. Alternativamente, como se muestra en la Fig. 2c, la parte inferior de la cámara de cultivo celular puede tener micropilares 46 integrados que tienen nanoestructuras 47 modeladas en la misma. Como se muestra en las Figs. 2e a 2f, tales micropilares nanoestructurados pueden proporcionar dos niveles de señales topográficas (espaciales y mecánicas) a escala micro y nanométrica para controlar la unión/movimiento (aislamiento o confinamiento de células) de las células 48, al tiempo que conservan la capacidad de detección plasmónica para el estudio del comportamiento celular e interacciones. Además, como se muestra en la Fig. 2d, la capa 40 de flujo se puede fabricar para incluir elementos microópticos, tales como microlentes 49 de nanorejilla 45, para un mejor acoplamiento de la luz o una mejor eficiencia de recolección de luz, dependiendo del esquema de interrogación particular (por ejemplo, transmisión o reflexión de SPR, LSPR o SERS).

La capa 50 de control y la membrana 51 delgada se pueden colocar encima de la capa 40 de flujo para controlar el flujo de fluido en los canales y conductos del sistema de cultivo celular para microfluidos. La capa 50 de control contiene una red de canales utilizados para suministrar presión en la membrana 51 delgada intercalada entre la capa de control y la capa de flujo para cerrar las válvulas y controlar el flujo de fluido. Si bien para ciertas aplicaciones, el uso de válvulas para el manejo de fluidos puede no ser necesario, para una integración de alto nivel en el sistema de microfluidos es de gran importancia para permitir el direccionamiento bidimensional de cada cámara individual. La integración monolítica de nanoestructuras con la capa de flujo permite el uso de la capa de control para la integración de válvulas que de otra manera serían imposibles al simplemente ensamblar una capa de SPR nanoestructurada inferior con una estructura de microfluido superior.

55 Con referencia a la Fig. 3, se muestran micrografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) de la muestra de posibles nanoestructuras y su integración monolítica dentro de cámaras para microfluidos del sistema de cultivo celular para microfluidos. En la Fig. 3a, de izquierda a derecha se muestran nanoagujeros, nanopilares, nanopostes y nanorejillas. En cada una de las Figs. 3b y 3c de izquierda a derecha se muestran aumentos sucesivos de micrografías de SEM de microestructuras y nanoestructuras tridimensionales monolíticas fabricadas utilizando el presente método, donde el SEM a la izquierda muestra las microestructuras, el SEM a la derecha muestra las nanoestructuras en una microestructura y el SEM en el medio tiene un aumento entre la izquierda y la derecha. En 3b y 3c, el SEM en el medio

tiene un aumento 2,5 veces mayor que el SEM a la izquierda, y el SEM en la derecha tiene un aumento 20 veces mayor que el SEM en el medio. El campo de visión para el SEM a la izquierda es de 500  $\mu\text{m}$ .

Ejemplo 2: Uso de un sistema de cultivo celular monolítico integrado nanoplasmonico para microfluidos en la detección plasmónica

5 En la operación, un sistema de cultivo celular monolítico integrado nanoplasmonico para microfluidos de la presente invención emplea un flujo impulsado por presión para transportar células en suspensión desde una pluralidad de depósitos a través de una pluralidad de canales de carga celular hasta una pluralidad de cámaras de cultivo celular nanoestructuradas mediante cierre de válvulas de los canales de perfusión y apertura de válvulas en los canales de carga celular. Una pluralidad de líneas celulares se cargan utilizando una pluralidad de reservorios diferentes. Luego de la unión inicial de la celda en la parte inferior de las cámaras nanoestructuradas, las válvulas en los canales de carga de células se cierran, y se inyectan continuamente medios nuevos en cada uno de los canales de perfusión. Los múltiples conductos de perfusión de alta resistencia aseguran una distribución equitativa de los medios dentro de la cámara al tiempo que minimizan el esfuerzo de corte sobre las células.

15 Una vez que las cámaras de cultivo celular se cargan con células, se toman lecturas de resonancia plasmónica utilizando métodos de detección óptica de resonancia de plasmón de superficie en modo de reflexión o de transmisión, resonancia de plasmón de superficie localizada o espectroscopia Raman mejorada de superficie. La Fig. 4 ilustra la configuración del dispositivo 60 de microfluidos en relación con la fuente 62 de luz y el detector 64 del método de detección óptica. Con estos métodos de detección, la interacción célula-sustrato se puede monitorear *in situ*, en tiempo real y sin marcadores, analizando el cambio en los picos plasmónicos de la respuesta del sustrato nanoestructurado. 20 Los desplazamientos resultantes en los picos plasmónicos para la resonancia de plasmón de superficie (SPR) y la resonancia de plasmón de superficie localizada (LSPR) o la espectroscopia de Raman mejorada de superficie (SERS) se ilustran a la izquierda y a la derecha, respectivamente, en la Fig. 4.

Además, el presente diseño permite monitorizar la respuesta celular debido a diferentes señales bioquímicas que pueden complementarse en los medios de perfusión. Además, antes de la carga celular, utilizando los mismos 25 microcanales, la parte inferior de las cámaras se puede funcionalizar mediante el flujo de diferentes productos químicos y/o especies biológicas para monitorear las interacciones célula-sustrato o para la detección de objetivos bioquímicos excretados o extraídos de la célula.

Referencias:

- Balasundaram G, Webster TJ. (2007) J. Biomed. Mater. Res., Part A. 80a, 602-611.
- 30 Barbucci R, Pasqui D, Wirsén A, Affrossman S, Curtis A, Tetta C. (2003) J. Mater. Sci. 14, 721-725.
- Bedner et al. (1998) Cytometry. 33, 1-9.
- Blümmel J, Perschmann N, Aydin D, Drinjakovic J, Surrey T, Lopez-Garcia M, Kessler H, Spatz JP. (2007) Biomaterials. 28, 4739-4747.
- Cavalcanti-Adam EA, Volberg T, Micoulet A, Kessler H, Geiger B, Spatz JP. (2007) Biophys. J. 92, 2964-2974.
- 35 Cavalcanti-Adam EA, Aydin D, Hirschfeld-Warneken VC, Spatz JP. (2008) HFSP J. 2, 276-285.
- Curran JM, Stokes R, Irvine E, Graham D, Amro NA, Sanedrin RG, Jamil H, Hunt JA. (2010) Lab on a Chip. 10, 1662-1670.
- Curtis AS, Dalby MJ, Gadegaard N. (2006) J. R. Soc. Interface. 3, 393-398.
- 40 Dalby MJ, Gadegaard N, Tare R, Andar A, Riehle MO, Herzyk P, Wilkinson CD, Oreffo RO. (2007a) Nat. Mater. 6, 997-1003.
- Dalby MJ, Biggs MJ, Gadegaard N, Kalna G, Wilkinson CD, Curtis AS. (2007b) J. Cell. Biochem. 100, 326-338.
- Dalby MJ, Gadegaard N, Curtis AS, Oreffo RO. (2007c) Curr. Stem Cell Res. Ther. 2, 129-138.
- Dalby MJ, Gadegaard N, Tare R, Andar A, Riehle MO, Herzyk P, Wilkinson CD, Oreffo RO. (2007d) Nat. Mater. 6, 997-1003.
- 45 Dalby MJ, Andar A, Nag A, Affrossman S, Tare R, McFarlane S, Oreffo RO. (2008) J. R. Soc. Interface. 5, 1055-1065.
- Dalby MJ. (2009) Nanomedicine. 4, 247-248.
- Ernsting MJ, Labow RS, Santerre JP. (2007) J. Biomed. Mater. Res., Part A. 83a, 759-769 .
- Extrand CW, Wright M. (2005) Microfluidic Device with Ultraphobic Surfaces. Patente de los Estados Unidos No. 6.923.216 emitida el 2 de agosto de 2005.

Fayet al. (1991) *Biochemistry*. 30, 5066-5075.

Fonverne A, Dijon J, Ricoul F, Rouviere E. (2009) Method of manufacturing a microfluid component comprising at least one microchannel filled with nanostructures. Publicación de la patente europea EP 2042467 publicada el 1 de abril de 2009.

5 Griffin et al. (2003) *Febs Letters*. 546, 233-236.

Hochbaum A, Aizenberg J. (2010) *Nanoletters*. DOI:10.1021/nl1022290k.

Jin Q, Zheng Y, Wu J, Shao J, Zhao J. (2010) Microfluidic cell array chip for high-throughput medicament screening, method and use fabricated in PDMS using modular SU-8 mold. Publicación de la patente china CN 101629143 publicada el 20 de enero de 2010.

10 Kimura K, Hattori A, Usui Y, Kitazawa K, Naganuma M, Kawamoto K, Teranishi S, Nomizu M, Nishida T. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci*. 48, 1110-1118.

Krutzik et al. (2006) *Nature Methods*. 3, 361-368.

Lee LJ, Yang S, Lai S, Bai Y, Huang W, Juang Y, Gregory SM. (2006) *Advances in Clinical Chemistry*. (Elsevier) páginas 255-295.

15 Lee L, Di Carlo D, Tanner N. (2010) *Microfluidic Methods for Diagnostics and Cellular Analysis*. Publicación de la patente de Estados Unidos US 2010/003666 del 7 de enero de 2010.

Lim CT, Zhang Y. (2007) *Biosensors and Bioelectronics*. 22, 1197-1204.

Malic L, Herrmann M, Hoa XD, Tabrizian M. (2007) *Recent Patents on Engineering*. 1, 71-88.

Marquette C, Blum L. (2006) *Biosensors and Bioelectronics*. 21, 1424-1433.

20 Myers FB, Lee LP. (2008) *Lab on a Chip*. 8, 2015-2031.

Nolan et al. (1998) *Nature Biotechnology*. 16, 633-638.

Regehr KJ, et al. (2009) *Lab Chip*. 9, 2132-2139.

Salber J, Grater S, Harwardt M, Hofmann M, Klee D, Dujic J, Jinghuan H, Ding J, Kippenberger S, Bernd A, Groll J, Spatz JP, Moller M. (2007) *Small*. 3, 1023-1031.

25 Song Y. (2009) Preparation process of single nanoparticle and array-based biological molecule detector thereof. Publicación de la patente china CN 101571536 del 4 de noviembre de 2009.

Soper SA, McCarley RL, Chen G, Shadpour H. (2008) *Polymeric Nanopillars and Nanotubes, Their Manufacture and Uses*. Publicación internacional de la patente WO 2008/097360 del 14 de Agosto de 2008.

Weigl B, Domingo G, LaBarre P, Gerlach J. (2008) *Lab on a Chip*. 8, 1999-2014.

30 Zhang Y, Ozdemir P. (2009a) *Analytica Chimica Acta*. 638, 115-125.

Zhang C, Xing D, Li Y. (2009b) *Biotechnology Advances*. 25, 483-514.

Otras ventajas que son inherentes a la estructura son obvias para un experto en la técnica. Las realizaciones se describen aquí ilustrativamente y no pretenden limitar el alcance de la invención como se reivindica.

**REIVINDICACIONES**

1. Un proceso de producción de un sustrato (20) polimérico modelado que comprende:
 

5 grabar uno o más patrones ordenados en un sustrato (12) duro, los patrones ordenados comprenden matrices ordenadas de elementos (13) a escala nanométrica que tienen dimensiones de sección transversal en un intervalo de 10 nm a 1.000 nm, teniendo las matrices una distancia de separación entre sus elementos respectivos donde la relación entre la dimensión de la sección transversal y la distancia de separación es mayor que 0,2;

10 micromodelado de una película polimérica para formar una membrana (10) que comprende una primera superficie que tiene un patrón de características a escala micrométrica y/o escala mesométrica para definir uno o más canales y/o cámaras, una o más características a escala micrométrica y/o escala mesométrica que comprenden agujeros (11) pasantes y una o más de las características de escala micrométrica y/o mesométrica que no son agujeros pasantes;

colocar la membrana (10) sobre el sustrato (12) duro con una superficie opuesta a la primera superficie contra el sustrato (12) duro, los agujeros (11) pasantes alineados para exponer los uno o más patrones ordenados, y aplicar presión suficiente para sellar los bordes de la membrana (10) que rodean los agujeros (11) pasantes contra el sustrato (12) duro;

15 colocar un polímero (15) o metal líquido fraguable en los agujeros (11) pasantes y sobre la primera superficie y colocar el polímero (15) o metal líquido fraguable para formar un sello (18), comprendiendo el sello relieves (19) a escala micrométrica y/o escala mesométrica para definir uno o más canales y/o cámaras para microfluidos y además comprende uno o más patrones de relieve a escala nanométrica en los relieves de escala micrométrica y/o escala mesométrica que complementan los uno o más patrones ordenados;

20 modelar un sustrato (20) polimérico estampando el sustrato polimérico con el sello para formar los uno o más canales y/o cámaras (21) para microfluidos en el sustrato polimérico y para formar, en una o más superficies del sustrato polimérico, uno o más patrones (22) ordenados de elementos a escala nanométrica que son sustancialmente idénticos a los uno o más patrones ordenados grabados sobre el sustrato (12) duro; y

25 metalizar los elementos a escala nanométrica en una o más superficies del sustrato polimérico para la lectura de resonancia plasmónica.
2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el tamaño, el espaciado, la geometría o cualquier combinación de los elementos (13) a escala nanométrica en los patrones ordenados tienen desviaciones estándar de sus respectivos promedios de no más del 3%.
3. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la relación entre la dimensión de la sección transversal y la distancia de separación está en un intervalo de 0,2 a 1,5; o de 0,5 a 1.
- 30 4. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que:
 

el sustrato (12) duro comprende un polímero de cicloolefina;

la película polimérica comprende un elastómero termoplástico; y

35 el sustrato (20) polimérico comprende un polímero de cicloolefina, un polímero termoplástico, un polímero biodegradable, un elastómero, polidimetilsulfona (PDMS) o cualquiera de sus mezclas, en el que el sustrato (20) polimérico comprende preferiblemente un polímero de cicloolefina o un elastómero termoplástico.
5. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que los elementos a escala nanométrica se modelan en microestructuras para proporcionar dos niveles de señales topográficas, en el que los elementos (13) a escala nanométrica comprenden uno o más de nanopilares, nanopostes, nanopuntos, nanobarras, nanopirámides, nanomedialunas, nanodiscos, nanocúpulas, nanoagujeros, nanorejillas y nanosurcos, y en el que la relación de aspecto de elementos individuales a escala nanométrica (13) está en un intervalo de 10:1 a 1:10.
- 40 6. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las características de escala micrométrica y/o escala mesométrica definen además una o más válvulas, conductos, entradas o salidas.
7. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que al menos una membrana adicional que comprende un patrón de características a escala micrométrica y/o escala mesométrica para definir uno o más canales y/o cámaras se apila en la membrana colocada sobre el sustrato (12) duro.
- 45 8. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el sello se forma a partir de un polímero (15) fraguable, el polímero (15) fraguable comprende un polímero fotocurable y el polímero fotocurable se cura exponiendo el polímero fotocurable a luz ultravioleta.
- 50 9. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que al menos una serie ordenada de elementos (13) a escala nanométrica está en una cámara para microfluidos.

- 5 10. Un dispositivo para microfluidos que comprende un sustrato (40) polimérico monolítico modelado con uno o más canales (42) de escala micrométrica en comunicación fluida con una o más cámaras (44) para microfluidos, una superficie en el sustrato polimérico que comprende una matriz ordenada de elementos (45, 47) a escala nanométrica que tienen dimensiones de sección transversal en un intervalo de 10 nm a 1.000 nm, teniendo la matriz una distancia de separación entre los elementos donde la relación de la dimensión de la sección transversal con respecto a la distancia de separación es mayor que 0,2, en donde los elementos de escala nanométrica se metalizan para la lectura de resonancia plasmónica en modo de reflexión o transmisión, y en el que la matriz ordenada de elementos a escala nanométrica está en al menos uno, pero no todos, de los uno o más canales y las una o más cámaras.
- 10 11. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el sustrato (40) polimérico comprende un polímero de cicloolefina, un polímero termoplástico, un polímero biodegradable, un elastómero, polidimetilsiloxano (PDMS) o cualquiera de sus mezclas.
- 15 12. El dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, en el que el dispositivo es un sistema de cultivo celular y comprende una o más válvulas, conductos (43), entradas o salidas, en el que al menos una de las matrices ordenadas de elementos (45) a escala nanométrica están en al menos una de las cámaras para microfluidos, y/o los elementos (47) a escala nanométrica están modelados en microestructuras (46) para proporcionar dos niveles de señales topográficas.
- 20 13. El dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que los elementos (45, 47) a escala nanométrica comprenden uno o más de nanopilares, nanopostes, nanopuntos, nanobarras, nanopirámides, nanomedialunas, nanodiscos, nanocúpulas, nanoagujeros, nanorejillas y nanosurcos con la relación de aspecto de elementos a escala nanométrica individuales en un intervalo de 10:1 a 1:10 y en el que su relación de dimensión transversal con respecto a la distancia de separación está en un intervalo de 0,2 a 1,5, preferiblemente en un intervalo de 0,5 a 1.
- 25 14. Uso del dispositivo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, para la lectura de resonancia plasmónica de células.
- 30 15. El uso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la lectura de resonancia plasmónica es resonancia de plasmón de superficie en modo de reflexión, resonancia de plasmón de superficie en modo de transmisión, resonancia de plasmón de superficie localizada o espectroscopia Raman mejorada en superficie.
16. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 15 para monitorizar el comportamiento celular, la motilidad, la unión, la viabilidad, las interacciones de biomoléculas o cualquier combinación de las mismas.
17. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16 para cribar objetivos moleculares o celulares, identificación celular, cribar células individuales para la expresión de ARN o proteínas, monitorizar la respuesta celular a diferentes estímulos, cribar el diagnóstico genético a nivel de una célula individual o realizar estudios de transducción de señales de células individuales.

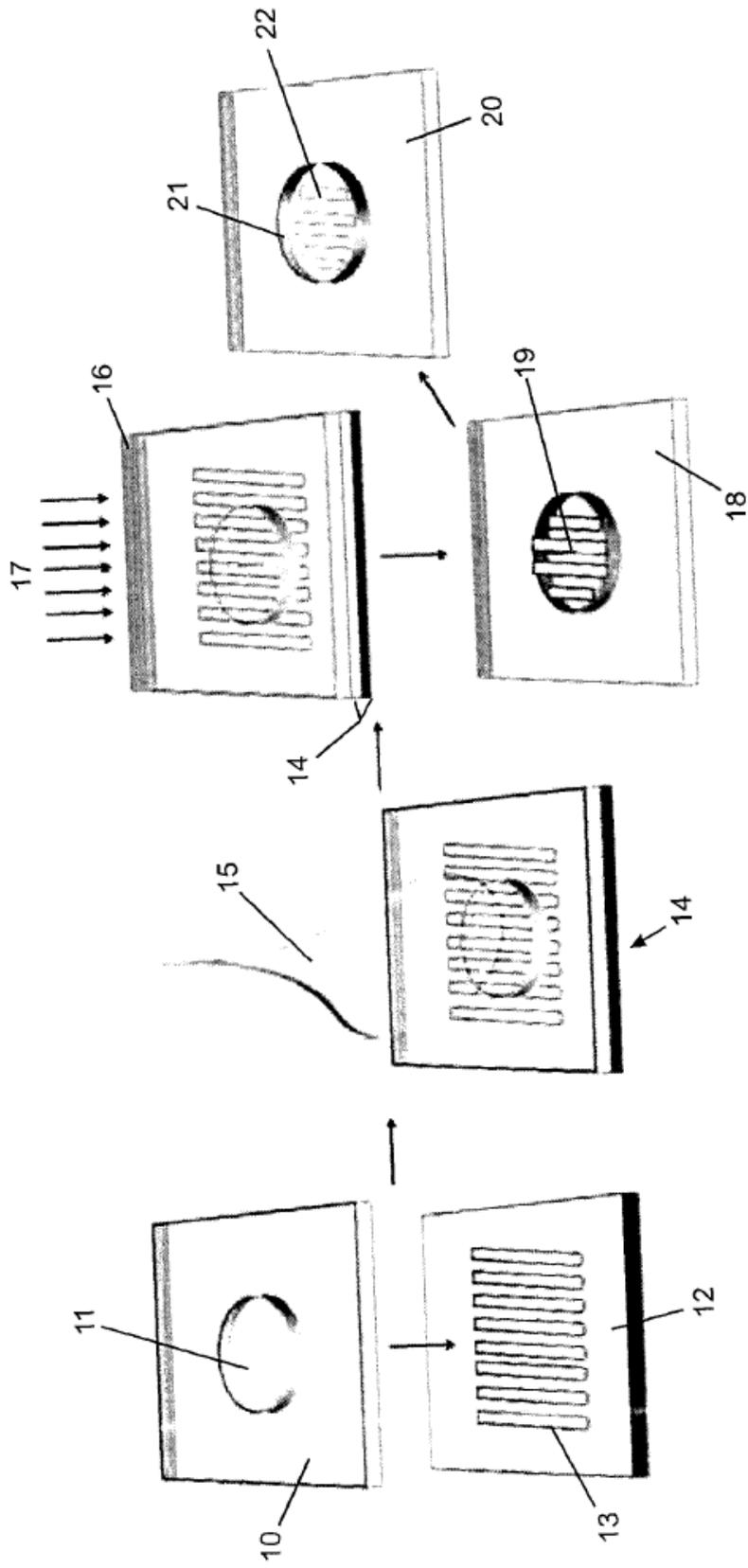


Fig. 1

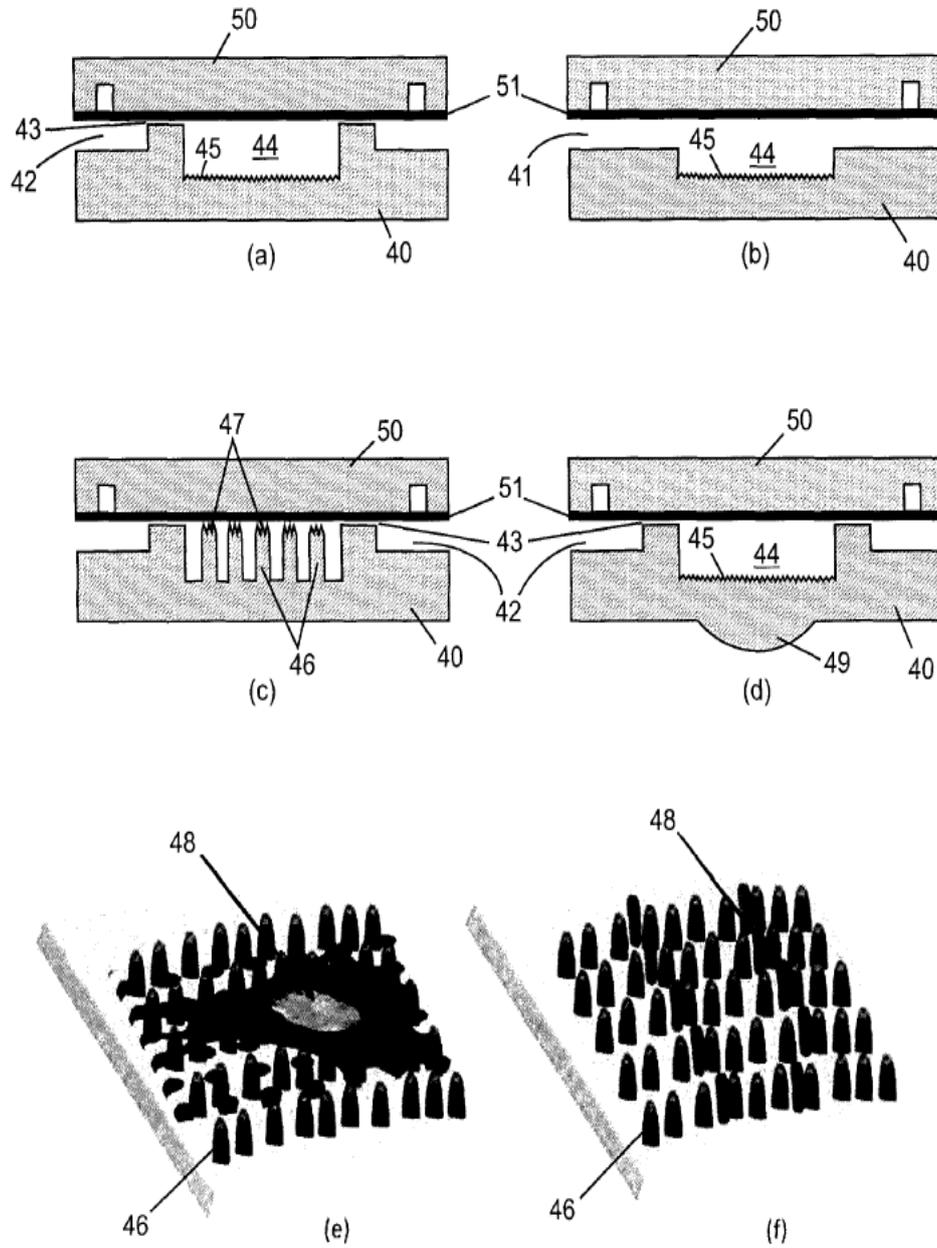


Fig. 2

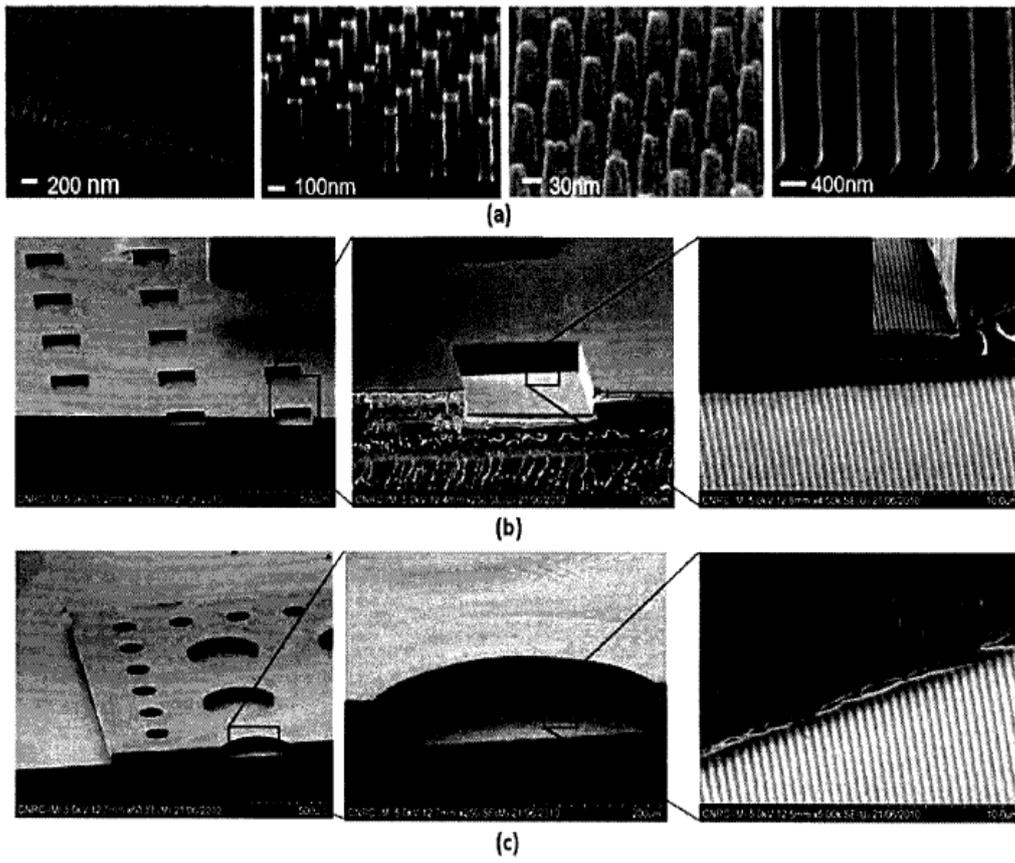


Fig. 3

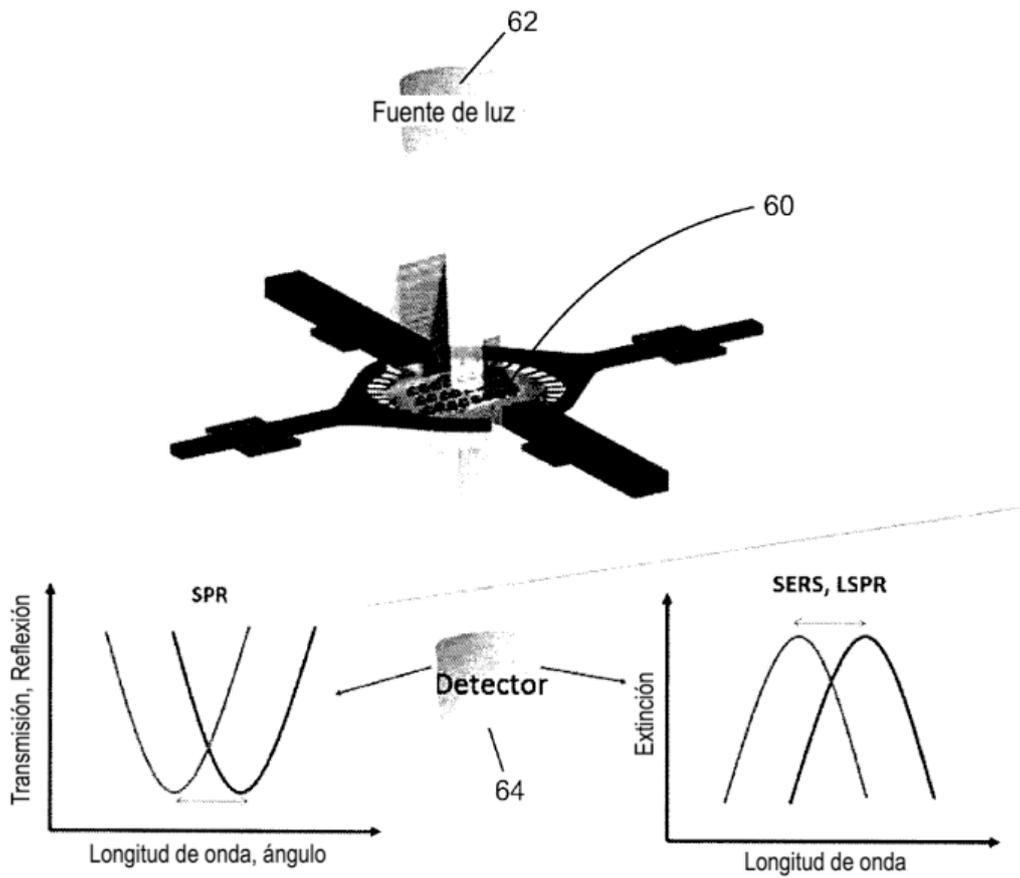


Fig. 4