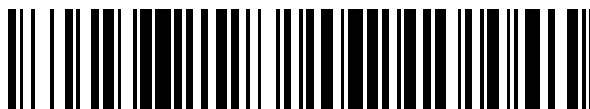


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 767 123**

51 Int. Cl.:

B82Y 30/00 (2011.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 21/05 (2006.01)
G01N 21/03 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)
B82Y 35/00 (2011.01)
B01L 3/00 (2006.01)
B82Y 15/00 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.02.2012** **PCT/IB2012/050527**
87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2012** **WO12120387**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2012** **E 12711449 (4)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2019** **EP 2684027**

54 Título: **Cuantificación rápida de biomoléculas en un biosensor nanofluídico selectivamente funcionalizado y método de la misma**

30 Prioridad:

09.03.2011 WO PCT/IB2011/050979

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.06.2020

73 Titular/es:

ABIONIC SA (100.0%)
Biopôle, secteur Esplanade SE-B, Route de la
Comiche 5
1066 Epalinges , CH

72 Inventor/es:

DURAND, NICOLAS;
MÄRKI, IWAN;
BROILLET, STÉPHANE;
MAYOR, ANNICK y
LASSER, THEO

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 767 123 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

Cuantificación rápida de biomoléculas en un biosensor nanofluídico selectivamente funcionalizado y método de la misma

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a métodos y dispositivos para detectar biomoléculas marcadas por fluorescencia en biosensores nanofluídicos funcionalizados selectivamente, usando un sistema óptico. La presente invención se puede usar ventajosamente para la cuantificación rápida de muestras biomédicas y biológicas.

Antecedentes de la invención

- 10 Los biosensores nanofluídicos se definen como sistemas fluidos con confinamientos y/o aberturas laterales de tamaño nanométrico, que se usan para cuantificar la presencia de biomoléculas en una solución. Una mayoría de los desarrollos de biosensores nanofluídicos actuales están dirigidos a aplicaciones de bioingeniería y biotecnología. En el alcance de esta invención, los biosensores se usan 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 detectar interacciones biomoleculares y la solicitud PCT IB2010/050867 describe su uso con sistemas ópticos simples. La difusión de biomoléculas en esas configuraciones es lenta y requiere bien tiempos de espera largos para alcanzar condiciones de medición estables o soluciones muy concentradas para la observación de las interacciones biomoleculares.

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

Las prácticas actuales para detectar biomoléculas específicas se pueden dividir en dos categorías: (a) las técnicas con marcador y (b) las técnicas sin marcador.

- 25 Entre las técnicas con marcador, se usan ampliamente la fluorescencia, colorimetría, radiactividad, fosforescencia, bioluminiscencia y quimioluminiscencia. Las perlas magnéticas funcionalizadas también se pueden considerar como técnicas de marcaje. Las ventajas de las técnicas con marcador son la sensibilidad en comparación con los métodos sin marcador y el reconocimiento molecular debido al marcaje específico.

- 30 Entre las técnicas sin marcador, se usan ampliamente los biosensores electroquímicos, denominados sensores amperométricos, capacitivos, conductimétricos o impedimétricos, que tienen la ventaja de ser rápidos y baratos. Miden el cambio en propiedades eléctricas de estructuras de electrodos cuando las biomoléculas quedan atrapadas o inmovilizadas sobre o cerca del electrodo, pero todos estos conceptos carecen de contraste específico molecular, sensibilidad y fiabilidad.

- 35 El ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) es una técnica bioquímica importante usada principalmente para detectar la presencia de biomoléculas solubles en el suero, y por lo tanto se usa ampliamente como herramienta de diagnóstico en medicina y verificaciones de control de calidad en diferentes industrias. Sin embargo, el análisis de ELISA es caro, requiere grandes cantidades de solución y requiere tiempo.

Las otras tecnologías importantes para diagnósticos moleculares son las transferencias Western y Northern, electroforesis de proteínas y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Sin embargo, estos métodos requieren analitos muy concentrados y no permiten ensayo de muestras de alto rendimiento.

- 40 Los dispositivos descritos por Po-Keng Lin et al. en *Macromolecules* vol. 42, n° 5 (2009), 1770-1774, y por Kyubong Jo et al. en *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, n° 8 (2007), 2673-2678, proporcionan una carga activa de moléculas de ADN, pero dicha conducción ni se crea en la abertura de salida ni por capilaridad. Seung Yun Yang et al. en *Nano Letters*, vol. 11, n° 3 (2011) páginas 1032-1035, describen nanocanales funcionalizados con ADN para detectar polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) usando un copolímero de bloques que tiene grupo di-COOH terminal. Sin embargo, no hay descripción de una abertura de salida adaptada para conducir la solución.

Objetivos

Un objeto de esta invención es proporcionar biosensores nanofluídicos baratos y rápidos, que no requieren manipulaciones complejas.

Otro objeto más de la invención es confinar geoméricamente el volumen de medición óptico usando nanofluidos y funcionalizar selectivamente superficies de nanocanales con el fin de obtener una alta sensibilidad del biosensor.

- 50 Otro objeto más de la invención es mejorar la sensibilidad de la detección forzando un flujo convectivo a través de un confinamiento (nanocanal) de tamaño nanométrico con el fin de aumentar la probabilidad de que las biomoléculas interaccionen con los biomarcadores inmovilizados.

Estos y otros objetos de la presente invención serán cada vez más evidentes con referencia a los siguientes dibujos y realizaciones preferidas.

Compendio de la invención

5 Esta invención se basa en el descubrimiento de que forzar biomoléculas para que entren en un confinamiento de tamaño nanométrico que tiene superficies selectivamente funcionalizadas, aumenta mucho la probabilidad de que las biomoléculas interaccionen con biomarcadores inmovilizados. Esto permite cuantificar la presencia de biomoléculas marcadas por fluorescencia en concentración ultrabaja.

10 Esta invención también se basa en el descubrimiento de que el control del fotoblanqueo de los fluoróforos unidos a las biomoléculas se puede usar para diferenciar entre biomoléculas que han interaccionado con biomarcadores y están inmovilizadas en el nanocanal y las que simplemente se difunden a través del volumen de detección.

Además, la invención usa un componente conductor para forzar el flujo conectivo de la solución que se va a analizar a través del nanocanal.

En el presente texto la expresión "componente conductor" debe entenderse como un elemento absorbente, que se usa para facilitar el flujo de solución a través del nanocanal.

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

Por lo tanto, la invención se refiere a un biosensor como se define en la reivindicación 1.

20 También se refiere a un conjunto según la reivindicación 7 y a un método que usa el biosensor según la reivindicación 9.

Breve descripción de los dibujos

25 La figura 1a es una vista en perspectiva de un sistema de cápsula 101 que contiene una matriz de biosensores nanofluidicos 200. Una solución 300 que contiene biomoléculas marcadas por fluorescencia, se deposita dentro de la cápsula 101 mediante un sistema de pipeta 400. Se usa un sistema óptico 500 basado en un haz láser 510 para la medición.

La figura 1b es una vista en perspectiva de una superficie 102 que contiene una matriz de biosensores nanofluidicos 200. Una solución 300 que contiene biomoléculas marcadas por fluorescencia, se deposita sobre la superficie 102 mediante un sistema de pipeta 400. Se usa un sistema óptico 500 basado en un haz láser 510 para la medición.

30 La figura 2a muestra un perfil transversal del biosensor nanofluidico definido por dos sustratos 201 y 202 que están localmente estructurados por las zonas 211 que están funcionalizadas por biomarcadores 310 y otras zonas 203 que previenen esa funcionalización. La solución de reactivo 300 que contiene biomoléculas entra en el nanocanal 210 y es movida por el componente conductor externo 241. El haz láser 510 controla el fotoblanqueo de las biomoléculas inmovilizadas 340 en el volumen de detección 520.

35 La figura 2b muestra un perfil transversal del biosensor nanofluidico definido por dos sustratos 201 y 202. Solo uno de los sustratos está localmente estructurado por la zona 211 que está funcionalizada por biomarcadores 310 y otras zonas 203 que previenen esa funcionalización. La solución de reactivo 300 que contiene biomoléculas entra en el nanocanal 210 y es movida por el componente conductor interno 242. El haz láser 510 controla el fotoblanqueo de las biomoléculas inmovilizadas 340 en el volumen de detección 520.

40 La figura 3 ilustra la evolución de la concentración con el tiempo de biomoléculas específicas a lo largo de la longitud del nanocanal.

La figura 4 muestra el perfil de concentración de biomoléculas específicas a lo largo de la longitud del nanocanal durante un tiempo t_1 dado. El área marcada representa la parte detectada de biomoléculas específicas.

45 La figura 5 ilustra la evolución de la concentración con el tiempo de biomoléculas no específicas (base) a lo largo de la longitud del nanocanal.

La figura 6 muestra el perfil de concentración de biomoléculas no específicas a lo largo de la longitud del nanocanal durante un tiempo t_1 dado. El área marcada representa la parte detectada de biomoléculas específicas, que corresponde al ruido de fondo.

50 La figura 7 ilustra una curva de fotoblanqueo de referencia de fluoróforos unidos a biomoléculas específicas inmovilizadas.

La figura 8 ilustra la curva de intensidad de fluorescencia en función del tiempo para biomoléculas no específicas dentro del nanocanal, que muestra que solo se detecta ruido de fondo.

La figura 9 muestra la velocidad de flujo de la solución dentro del nanocanal en función del tiempo.

Descripción detallada de la invención

5 Como se usa en la presente memoria, el término "biomoléculas" se pretende que sea un término genérico, que incluye por ejemplo (pero no se limita a) proteínas tales como anticuerpos o citoquinas, péptidos, ácidos nucleicos, moléculas de lípidos, polisacáridos y virus.

10 Como se usa en la presente memoria, el término "nanocanal" se pretende que sea un término genérico, que significa estructura microfabricada bien definida con al menos una dimensión de tamaño nanométrico. La dimensión de tamaño nanométrico del nanocanal se define para ser mayor de 2 nm debido al tamaño de las biomoléculas más pequeñas que se van a detectar que tienen que entrar en la rejilla y que son del mismo orden de magnitud. La presente invención se limita a nanocanales con una altura menor de un micrómetro, debido al intervalo del volumen de detección del sistema óptico que típicamente es del mismo orden de magnitud.

15 La presente invención se dirige a mejorar la detección de biomoléculas aumentando la probabilidad de interacciones con biomarcadores específicos debido al confinamiento de superficies funcionalizadas. Como se muestra en la figura 1a y figura 1b, una matriz de biosensores nanofluidicos 200 está inmovilizada en un sistema de cápsula 101 o sobre una superficie 102. Una solución mezcla 300 que contiene las biomoléculas marcadas por fluorescencia de interés se deposita dentro de la cápsula 101 o sobre la superficie 102 mediante un sistema de pipeta 400. La cápsula 101 puede estar herméticamente cerrada con el fin de evitar contaminación.

20 Finalmente, se usa una unidad óptica 500 para medir las interacciones biomoleculares dentro de los biosensores 200 centrando el haz láser 510 dentro del nanocanal de los biosensores.

25 La figura 2a y figura 2b ilustran el principio de detección y el perfil transversal de un biosensor de acuerdo con la invención. El sistema está compuesto de un nanocanal 210 que conecta una abertura de entrada lateral 220 con una abertura de salida lateral 230. Un componente conductor que puede ser externo (241) o interno (242) está situado al lado de la abertura de salida lateral 230. Primero, los biomarcadores 310 se inmovilizan sobre superficies de nanocanales selectivamente funcionalizadas de uno o ambos sustratos 201 y 202. Las otras superficies de nanocanales y las superficies de la abertura lateral se pueden proteger por la deposición de una capa no funcionalizada 203. El volumen de detección 520 se debe centrar dentro del nanocanal 210 de modo que el volumen de intersección definido por el volumen del nanocanal 210 y el volumen de detección 520 sea máximo, y directamente al lado de la

30 abertura de entrada lateral 220. Después, la solución 300 que contiene las biomoléculas específicas marcadas por fluorescencia 320 y biomoléculas no específicas 330 se carga en el sistema desde la abertura de entrada lateral 220 por capilaridad. Cuando alcanza el componente conductor 241 o 242, la solución 300 llena el componente conductor por absorción, por ejemplo, llevando a un flujo convectivo forzado a través del biosensor. Cuando el componente conductor 241 o 242 alcanza su capacidad de llenado máximo, el flujo convectivo se detiene y el sistema alcanza el

35 equilibrio. Durante el flujo convectivo y gracias al movimiento Browniano, las biomoléculas 320 interaccionan con los biomarcadores 310 inmovilizados dentro del nanocanal 210 y pueden crear complejos moleculares 340. Se obtiene un gradiente de concentración a través del nanocanal 210. Las biomoléculas no específicas 330 se difundirán en el nanocanal 210 pero no formarán complejos moleculares con los biomarcadores inmovilizados 310. Las biomoléculas no específicas 331 estarán presentes en la abertura de salida lateral 230 y algunas 332 pueden estar presentes

40 también dentro del componente conductor 241 o 242. Cuando son excitados por el haz láser 510, los complejos que emiten fluorescencia inmovilizados 340 y las biomoléculas que emiten fluorescencia que se difunden 330, que se difunden a través del volumen de detección óptico son ambas detectadas por el sistema óptico.

45 La presente invención es distinta de las técnicas que se usan actualmente para detectar interacciones moleculares. El método único de medición de la concentración de complejos inmovilizados a través del nanocanal selectivamente funcionalizado que está conectado a aberturas laterales es diferente de las técnicas actuales basadas en medir interacciones en una sola superficie o depósito. Estas soluciones no se benefician de la mayor probabilidad de sucesos de interaccionan que se producen en el diseño único presentado en esta patente.

50 La figura 3 muestra la evolución de la concentración con el tiempo a través del biosensor, cuando la solución contiene biomoléculas específicas. Directamente después del llenado capilar, en el tiempo t_0 , hay una concentración base c_0 de moléculas marcadas por fluorescencia dentro de la abertura de entrada lateral. Las biomoléculas específicas que entran en el nanocanal interaccionan rápidamente con las superficies funcionalizadas del nanocanal, llevando a una aumento de la concentración (curva discontinua). La concentración máxima c_{sat} corresponde al caso donde, para una posición x dada, todos los biomarcadores han interaccionado con biomoléculas específicas. En función del tiempo, el gradiente de concentración tenderá a la curva de puntos t_{inf} , que corresponde a la saturación total de los biomarcadores del nanocanal (curva de puntos).

55

La figura 4 ilustra el gradiente de concentración a través del biosensor en un tiempo t_1 , que corresponde al caso cuando la solución ya ha llenado el biosensor, así como el componente de absorción. Gracias al movimiento Browniano, las

biomoléculas continúan entrando en el nanocanal y continúan interaccionando con los biomarcadores, pero dependiendo de la concentración base c_0 , la transición a la saturación t_{inf} puede ser muy larga. Esto permite una medición estable del perfil de concentraciones a lo largo del nanocanal. El volumen de medición (área sombreada) corresponde a la intersección del haz láser con una anchura b y el nanocanal.

- 5 La figura 5 muestra la evolución de la concentración con el tiempo a través del biosensor, cuando la solución contiene solo biomoléculas no específicas. Directamente después del llenado capilar, en el tiempo t_0 , hay una concentración base c_0 de moléculas marcadas por fluorescencia dentro de la abertura de entrada lateral y el nanocanal. No se espera más aumento de concentración puesto que no hay interacción con las superficies funcionalizadas. En este caso, la concentración c_0 permanece constante para todas las posiciones x y con el tiempo.
- 10 La figura 6 ilustra el gradiente de concentración a través del biosensor en un tiempo t_1 , que corresponde al caso cuando la solución contiene biomoléculas no específicas y ya ha llenado el biosensor así como el componente de absorción. El volumen de medición (área sombreada) corresponde a la intersección del haz láser con una anchura b y el nanocanal.
- 15 La figura 7 muestra la evolución de la intensidad de fluorescencia con el tiempo durante la medición, para una posición dada dentro del nanocanal, cuando la solución contiene biomoléculas específicas. La medición empieza cuando se abre el obturador del sistema óptico. Se obtiene una curva de fotoblanqueo de referencia que contiene información cuantitativa del número de moléculas marcadas por fluorescencia e inmovilizadas presentes dentro del volumen de medición.
- 20 La figura 8 muestra la evolución de la intensidad de fluorescencia con el tiempo durante una medición, para una posición dada dentro del nanocanal, cuando la solución no contiene ninguna biomolécula específica. La medición empieza cuando se abre el obturador del sistema óptico. No se obtiene curva de fotoblanqueo, puesto que solo hay biomoléculas marcadas por fluorescencia que se difunden dentro del volumen de medición lo que lleva a una señal base constante.
- 25 La figura 9 muestra la evolución del flujo convectivo de la solución dentro del nanocanal en función del tiempo. Primero, el nanocanal se llena por capilaridad durante un tiempo t_{cap} , que da como resultado un aumento de la velocidad de flujo. Cuando alcanza el componente de absorción, la solución ha llenado completamente el nanocanal y el flujo ya no es conducido por capilaridad sino por absorción. Esto da como resultado un cambio en la velocidad de flujo durante un tiempo t_{act} . Finalmente, el flujo de solución dentro del nanocanal tiende a 0, y los movimientos de las biomoléculas se deben solo al movimiento Browniano. El tiempo de medición t_m debe ocurrir después de que se detenga el flujo convectivo.
- 30 De acuerdo con la presente invención, el dispositivo ofrece mejoras grandes para la detección, recuento, identificación y caracterización de biomoléculas que interaccionan o no con otras biomoléculas inmovilizadas. Las aplicaciones de la presente invención pueden cubrir análisis biomédicos, biológicos o de alimentos, así como estudios fundamentales en química analítica y bioanalítica.

35

REIVINDICACIONES

1. Un biosensor (200) para detectar y cuantificar biomoléculas marcadas por fluorescencia (320); comprendiendo dicho biosensor (200) un nanocanal (210) definido entre dos sustratos (201, 202) y conteniendo una o más zonas funcionalizadas selectivamente (211) sobre las que están inmovilizados biomarcadores (310), dicho nanocanal definido además por una abertura de entrada lateral (220) y una abertura de salida lateral (230), estando diseñada dicha abertura de entrada (220) para permitir que una solución que contiene biomoléculas (320) entre en dicho nanocanal (210), caracterizado por que dicha abertura de salida (230) contiene o está en contacto con un componente conductor (241, 242) adaptado para absorber dicha solución a través de dicho nanocanal (210) por capilaridad.
2. Biosensor (200) según la reivindicación 1, en donde dichos biomarcadores (310) interaccionan biológica o químicamente con biomoléculas específicas (320) y/o no interaccionan con biomoléculas no específicas (330) contenidas en dicha solución (300).
3. Biosensor (200) según la reivindicación 1 o 2, en donde los sustratos (201, 202) están hechos de un material seleccionado del grupo que consiste en compuestos de silicio, vidrio, plástico y óxidos.
4. Biosensor (200) según cualquiera de las reivindicaciones previas, en donde las superficies no funcionalizadas dentro del nanocanal (210) y las aberturas laterales (220, 230) contienen una capa fina de material seleccionado del grupo que consiste en compuestos metálicos, plásticos y óxidos, que tienen un espesor entre 1 nm y 1000 nm.
5. Biosensor (200) según cualquiera de las reivindicaciones previas, en donde las aberturas laterales (220, 230) tienen una superficie de 100 nm² a 20 mm² y el nanocanal (210) una altura entre 2 nm y 1000 nm, una anchura entre 2 nm y 20 mm y una longitud entre 2 nm y 20 mm.
6. Una matriz que comprende varios biosensores (200), cada biosensor como se define en cualquiera de las reivindicaciones previas, estando fijados dichos biosensores (200) dentro de un sistema de cápsula (101) o sobre una superficie (102).
7. Un conjunto que comprende uno o más biosensores (200) como se define en cualquiera de las reivindicaciones previas, y que comprende un medio óptico (500) para la excitación y detección de fluorescencia.
8. El conjunto según la reivindicación 7, en donde dicho medio óptico (500) es una unidad de medición de fluorescencia que comprende un detector con un detector de un solo fotón, que consiste en una matriz de detectores (CMOS o CCD), un fotodiodo de avalancha (APD) o un tubo fotomultiplicador (PMT).
9. Un método para detectar y cuantificar la presencia de biomoléculas marcadas por fluorescencia (320) en una solución (300) que comprende las etapas de:
 - a) proporcionar al menos un biosensor (200) como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5;
 - b) llenar dicho al menos un biosensor (200) desde la abertura de entrada lateral (220) a la abertura de salida lateral (230) poniendo a lo largo del nanocanal (210), una solución (300) que contiene biomoléculas marcadas por fluorescencia (320, 330) que pueden ser específicas para los biomarcadores (310) inmovilizados en el nanocanal;
 - c) proporcionar un sistema óptico basado en un haz láser (510);
 - d) detectar biomoléculas específicas (320) inmovilizadas sobre los biomarcadores (310) dentro de dicho nanocanal (210) mediante fotoblanqueo de fluoróforos unidos a las biomoléculas (320) así como determinar el gradiente de concentración a lo largo de la longitud del nanocanal (210).
10. Método según la reivindicación 9, en donde dichas biomoléculas (320) son proteínas, ADN, ARN, anticuerpos, aminoácidos, ácidos nucleicos, enzimas, moléculas lipídicas, péptidos, polisacáridos o virus.

FIG.1a

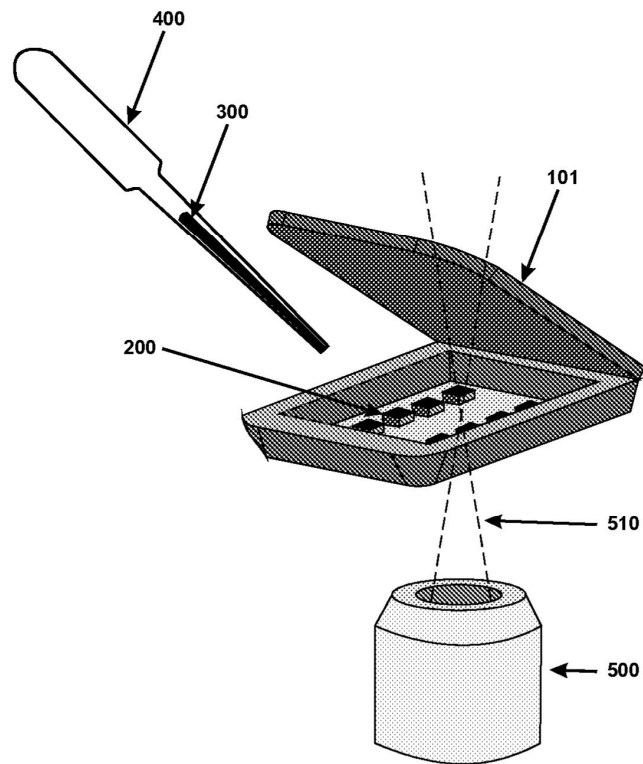


FIG.1b

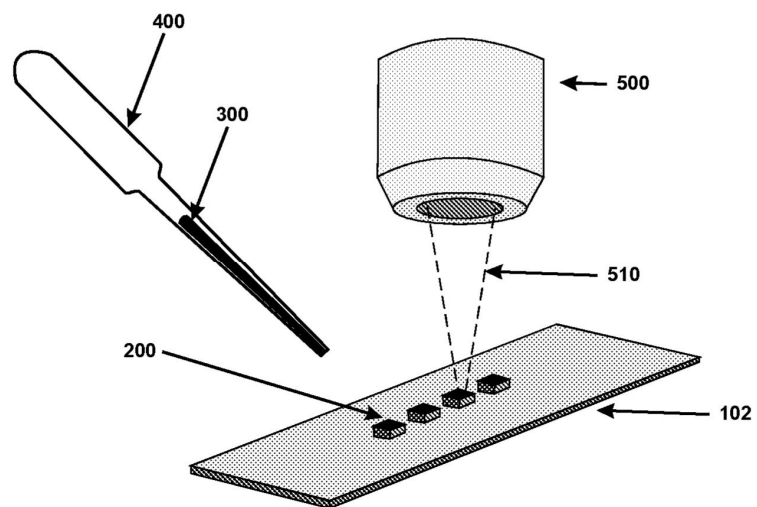


FIG.2a

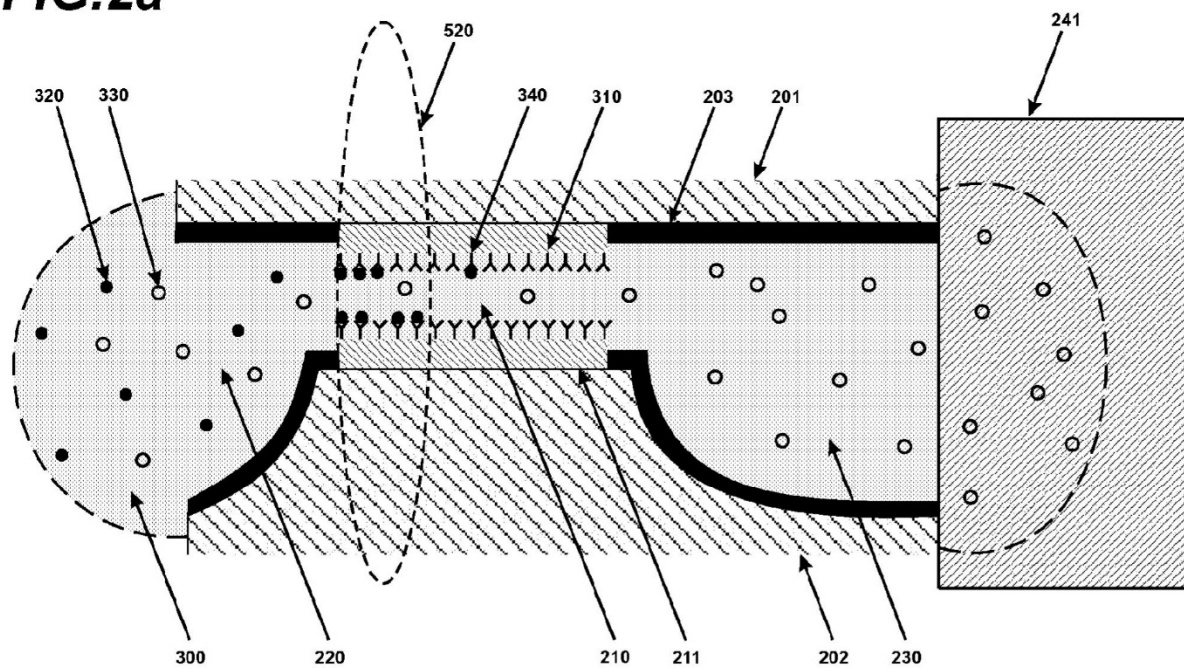


FIG.2b

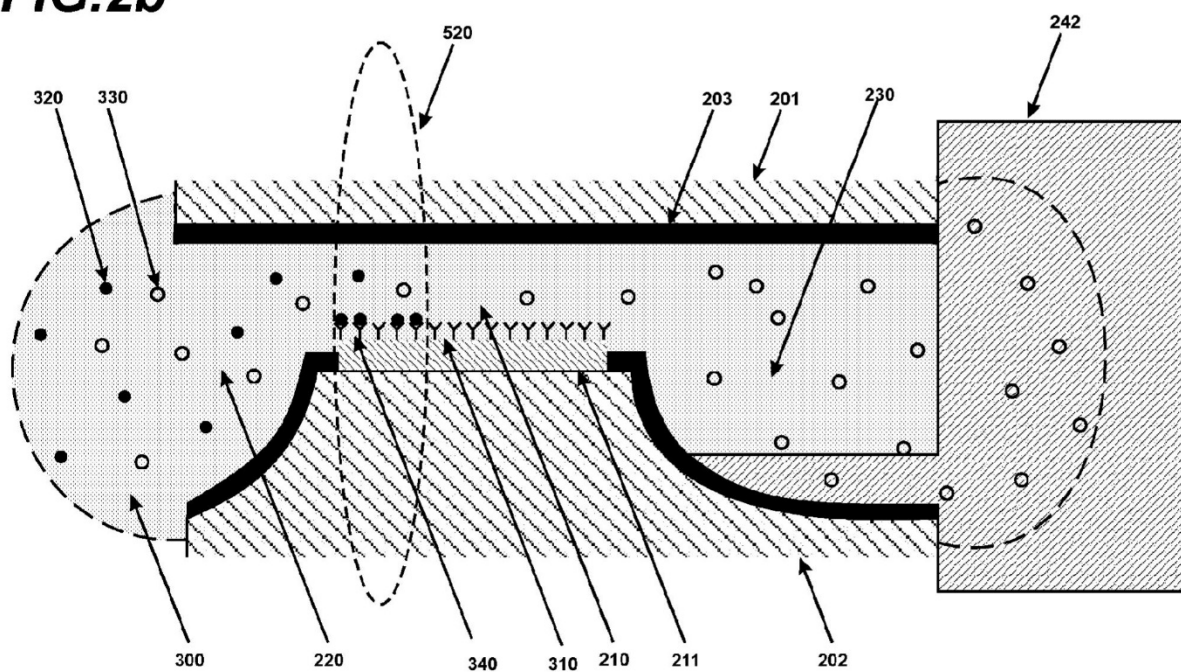


FIG.3

Concentración c

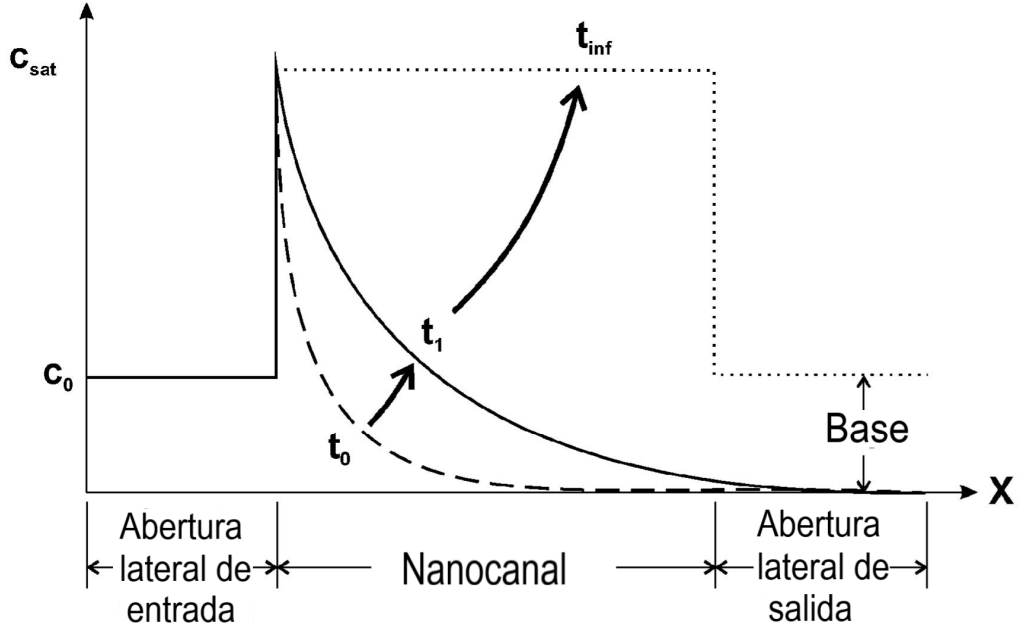


FIG.4

Concentración c

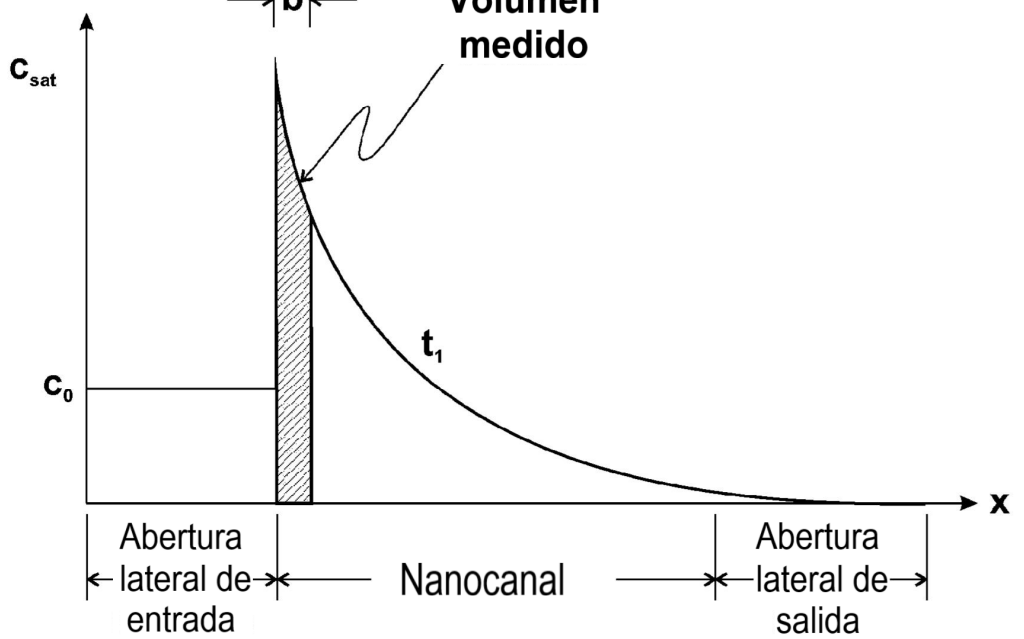


FIG.5

Concentración c

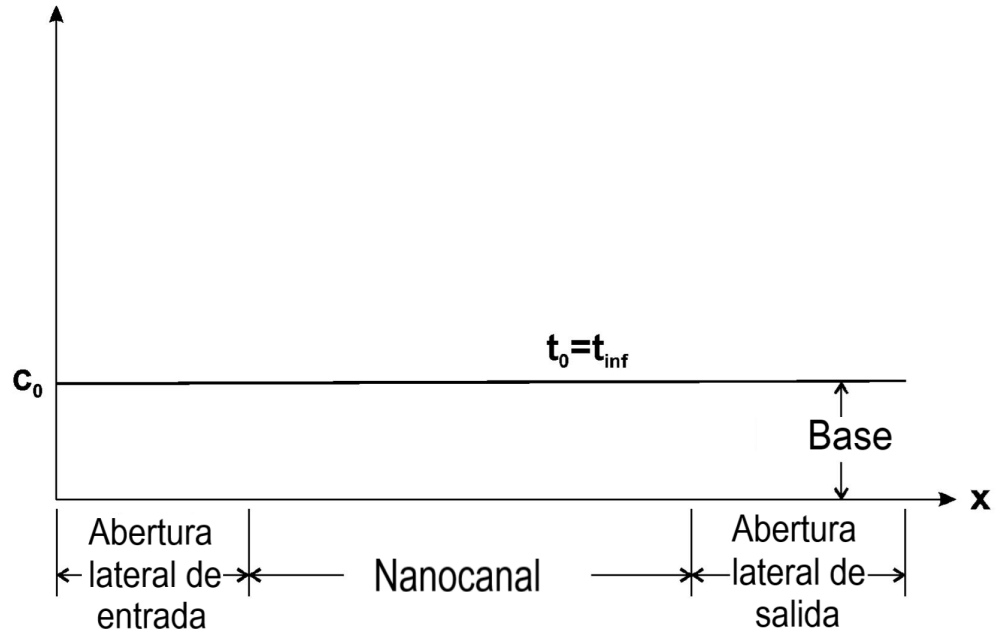


FIG.6

Concentración c

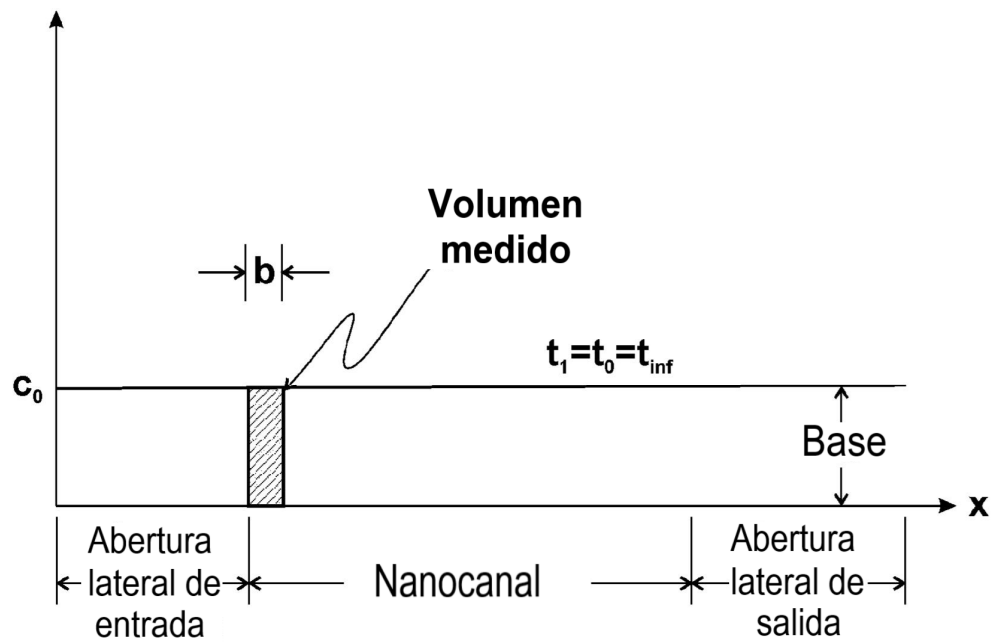


FIG.7

Intensidad I

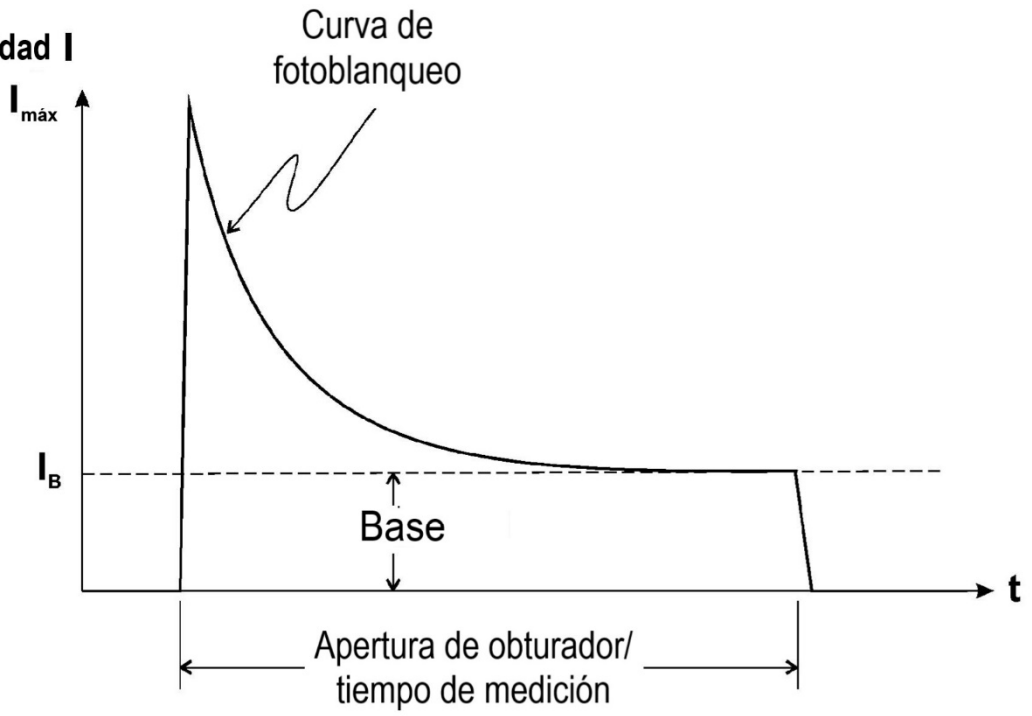


FIG.8

Intensidad I

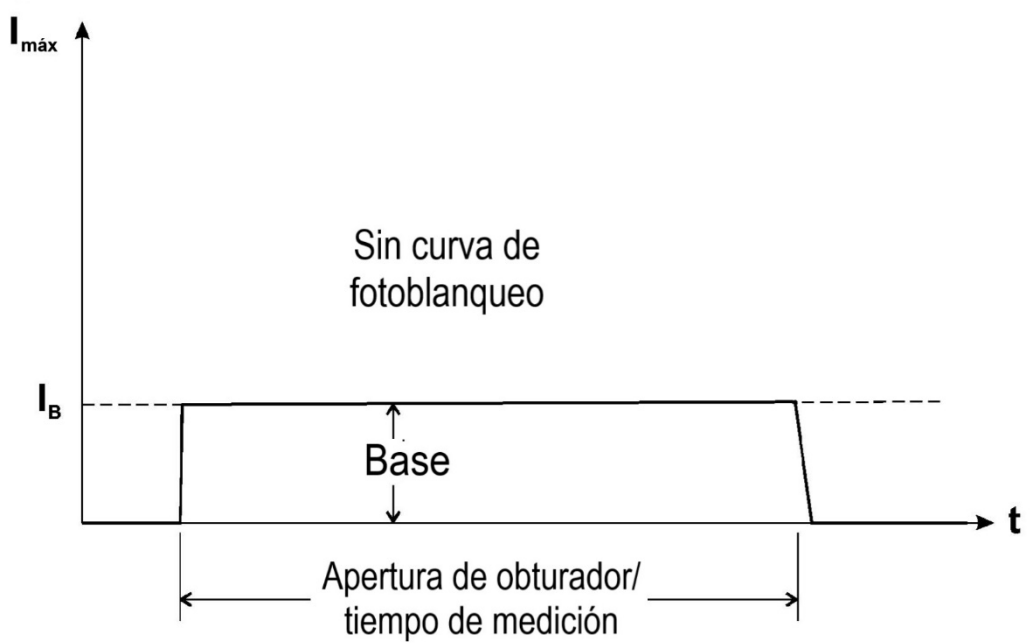


FIG.9