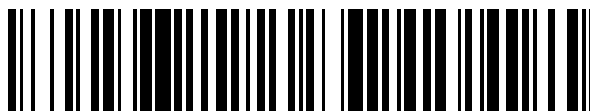


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 693**

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

G01N 21/05 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.11.2014 PCT/IB2014/066102**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2015 WO15087178**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2014 E 14821282 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 3080589**

54 Título: **Sistema de evacuación de gas para biosensor nanofluídico**

30 Prioridad:

13.12.2013 WO PCT/IB2013/060935

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

18.11.2019

73 Titular/es:

**ABIONIC SA (100.0%)
Bâtiment B
1015 Lausanne, CH**

72 Inventor/es:

**DURAND, NICOLAS;
MÄRKI, IWAN y
GEISSBÜHLER, MATTHIAS**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 731 693 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 de evacuación de gas para biosensor nanofluídico

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a biosensores nanofluídicos con al menos una abertura lateral. Este tipo de biosensor puede usarse ventajosamente para la cuantificación rápida y precisa de muestras biomédicas y biológicas.

Antecedentes de la invención

10 Los biosensores nanofluídicos se definen como sistemas fluídicos con confinamientos de tamaño nanométrico y / o aberturas laterales. Las aplicaciones incluyen la cuantificación de la presencia de biomoléculas en una solución. Una mayoría de los desarrollos actuales de biosensores nanofluídicos están destinados a aplicaciones en bioingeniería y biotecnología. En el alcance de esta invención, los biosensores se utilizan para cuantificar la presencia de biomoléculas en solución para aplicaciones de diagnóstico *in vitro*.

15 La solicitud de patente suiza CH 01824/09 describe biosensores con aberturas laterales para la detección de interacciones biomoleculares, la solicitud PCT IB2010/050867 describe su uso con sistemas ópticos simples y la solicitud PCT IB2012/050527 describe el método para disminuir el tiempo de incubación y aumentar la sensibilidad de los biosensores descritos. La difusión de biomoléculas en estas configuraciones es lenta y requiere o bien largos tiempos de espera para lograr condiciones de medición estables, o bien soluciones altamente concentradas para la observación de las interacciones biomoleculares.

El documento WO2012/120387 describe un biosensor nanofluídico que comprende una nano ranura con un área funcionalizada y unas aberturas de entrada y salida.

20 El artículo científico de D. Meng, "Una placa de desgasificación con captura por burbujeo hidrofóbico y venteo distribuido para dispositivos microfluídicos" en *J. Micromech. Microeng*, 16 (2006), páginas 419 – 424 muestra un dispositivo microfluídico con un sistema de evacuación de gas que comprende orificios pasantes hidrofóbicos.

25 Los biomarcadores, también denominados marcadores biológicos, son sustancias utilizadas como indicadores específicos para detectar la presencia de biomoléculas. Esta es una característica que se mide y evalúa objetivamente como un indicador de procesos biológicos, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica.

Las prácticas actuales para la detección de biomoléculas específicas se pueden dividir en dos categorías: (a) las técnicas con marcadores y (b) las técnicas sin marcadores.

30 Entre las técnicas con marcadores, las más ampliamente utilizadas son la fluorescencia, la colorimetría, la radiactividad, la fosforescencia, la bioluminiscencia y la quimioluminiscencia. Las perlas magnéticas funcionalizadas también se pueden considerar técnicas con marcadores. Las ventajas de las técnicas con marcadores son la sensibilidad en comparación con los métodos sin marcadores y el reconocimiento molecular debido al marcado específico.

35 Entre las técnicas sin marcadores, las más ampliamente utilizadas son los biosensores electroquímicos, que se refieren a sensores amperométricos, capacitivos, conductimétricos o impedimétricos, que tienen la ventaja de ser rápidos y económicos. Estos miden el cambio en las propiedades eléctricas de las estructuras de los electrodos a medida que las biomoléculas quedan atrapadas o inmovilizadas en el electrodo o cerca del mismo, pero todos estos conceptos carecen de contraste molecular específico, sensibilidad y fiabilidad.

40 El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) es una importante técnica bioquímica que se utiliza principalmente para detectar la presencia de biomoléculas solubles en el suero y, por lo tanto, se utiliza ampliamente como herramienta de diagnóstico en medicina y en verificaciones de control de calidad en diversas industrias. Sin embargo, el análisis ELISA es costoso, requiere grandes cantidades de solución y consume mucho tiempo.

Las otras tecnologías importantes para el diagnósticos biomoleculares son las técnicas de transferencia *Western* y *Northern*, la electroforesis de proteínas y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Sin embargo, estos métodos requieren analitos altamente concentrados y no permiten pruebas de muestras de alto rendimiento.

Objetivos

Es un objetivo de esta invención mejorar la variabilidad de los biosensores nanofluídicos rápidos, los cuales no requieren manipulaciones complejas.

Otro objetivo más de la invención es crear galerías pasantes que permitan la evacuación del gas que puede quedar atrapado en el interior del biosensor durante su llenado por la solución para analizar.

50 Otro objetivo más de la invención es mejorar la sensibilidad de la detección mediante la introducción de un mayor volumen de solución para que fluya a través de la entrada del biosensor (nano ranura).

Resumen de la invención

Esta invención se basa en el descubrimiento de que pueden aparecer varias burbujas de aire en un biosensor nanofluídico si el frente de llenado no es perfectamente homogéneo. Con el fin de evacuar el aire atrapado, se ha inventado un subsistema de evacuación de gas que permite que el aire salga del biosensor.

- 5 Esta invención también se basa en el descubrimiento de que la eliminación de burbujas de aire está mejorando considerablemente la variabilidad inter-biosensores, así como la sensibilidad.

Este subsistema de evacuación de gas de acuerdo con la invención puede estar hecho de material poroso.

Además, esta invención pone de manifiesto la posibilidad de estructurar localmente uno o ambos de los sustratos biosensores con el fin de definir un subsistema de evacuación de gases.

- 10 En el presente texto, el término "subsistema de evacuación de gas" debe entenderse como cualquier sistema que pueda usarse para el propósito previsto. Por ejemplo, puede estar hecho de poros, orificios pasantes o ranuras.

En el alcance de esta invención, se usan nanofluidos debido a su alta relación de superficie a volumen, lo que significa que las superficies incluidas en el volumen de detección, maximizan la probabilidad de las interacciones entre biomoléculas y biomarcadores inmovilizados en las superficies. También reduce considerablemente la señal de fondo de la solución debido a la pequeña porción de sustrato que se encuentra dentro del volumen de detección.

- 15

La invención, por lo tanto, se refiere a un biosensor como se define en las reivindicaciones.

Esta también se refiere a una unidad y a un método que utiliza dicho biosensor. Algunos ejemplos no limitativos de la invención se presentan en los siguientes capítulos. Algunos de esos ejemplos están ilustrados.

Breve descripción de los dibujos

- 20 La Figura 1a es una vista en perspectiva de un sistema de biosensor nanofluídico compuesto por un sustrato inferior 120, una capa separadora 130 y un sustrato superior 110 que contiene poros que lo atraviesan estructurados o no estructurados, y una abertura lateral 210. Se deposita una solución 300 que contiene biomoléculas marcadas con fluorescencia mediante un sistema de pipeta 400 de manera tal que la solución ingresa dentro del biosensor desde la abertura lateral 210. Un sistema óptico 500 basado en un rayo láser 510 se usa típicamente para la medición.

- 25 La Figura 1b es una vista en perspectiva de un sistema de biosensor nanofluídico compuesto por un sustrato inferior 120, una capa separadora 130 y un sustrato superior 111 que contiene poros que lo atraviesan estructurados o no estructurados en una posición definida 150, y una abertura lateral 210. Se deposita una solución 300 que contiene biomoléculas marcadas con fluorescencia mediante un sistema de pipeta 400 de manera que la solución ingresa dentro del biosensor desde la abertura lateral 210. Un sistema óptico 500 basado en un rayo láser 510 se usa típicamente para la medición.

- 30

La Figura 2a muestra una vista superior en sección transversal del sustrato 111 que constituye un biosensor nanofluídico. Una abertura lateral de entrada 210, una nano ranura 230 y una abertura de salida 220 componen el sistema fluídico. Se define el área de medición 231 dentro de la nano ranura. Una vez que el sistema ha alcanzado su equilibrio, la solución se puede encontrar en la abertura lateral de entrada 301, en la nano ranura 302 y en la abertura lateral de salida 303. Se puede formar una burbuja de gas 350 si el frente de flujo de la solución impulsado por el componente de conducción de líquido 140 no es perfectamente uniforme.

- 35

La Figura 2b muestra una vista superior en sección transversal del sustrato 111 que constituye un biosensor nanofluídico. Una abertura lateral de entrada 210, una nano ranura 230 y una abertura de salida 220 componen el sistema fluídico. Se define el área de medición 231 dentro de la nano ranura 230 y los poros que atraviesan el sustrato 150 se definen directamente dentro de la abertura lateral de salida 220. También está presente un componente de conducción de líquido 140 dentro de la abertura lateral de salida 220. Una vez que el sistema ha alcanzado su equilibrio, la solución se puede encontrar en la abertura lateral de entrada 301, la entrada del biosensor (nano ranura) 302 y la abertura lateral de salida 303. Las burbujas de gas no están presentes ya que el gas puede salir a través del sistema de poros 150.

- 40

- 45 La Figura 3a muestra una sección transversal lateral del biosensor nanofluídico definido por dos sustratos 110 y 120, y compuesto por una abertura lateral de entrada 210 y una abertura lateral de salida 220 unidas entre sí por una nano ranura 230. La abertura lateral de salida 220 puede contener un sistema de conducción de líquido 140. El sustrato 110 es completamente poroso con poros que lo atraviesan.

- 50 La Figura 3b muestra una sección transversal lateral del biosensor nanofluídico definido por dos sustratos 111 y 120, y compuesto por una abertura lateral de entrada 210 y una abertura lateral de salida 220 unidas entre sí por una nano ranura 230. La abertura lateral de salida 220 puede contener un sistema de conducción de líquido 140. El sustrato 111 puede estar estructurado para ser localmente poroso con poros que lo atraviesan 150.

La Figura 3c muestra una sección transversal lateral del biosensor nanofluídico definido por dos sustratos 111 y 120, y compuesto por una abertura lateral de entrada 210 y un depósito interno 221 unidos entre sí por una nano ranura 230. El depósito interno 221 puede contener un sistema de conducción de líquido 140. El sustrato 111 puede estar estructurado para ser localmente poroso con poros que lo atraviesan 150.

5 La Figura 3d muestra una sección transversal lateral del biosensor nanofluídico definido por dos sustratos 111 y 120, y compuesto por una abertura lateral de entrada 210 y una abertura lateral de salida 220 unidas entre sí por una nano ranura 230. La abertura lateral de salida 220 puede contener un sistema de conducción de líquido 140. El sustrato 111 puede estar estructurado localmente con orificios o ranuras de paso o hendiduras 151.

10 La Figura 3e muestra una sección transversal lateral del biosensor nanofluídico definido por dos sustratos 111 y 120, y compuesto por una abertura lateral de entrada 210 y una abertura lateral de salida 220 unidas entre sí por una nano ranura 230. La abertura lateral de salida 220 puede contener un sistema de conducción de líquido 140. El sustrato 121 puede estar estructurado para ser localmente poroso con poros que lo atraviesan 150.

15 La Figura 4 muestra una sección transversal lateral del biosensor nanofluídico definido por dos sustratos 111 y 120, y compuesto por una abertura lateral de entrada 210 y una abertura lateral de salida 220 unidas entre sí por un nano ranura 230. Solo uno de los sustratos está estructurado localmente por un área 231 que está funcionalizada por biomarcadores 310 y otras áreas 203 que impiden esa funcionalización. Una solución de reactivo 300 que contiene biomoléculas ingresa a la nano ranura 230 desde la abertura lateral de entrada 210 a la salida lateral de salida 220 y es impulsada por el componente de conducción interna 140. Al alcanzar la abertura lateral de salida 220, la solución 300 que contiene las moléculas a ser detectadas 320 y otras moléculas 330 está llenando los poros estructurados pasantes 152. La figura muestra los poros completamente llenos 153, los poros que se están llenando 154 y los poros a ser llenados 155. El rayo láser 510 controla la concentración de las biomoléculas inmovilizadas 340 en el volumen de detección 520.

Descripción detallada de la invención

25 Como se usa en este documento, el término "biomoléculas" pretende ser un término genérico, que incluye por ejemplo (pero no está limitado a) proteínas tales como anticuerpos o citoquinas, péptidos, ácidos nucleicos, moléculas lipídicos, polisacáridos y virus.

30 Como se usa en el presente documento, el término "nano ranura" pretende ser un término genérico, que significa una estructura microfabricada bien definida con al menos una dimensión de tamaño nanométrico. La dimensión de tamaño nanométrico de la nano ranura se define para ser mayor que 2 nm debido al tamaño de las biomoléculas más pequeñas a ser detectadas que tienen que ingresar a la ranura y que están en el mismo orden de magnitud. La presente invención se limita a nano ranuras con una altura inferior a unos pocos micrones, debido al rango del volumen de detección del sistema óptico que está típicamente en el mismo orden de magnitud.

Como se usa en el presente documento, el término "apertura lateral" pretende ser un término genérico, que incluye, por ejemplo (pero no se limita a) los canales de entrada y salida.

35 Como se usa en este documento, el término "depósito interno" pretende ser un término genérico, que incluye, por ejemplo (pero no se limita a) espacios que no tienen acceso directo a una abertura lateral, pero que están en contacto con el sistema de evacuación de gases.

40 La presente invención pretende mejorar el llenado de la abertura lateral de salida 220 o del depósito interno 221 gracias a un sistema de evacuación de gases que garantiza una baja variabilidad inter-biosensores de la medición de la concentración de biomoléculas. Como se muestra en la Figura 1a y en la Figura 1b, un biosensor nanofluídico compuesto por un sustrato 110 o 111 y un sustrato 120 colocados junto con un espaciador 130, y que tiene una abertura lateral de entrada 210, se inmoviliza por encima de una unidad óptica 500. El sustrato 110 puede ser poroso, y el sustrato 111 puede tener poros transversales estructurados localmente, con el fin de permitir la evacuación del gas durante el llenado del biosensor nanofluídico. Una solución de mezcla 300 que contiene las biomoléculas de interés se dispone en la abertura lateral de entrada 210 mediante un sistema de pipeta 400. Finalmente, se utiliza una unidad óptica 500 para medir las interacciones biomoleculares en el interior de los biosensores 200 al enfocar el rayo láser 510 dentro de la nano ranura para biosensores.

50 La Figura 2a y la Figura 2b ilustran vistas superiores de la mitad de un biosensor nanofluídico compuesto por un sustrato 111 que contiene una abertura lateral de entrada 210 y una abertura lateral de salida 220, unidas entre sí por una nano ranura 230. En la Figura 2a, la abertura lateral de salida 220 no está diseñada con un sistema de evacuación de gas, mientras que en la Figura 2b, la abertura lateral de salida 220 está estructurada con un sistema de evacuación de gas 150 que puede obtenerse con un proceso local de grabado químico seco o húmedo con el fin de obtener poros u orificios que lo atraviesan. Cuando se deposita una solución que contiene biomoléculas en la abertura lateral de entrada 210, la solución llenará primero la abertura lateral de entrada 301, llenará la nano ranura 302 y después llenará finalmente la abertura lateral de salida 303. A pesar de un excelente sistema de conducción de líquido 140, el llenado de la abertura lateral de salida 220 rara vez es uniforme. Típicamente, la solución puede alcanzar uniformemente el borde de la abertura 220 y después de detenerse debido al equilibrio de las tensiones superficiales, puede bloquear el gas en el interior de la abertura lateral de salida 220. Esto puede conducir a la aparición de burbujas de gas 350 debido

al hecho de que el gas no puede escapar por la abertura lateral 210 o 220. Como se muestra en la Figura 2b, el gas puede salir del sistema a través de los poros que lo atraviesan 150, evitando la aparición de burbujas de gas y garantizando el llenado total de la abertura lateral de salida, y asegurando de este modo una baja variabilidad inter-biosensores.

5 Las Figuras 3a, 3b, 3c, 3d y 3e ilustran diferentes configuraciones del biosensor nanofluídico con aberturas laterales y sistema de evacuación de gas según la invención. El sistema, presentado como vistas transversales laterales, está compuesto por una nano ranura 230 que une una abertura lateral de entrada 210 con, o bien una abertura lateral de salida 220, o bien un depósito interno 221. Un componente de conducción 140 está estructurado al lado o en el interior de la abertura lateral de salida 220. En la Figura 3a, el biosensor está compuesto por un sustrato 110 que es completamente poroso con galerías que lo atraviesan. La Figura 3b presenta una alternativa en la que el sustrato 111 está estructurado localmente con galerías porosas que lo atraviesan 150. La Figura 3c ilustra el caso en que no hay abertura lateral de salida ya que el gas puede salir a través de las áreas porosas 150 localmente estructuradas en el sustrato 111 cuando la solución está llenando el sistema. La Figura 3d presenta el caso en el que el sustrato 111 está estructurado localmente con orificios que lo atraviesan 151 con dimensiones nano, micro o milimétricas. Finalmente la Figura 3e ilustra que el sistema de evacuación de gas 150 puede estar estructurado en el otro sustrato 121, o en ambos sustratos 112 y 121.

La Figura 4 ilustra el principio de detección y la sección transversal de un biosensor con aberturas laterales y un sistema de evacuación de gas según la invención. El sistema presentado como una vista lateral transversal está compuesto por una nano ranura 230 que une una abertura lateral de entrada 210 con una abertura lateral de salida 220. Un componente de conducción de líquido 140 está ubicado al lado o dentro de la abertura lateral de salida 220. El sistema de evacuación de gas 152 también está presente en la abertura lateral de salida 220. Primero, los biomarcadores 310 se inmovilizan sobre superficies de nano ranuras selectivamente funcionalizadas de uno o ambos sustratos 111 y 120. Las otras superficies de nano ranuras y las superficies de abertura lateral pueden protegerse mediante la deposición de una capa no funcionalizada 203 con el fin de evitar la no especificidad. Una vez que la solución 300 que contiene las biomoléculas específicas marcadas con fluorescencia 320 y las biomoléculas no específicas 330 se deposita en la abertura lateral de entrada, esta llena el sistema desde la abertura lateral de entrada 210 hasta la abertura lateral de salida 220 a través de la nano ranura 230. Después de llenar la nano ranura 230 y al alcanzar el componente de conducción de líquido 140, la solución 300 llena la abertura lateral de salida 220. Cuando fluyen a través de la nano ranura 230, y gracias al movimiento browniano, las biomoléculas específicas 320 interactúan con los biomarcadores 310 inmovilizados en el interior de la nano ranura 230 y forman complejos moleculares 340. Las biomoléculas no específicas 330 también fluirán a través de la nano ranura 230 pero no formarán complejos moleculares con los biomarcadores inmovilizados 310 y continuarán hacia la abertura lateral de salida 220. Cuando la solución 300 está en contacto con el sistema de evacuación de gas 152, el líquido entrará en los poros que lo atraviesan 155, con un estado de llenado transitorio 154, hasta que haya llenado completamente los poros 153. Finalmente, después de haber alcanzado un estado de equilibrio, los complejos inmovilizados que emiten fluorescencia 340 y las biomoléculas de difusión que emiten fluorescencia 330 que se difunden a través del volumen de detección óptica son excitados por el rayo láser 510 y ambos son detectados por el sistema óptico.

Según la presente invención, el dispositivo ofrece grandes mejoras en la variabilidad y sensibilidad para la detección, enumeración, identificación y caracterización de biomoléculas que interactúan o no con otras biomoléculas inmovilizadas. Las aplicaciones de la presente invención pueden abarcar el análisis biomédico, biológico o de alimentos, así como estudios fundamentales en química analítica y bioanalítica.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de biosensor nanofluídico (200) que comprende un sustrato inferior (120) y un sustrato superior (110) entre los cuales están definidas una abertura lateral de entrada (210), una nano ranura (230) que contiene al menos un área funcionalizada (231) y una abertura lateral de salida (220) o un depósito interno (221), estando adaptado dicho sistema biosensor (200) para permitir que una solución que contiene biomoléculas (320) entre en la abertura lateral de entrada (210) y pase sucesivamente a través de dicha nano ranura (230) y dicha abertura lateral de salida (220) o depósito interno (221); comprendiendo además dicho sistema biosensor (200) un subsistema de evacuación de gas (150 – 155) que está ubicado entre dicha nano ranura (230) y el entorno externo del biosensor; comprendiendo dicho subsistema de evacuación de gas varios orificios / poros que lo atraviesan (151, 153, 154, 155) que están configurados de forma tal que, cuando la solución está en contacto con el sistema de evacuación de gas, el líquido entra en dichos orificios / poros, con un estado de llenado transitorio, hasta que ha llenado completamente los orificios / poros.
2. Un sistema biosensor según la reivindicación 1, que además comprende un subsistema de conducción de líquido (140) situado entre dicha nano ranura (230) y dicho subsistema de evacuación de gas (150 – 155).
3. Un sistema biosensor según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho subsistema de evacuación de gas (150 – 155) está contenido en el interior de uno o ambos de dichos sustratos (110, 120).
4. Un biosensor (200) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los sustratos (110, 120) están hechos de un material seleccionado del grupo constituido por compuestos de silicio, vidrio, plástico y óxido.
5. Un biosensor (200) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las aberturas laterales (210, 220) tienen un área de 100 nm² a 100 mm², y la nano ranura (230) tiene una altura de entre 2 nm y 1000 nm, una anchura de entre 2 nm y 20 mm, y una longitud de entre 2 nm y 20 mm.
6. Un método para evacuar gas de un sistema nanofluídico que comprende:
- a) por lo menos un biosensor (200) según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7;
- b) un sistema óptico (500);
- c) la detección de biomoléculas específicas (320) inmovilizadas sobre biomarcadores (310) dentro de dicha nano ranura (230) por medio de fluoróforos de cuantificación unidos a las biomoléculas (320).

FIG.1a

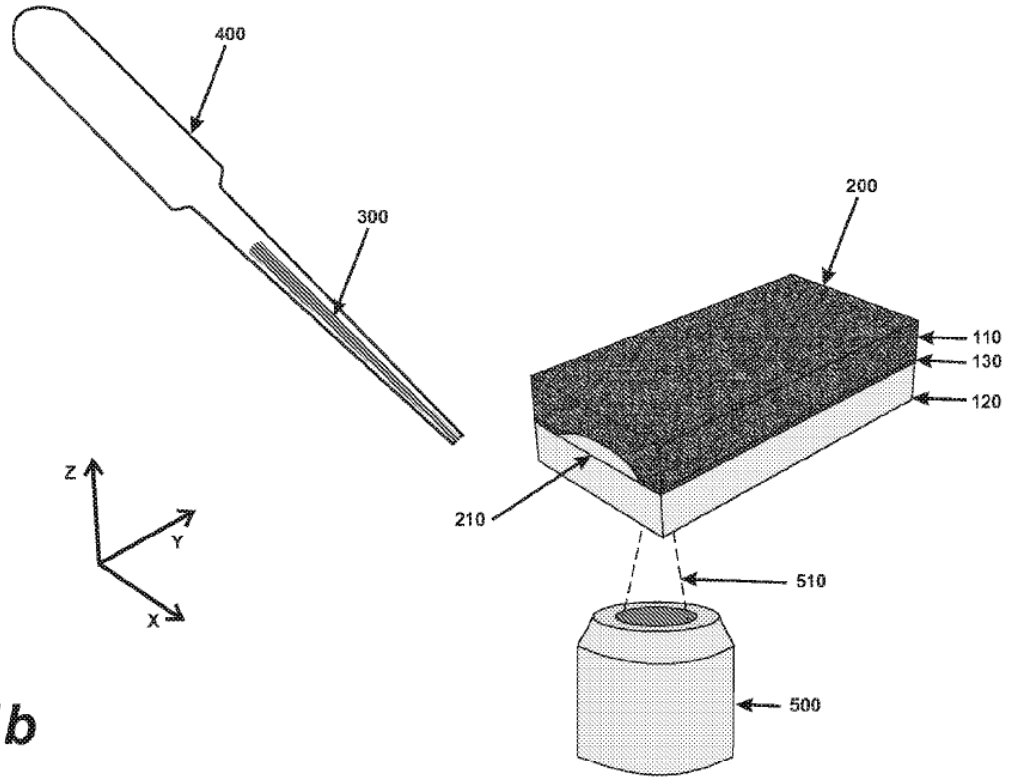


FIG.1b

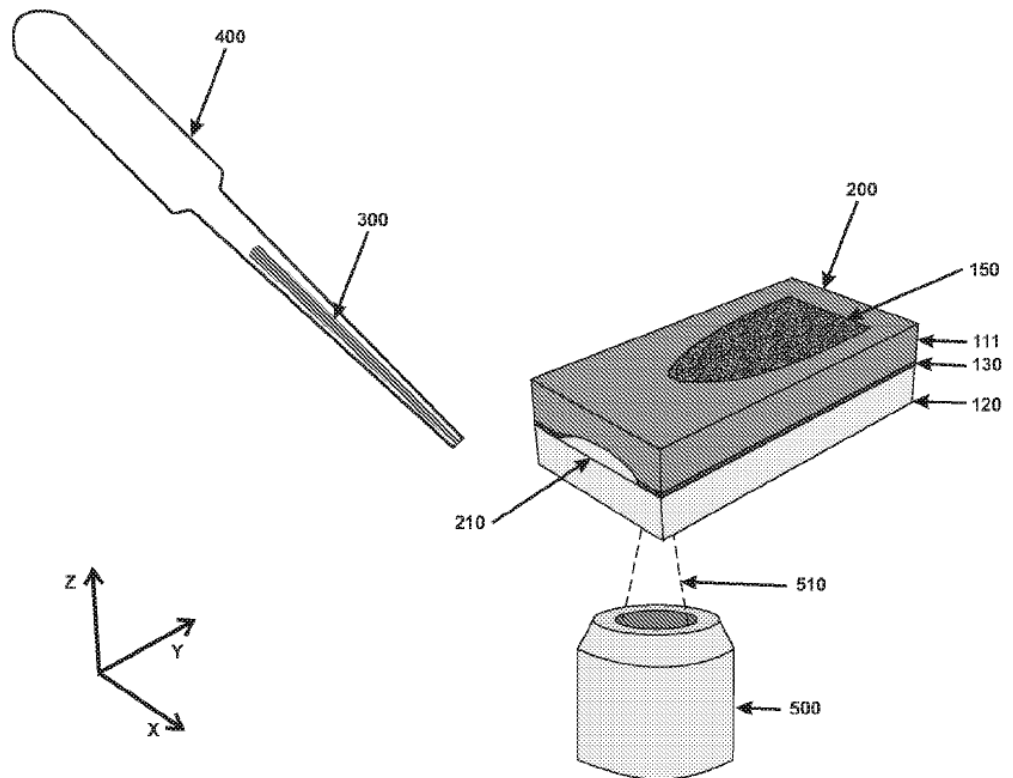


FIG.2a

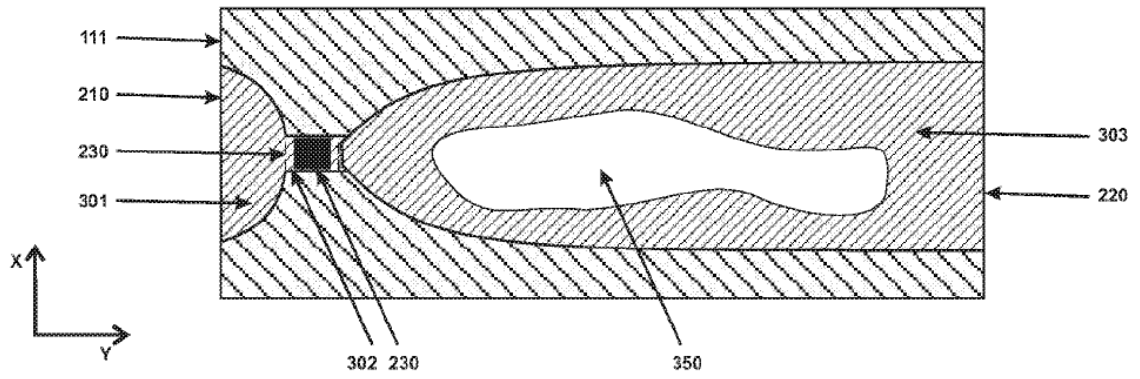


FIG.2b

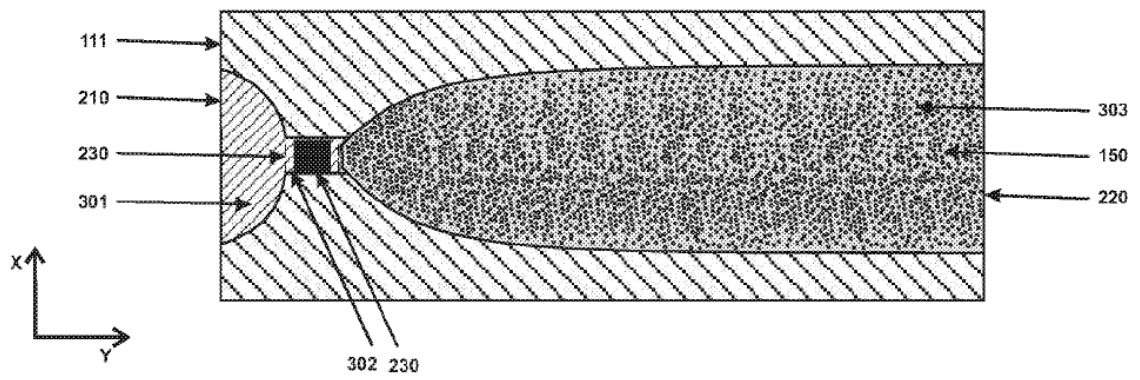


FIG.3a

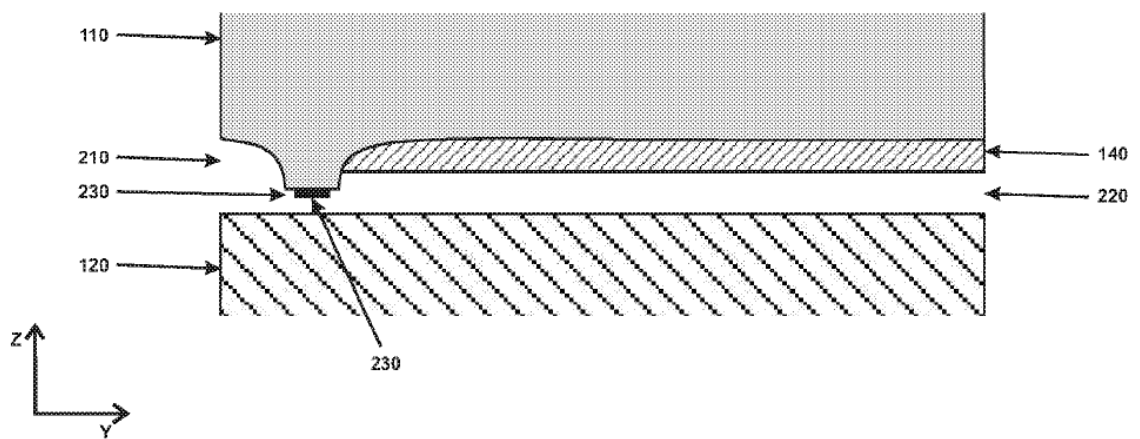


FIG.3b

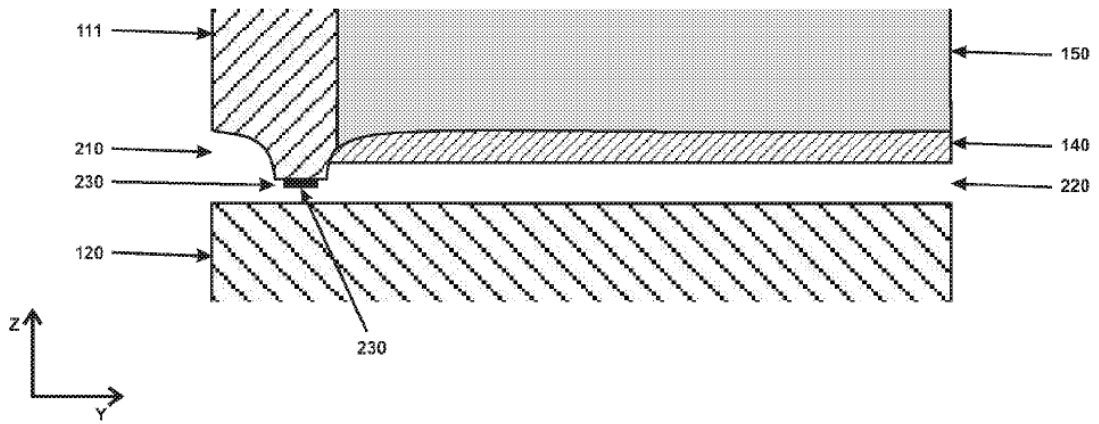


FIG.3c

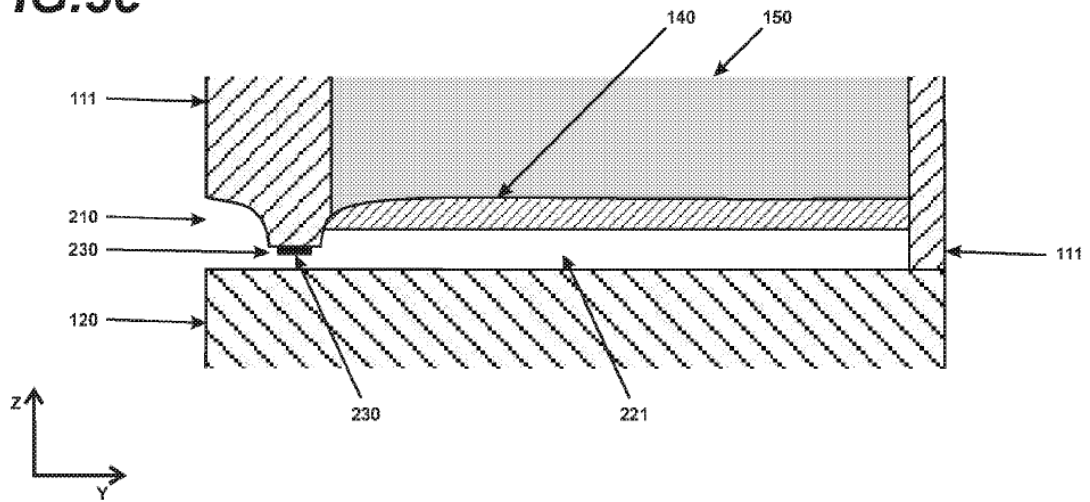


FIG.3d

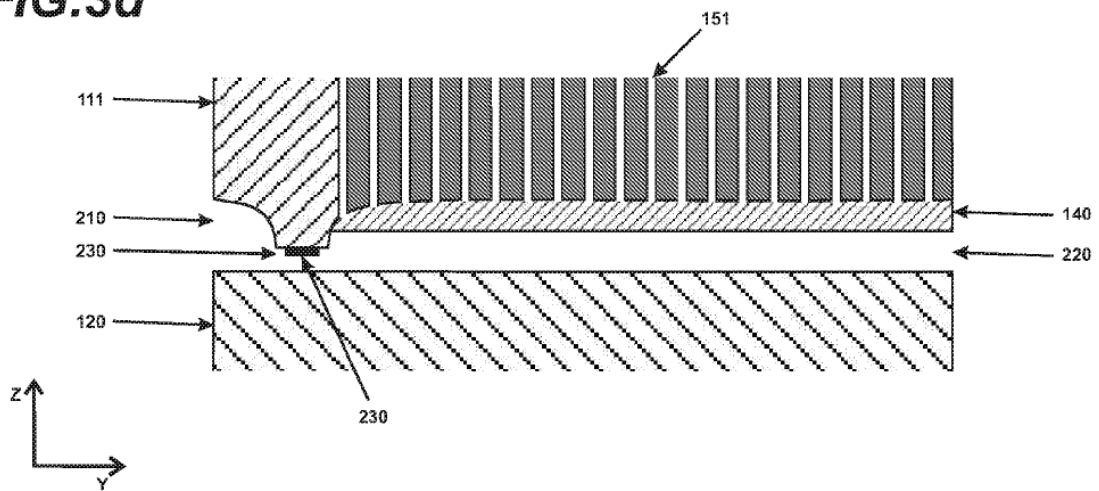


FIG.3e

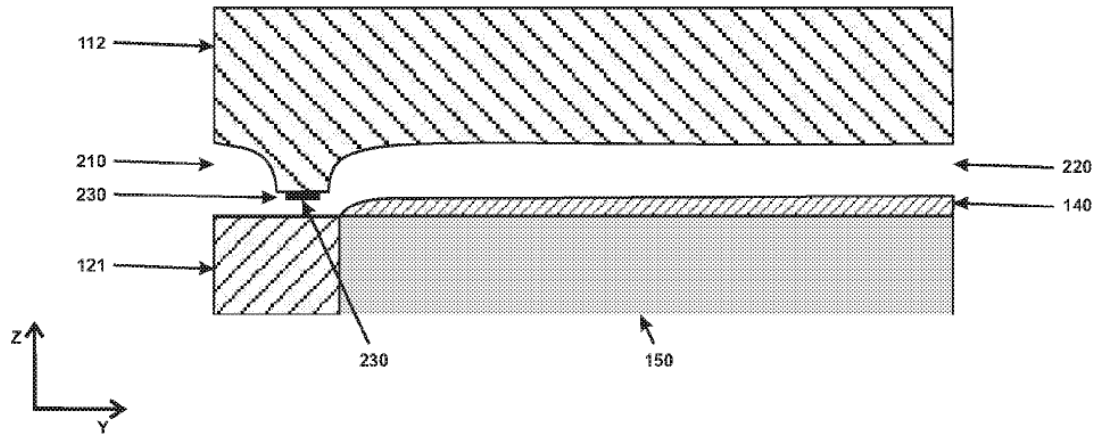


FIG.4

