

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 914 111**

51 Int. Cl.:

G01N 35/00 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.02.2011** **PCT/IB2011/050808**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.09.2011** **WO11107916**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2011** **E 11713872 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2022** **EP 2542900**

54 Título: **Aparato y método para detectar y medir interacciones biomoleculares**

30 Prioridad:

01.03.2010 WO PCT/IB2010/050867

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

07.06.2022

73 Titular/es:

**ECOLE POLYTECHNIQUE FÉDÉRALE DE
LAUSANNE (EPFL) (100.0%)
Quartier de l'Innovation - J
1015 Lausanne, CH**

72 Inventor/es:

**DURAND, NICOLAS;
MÄRKI, IWAN y
LASSER, THEO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 914 111 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

Aparato y método para detectar y medir interacciones biomoleculares

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere a la detección y la medición de interacciones biomoleculares, en particular cuando se deben manipular rápidamente varias muestras.

Antecedentes de la invención

- 10 Los biosensores se definen como sistemas fluidicos con cavidades y/o canales, que se utilizan para medir las interacciones moleculares de las biomoléculas en difusión con otras moléculas inmovilizadas en las superficies de los biosensores. La mayoría de los desarrollos actuales de biosensores están destinados a aplicaciones de bioingeniería y biotecnología. En el alcance de esta invención, los biosensores se usan para medir interacciones biomoleculares para aplicaciones de diagnóstico in vitro.

La solicitud de patente suiza CH 01824/09 describe biosensores para la detección de interacciones biomoleculares. Los biosensores se describieron para un uso con un microscopio confocal. Sin embargo, la lectura del microscopio confocal es difícil de automatizar, lo que lleva a largos tiempos de medición.

- 15 Las tecnologías actuales para la detección de interacciones biomoleculares se pueden dividir en dos categorías: (a) las técnicas basadas en marcadores y (b) las técnicas sin marcadores.

- 20 Entre las técnicas basadas en marcadores, los métodos más utilizados son la fluorescencia, la colorimetría, la radiactividad, la fosforescencia, la bioluminiscencia y la quimioluminiscencia. Las partículas funcionalizadas, como las nanopartículas o las perlas magnéticas, también se pueden considerar como técnicas de marcado. Sus ventajas son la sensibilidad en comparación con los métodos sin marcadores y la especificidad molecular debida al marcado específico.

La microscopía de fluorescencia permite medir la presencia y la concentración de biomoléculas específicamente marcadas con una molécula fluorescente llamada fluoróforo. El espécimen se ilumina con luz de una longitud de onda específica, lo que lo lleva a un estado excitado, que provoca una emisión de luz a una longitud de onda más larga. La emisión es medida por un detector, que permite cuantificar el número de fluoróforos en el volumen de medición.

- 25 La espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS, por sus siglas en inglés), como representante conocida de las técnicas de detección de moléculas individuales, permite acceder, a través del análisis de fluctuación de biomoléculas individuales marcadas con fluorescencia, a parámetros moleculares estáticos y dinámicos, como el número medio de moléculas, su comportamiento de difusión y sus constantes cinéticas de asociación. Esta herramienta de detección de moléculas individuales permite medir la especificidad de la interacción de la biomolécula, sin verse influenciada por la presencia de moléculas fluorescentes fuera del volumen de detección.

- 30 En estrecha relación con la FCS, varias otras técnicas, conocidas como histograma de recuento de fotones (PCH, por sus siglas en inglés), análisis de distribución de intensidad de fluorescencia (FIDA, por sus siglas en inglés) o espectroscopia de vida útil de fluorescencia (FLS, por sus siglas en inglés), utilizan las propiedades intrínsecas mediadas por fluoróforos de biomoléculas individuales para medir las constantes químicas de asociación, la concentración o el número de moléculas, las propiedades de difusión, etc. Todas estas técnicas son sustancialmente compatibles con la invención descrita.

La microscopía basada en nanopartículas es una técnica emergente que permite detectar la presencia de nanopartículas funcionalizadas que pueden unirse a biomoléculas de interés. Esta técnica tiene varias ventajas sobre los fluoróforos, como la estabilidad química y la ausencia de fotoblanqueo (photobleaching).

- 40 Entre las técnicas sin marcadores, las más utilizadas son los biosensores electroquímicos, refiriéndose a sensores amperométricos, capacitivos, conductimétricos o impedimétricos, que tienen la ventaja de ser rápidos y económicos. Miden el cambio en las propiedades eléctricas de las estructuras de los electrodos a medida que las biomoléculas quedan atrapadas o inmovilizadas sobre o cerca del electrodo. Sin embargo, todos estos conceptos carecen de contraste específico molecular, sensibilidad y fiabilidad.

- 45 La resonancia de plasmones superficiales (SPR, por sus siglas en inglés) también es una técnica óptica sin marcado para monitorizar las interacciones biomoleculares que ocurren muy cerca de la superficie de un transductor de oro, y ha generado un gran potencial para el estudio en tiempo real de las interacciones de afinidad limitadas a la superficie sin enjuagar los reactivos en exceso o que no reaccionaron en las soluciones de muestra. Sin embargo, este método se limita a mediciones de conjunto, lo que significa que no es sensible a moléculas individuales.

- 50 Las otras tecnologías importantes para el diagnóstico biomolecular son las Western blot y Northern blot, la electroforesis de proteínas y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Sin embargo, estos métodos requieren analitos altamente concentrados. La patente WO02/10448 describe un aparato y método para llevar a cabo ensayos químicos y biológicos, la patente US 2006/028955 describe un aparato capaz de cambiar entre un láser que emite luz que tiene una longitud de onda adecuada para detectar muestras y un láser requerido

para leer datos rastreados y la patente WO 2007/041340 describe disposiciones de ácidos nucleicos y métodos para usar disposiciones de ácidos nucleicos.

Objetivos

5 Es un objeto de esta invención superar las limitaciones de los biosensores descritos en la solicitud de patente suiza CH 1824/09 proporcionando una plataforma de manejo simple para la detección rápida y automatizada de múltiples interacciones biomoleculares diferentes.

Otro objeto de la invención es utilizar lectores de discos compactos modificados para realizar la medición de la fluorescencia en el interior de los biosensores.

10 Otro objeto de la invención es utilizar lectores de discos compactos modificados para controlar con precisión la posición de la unidad de lectura mediante rotación y traslación para escanear todos los biosensores dispuestos en la plataforma.

Otro objeto más de la invención es utilizar lectores de discos compactos modificados para controlar con precisión la posición de la lente de lectura para enfocar el rayo láser dentro del área de medición de los biosensores dispuestos en la plataforma.

15 Estos y otros objetos de la presente invención se entenderán mejor con los siguientes dibujos y realizaciones preferidas.

Compendio de la invención

La invención se refiere a un sistema según la reivindicación 1 y a un método según la reivindicación 7.

20 Esta invención destaca la posibilidad de modificar el aparato de detección de lectores de discos compactos estándar para realizar una microscopía integrada para un análisis rápido y automatizado con la plataforma de detección mencionada anteriormente.

Breve descripción de los dibujos

25 Las Figuras 1a y 1b muestran una sección transversal del sistema de diagnóstico biomolecular, útil para comprender la presente invención, compuesto por una estructura primaria 110, que contiene una o varias cavidades 111 o cápsulas, y sobre la que está adherida una fina película transparente 120 en el fondo. Una disposición de biosensores 130 puede estar dispuesta sobre la fina película transparente dentro de las cavidades 111, o puede estar insertada dentro de las aberturas 121. La Figura 1a muestra que una solución que contiene biomoléculas fluorescentes a analizar 200 puede depositarse en el interior de una o varias de las cavidades 111 o de las cápsulas 114 de manera que los biosensores 130 estén completamente sumergidos. La Figura 1b ilustra que una solución que contiene las biomoléculas fluorescentes a analizar 200 puede depositarse de manera que sólo una parte de los biosensores 130 esté sumergida. 30 Una unidad 300 de lectura se acerca a la fina película 120, o a la abertura 121, para realizar la medición con un rayo láser 312 directamente dentro de uno o varios de los biosensores 130, desde la parte trasera.

35 La Figura 2 muestra una plataforma de detección que es útil para comprender la presente invención. La Figura 2 representa una vista en perspectiva de una estructura primaria 110, que contiene varias cavidades 111 de detección y una cavidad central 112 utilizada por la unidad 300 de lectura para el control de posicionamiento de la plataforma 100 de detección. La fina película transparente 120, que también contiene una abertura central 121 utilizada para el control de posicionamiento, se añade en la parte inferior de la estructura primaria 110. Dentro de las cavidades 111 se montan disposiciones de biosensores 130 directamente sobre la fina película transparente 120.

40 La Figura 3 representa una vista en perspectiva de una estructura primaria 110, que se utiliza en la presente invención, que contiene varias aberturas 113 y una cavidad central 112 utilizada por la unidad 300 de lectura para el control de posicionamiento de la plataforma 100 de detección. Varias cápsulas 114 están dispuestas en las aberturas 113 y pueden abrirse antes o después de la inserción. Disposiciones de biosensores 130 están presentes en cada cápsula 114.

45 La Figura 4 es una ilustración 3D del concepto de detección. La plataforma 100 de detección es accionada por el motor 331 para colocar las cápsulas o las cavidades 111 de detección que contienen los biosensores 130 en la posición de detección. El motor lineal 332 controla la posición transversal de la unidad 310 de medición integrada, que está dispuesta en un sistema 333 de raíles, para posicionar el volumen de medición en el biosensor de interés. El haz 312 de excitación es producido por el láser 311 de excitación y se desvía en el espejo dicróico 313 antes de pasar por la lente 314. Cuando está focalizado en la posición correcta dentro de uno de los biosensores 130, el haz 312 de excitación excita las biomoléculas marcadas con fluorescencia de la solución 200, que emiten fotones que son 50 recogidos por la lente y finalmente detectados por el detector 315.

La Figura 5 representa una ilustración del sistema óptico 310 que contiene la fuente 323 de luz para el posicionamiento de la plataforma 100 de detección y el biosensor 130. El haz de posicionamiento es dirigido por la lente 324, el espejo 326, los espejos dicróicos 318 y 319, el espejo 313 y la lente 314 sobre la plataforma de detección donde el haz de posicionamiento es parcialmente reflejado y dirigido hacia atrás por la lente 314, el espejo 313, el espejo

dicróico 319, el filtro 320 de emisión y la lente 322 sobre el detector 315. Para las mediciones de fluorescencia, el haz 312 de excitación producido por el láser 311 de excitación es colimado por la lente 316, limpiado por el filtro 317 de excitación, y dirigido por dos espejos dicróicos 318 y 319, el espejo 313, y la lente 314 para ser enfocado dentro del biosensor 130. Dentro del biosensor 130 las biomoléculas fluorescentes se excitan y emiten la señal fluorescente 321, que es dirigida por la lente 314, el espejo 313, el espejo dicróico 319, el filtro 320 de emisión y la lente 322 sobre el detector 315. El detector 315 puede ser una superficie detectora o una fibra óptica que guíe la señal fluorescente a un detector de fibra.

Descripción detallada de la invención

Como se emplea en la presente memoria, el término "biomoléculas" pretende ser un término genérico, que incluye, por ejemplo (pero no se limita a), anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos Fab (fragmentos de unión a antígeno), anticuerpos recombinantes, proteínas globulares, aminoácidos, ácidos nucleicos, enzimas, moléculas lipídicas y polisacáridos.

Como se emplea en la presente memoria, el término "plataforma de detección" pretende ser un término genérico, que se refiere a un dispositivo que contiene una o varias disposiciones de biosensores. Está diseñada para facilitar la recepción de la solución líquida a analizar. Como se emplea en la presente memoria, el término "cavidades" pretende ser un término genérico, que se refiere a huecos bien definidos en la plataforma de detección, dentro de los cuales están dispuestas las disposiciones de biosensores y que contendrán la solución líquida durante la medición. Como se emplea en la presente memoria, el término "cápsulas" pretende ser un término genérico, que se refiere a recipientes bien definidos dispuestos en la plataforma de detección, dentro de los cuales están dispuestas las disposiciones de biosensores y que contendrán la solución líquida durante la medición.

Tal como se emplea en la presente memoria, el término "lector de discos compactos" pretende ser un término genérico, que se refiere a lector estándar de discos compactos (CD), discos versátiles digitales (DVD), Laserdisc, Blu-ray™ u otras tecnologías de medios ópticos.

Como se emplea en la presente memoria, el término "unidad de lectura" pretende ser un término genérico, que se refiere al dispositivo que contiene el sistema de medición, que incluye el lector de discos compactos.

La presente invención tiene como objetivo proporcionar un método simple para detectar interacciones biomoleculares mediante la combinación de biosensores microfluídicos y nanofluídicos descritos en la patente [1], una plataforma de detección biocompatible que contiene cavidades o cápsulas y una unidad lectora.

Como se muestra en las Figuras 1a y 1b, una plataforma de detección útil para comprender la presente invención se compone de una estructura 110 de soporte principal que contiene cavidades 111 o aberturas 113. Esta estructura primaria puede ser un solo componente o puede estar compuesta por una estructura primaria, sobre la cual está fijada una fina película transparente biocompatible 120. Una disposición de biosensores 130 puede estar dispuesta en las cápsulas 114 o en la fina película 120 dentro de las cavidades de la estructura primaria 110. La solución 200 que contiene las biomoléculas fluorescentes a detectar se deposita directamente en una de las cavidades 111 o cápsulas 114 para llenar los biosensores 130 por capilaridad. La solución 200 también puede disponerse de manera que solo una parte del biosensor 130 esté sumergida. Una unidad 300 de lectura es abordada por el lado opuesto de la fina película 120. Su rayo láser 312 se enfoca dentro de los biosensores 130, tal como el volumen de medición siempre se encuentra en la posición correcta en el área de detección durante cada medición.

Las biomoléculas contenidas en la solución 200 se difunden en cada biosensor, interactúan con las previamente fijadas en las superficies de los biosensores y pueden crear un complejo molecular (dependiendo de la especificidad). Las biomoléculas inmovilizadas y aquellas que se difunden libremente a través del volumen de detección óptica son ambas detectadas por la unidad 300 de lectura que está insertada o conectada a un ordenador o una unidad de análisis. Finalmente, las mediciones se presentan directamente al usuario, quien interpretará su significado.

Un posible principio de montaje de la plataforma 100 de detección, útil para comprender la presente invención se ilustra en la Figura 2. En primer lugar, la estructura 110 de soporte primaria que contiene las cavidades 111 y una abertura central 112 se utiliza para colocar el conjunto en la posición de medición. Se añade la fina película transparente biocompatible 120, que también contiene una abertura central 121 que es mayor que la de la estructura primaria 110. Se montan las disposiciones 130 de biosensores en la fina película 120 dentro de las cavidades 111 de la estructura primaria 110.

En la Figura 3 se ilustra un montaje de la plataforma 100 de detección utilizado en la presente invención. En primer lugar, se utiliza la estructura 110 de soporte primaria que contiene las aberturas 113 y una abertura central 112 para colocar el conjunto en la posición de medición. Se disponen las cápsulas 114, que contienen la disposición 130 de biosensores, en las aberturas 113.

El principio de detección se presenta en la Figura 4. La plataforma 100 de detección se posiciona mediante el motor 331 para colocar la cavidad 111 de detección y especialmente uno de los biosensores 130 en la posición de detección. El motor lineal 332 controla la posición transversal de la unidad 310 de medición integrada, que está dispuesta en un sistema 333 de raíles, para posicionar con precisión el volumen de medición dentro del biosensor de

interés. El haz 312 de excitación es producido por el láser 311 y se desvía en el espejo dicróico 313 antes de pasar por la lente 314. Cuando está enfocado en la posición de altura correcta dentro del biosensor, el rayo láser 312 excita biomoléculas marcadas con fluorescencia, que emiten fotones que son recogidos por la lente 314 y finalmente detectados por el detector 315. El detector 315 se controla mediante una interfaz electrónica, que está conectada a un ordenador o una unidad de análisis que presentará las mediciones al usuario.

El sistema óptico 310 se presenta en la Figura 5. Por medio de la fuente 323 de luz el biosensor 130 de la plataforma 100 de detección está colocado correctamente para la medición de fluorescencia. El haz 325 de posicionamiento es colimado por la lente colimadora 324, desviado por el espejo 326, transmitido a través del espejo dicróico 318, parcialmente desviado por el espejo dicróico 319, desviado por el espejo 313 y luego enfocado sobre la plataforma 100 de detección por la lente 314. Parte del haz 325 de posicionamiento es reflejada por la plataforma 100 de detección y el biosensor 130, recogida por la lente 314, desviada por el espejo 313, parcialmente transmitida a través del espejo dicróico 319 y el filtro 320 de emisiones, y enfocada por la lente 322 sobre el detector 315. La señal del haz 325 de posicionamiento se analiza entonces para el posicionamiento correcto de los biosensores 130 en la preparación de la medición fluorescente.

El haz 312 de excitación es producido por el láser 311 de excitación y colimado por la lente colimadora 316, limpiado por el filtro 317 de excitación, desviado por dos espejos dicróicos 318 y 319, y el espejo 313, para ser enfocado sobre la plataforma 100 de detección y dentro del biosensor 130 por la lente 314. Dentro del biosensor 130 se excitan las biomoléculas fluorescentes, que entonces emiten la señal fluorescente 321 que es recogida por la lente 314, desviada por el espejo 313, transmitida a través del espejo dicróico 319 y el filtro 320 de emisiones, y enfocada por la lente 322 sobre el detector 315. El detector 315 puede ser tanto una superficie detectora como una fibra óptica que guíe la señal fluorescente a un detector de fibra.

El método de medición presentado en esta invención muestra una gran promesa para la detección, enumeración, identificación y caracterización de interacciones biomoleculares. Las aplicaciones de la presente invención pueden cubrir análisis biomédicos, biológicos y alimentarios, así como estudios fundamentales en química analítica y bioanalítica.

Referencias citadas:

1. Durand, N.F.Y., Y. Fournier, y T. Lasser, NANOFLUIDIC BIOSENSOR AND ITS USE FOR RAPID MEASUREMENT OF BIOMOLECULAR INTERACTIONS IN SOLUTION AND METHODS. Swiss Patent Application 01824/09.
2. Karsten, H. y R. Günther, Probensträger für insbesondere mikroskopische Untersuchungen einer Vielzahl von Proben. 1996, Evotec BioSystems GmbH: Germany.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema para detectar y medir interacciones biomoleculares que incluye una unidad (310) de medición para detección y excitación ópticas y una plataforma (100) de detección que comprende una estructura (110) de soporte primaria con aberturas (113) que contienen cápsulas (114), dichas aberturas diseñadas para estar situadas frente a dicha unidad (310) de medición, y dichas cápsulas (114) conteniendo una o varias disposiciones de biosensores microfluídicos y nanofluídicos (130) con aberturas laterales.
2. El sistema según la reivindicación anterior, en donde la forma de dicha plataforma (100) de detección es un disco plano o polígono, que tiene un área de 10 mm² a 1 m², y una altura de 100 nm a 2 cm; teniendo también dicha plataforma (100) de detección una cavidad central (112) para controlar la posición de la plataforma (100).
3. El sistema según una de las reivindicaciones anteriores, en donde dichas aberturas (113) tienen cada una un área de 1 mm² a 1 m².
4. El sistema según una de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha disposición (130) de biosensores está compuesta de 1 a 10.000 biosensores individuales que pueden estar revestidos con diferentes biomarcadores.
5. El sistema según una de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha plataforma de detección contiene áreas de lectura y grabación compatibles con discos compactos para el intercambio de información.
6. El sistema según una de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha unidad (310) de medición es un sistema óptico que comprende una fuente de luz de excitación, una fuente de luz de posicionamiento y un detector (315) que es un detector de fotón único, una disposición de detectores CMOS o CCD o un fotodiodo de avalancha.
7. Un método para detectar y medir interacciones biomoleculares que comprende:
 - a. proporcionar el sistema como se define en una de las reivindicaciones anteriores;
 - b. colocar la plataforma (100) de detección en dicha unidad (310) de medición;
 - c. llenar dicho/s biosensor/es (130) depositando sobre dicho/s biosensor/es una solución acuosa (200) que contenga las biomoléculas a analizar;
 - d. utilizar la unidad (310) de medición, conectada a un ordenador o a una unidad (500) de análisis, para determinar la presencia y la cinética de difusión de biomoléculas marcadas en el interior de cada biosensor (130);
8. Método según la reivindicación 7, en donde dichas biomoléculas son proteínas, ADN, ARN, anticuerpos, aminoácidos, ácidos nucleicos, enzimas, moléculas lipídicas o polisacáridos.
9. Método según la reivindicación 7 u 8, en donde dichas biomoléculas son moléculas marcadas con fluorescencia o marcadas con nanopartículas.

FIG.1a

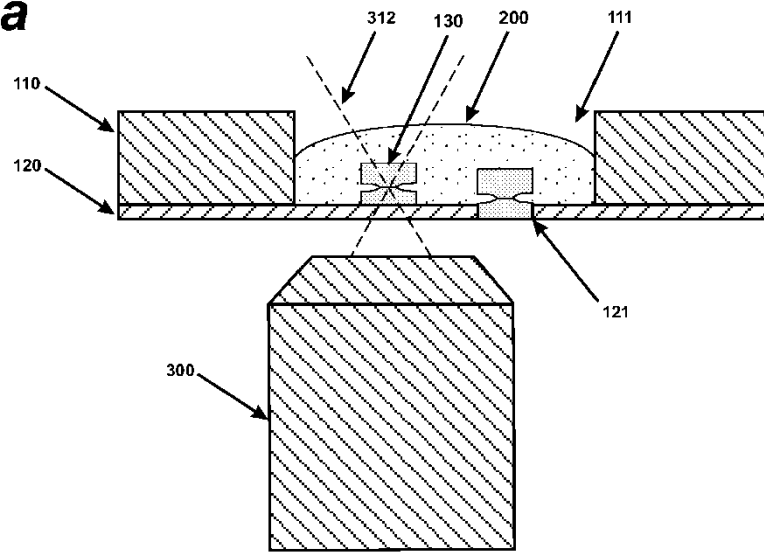


FIG.1b

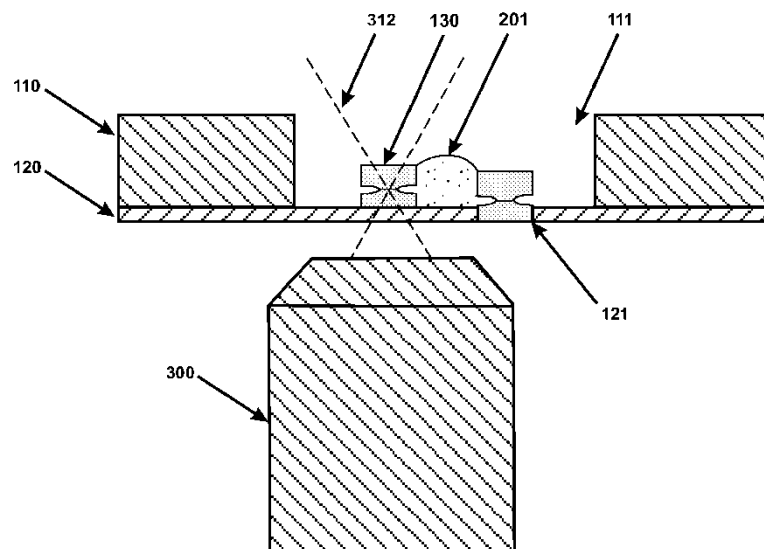


FIG.2

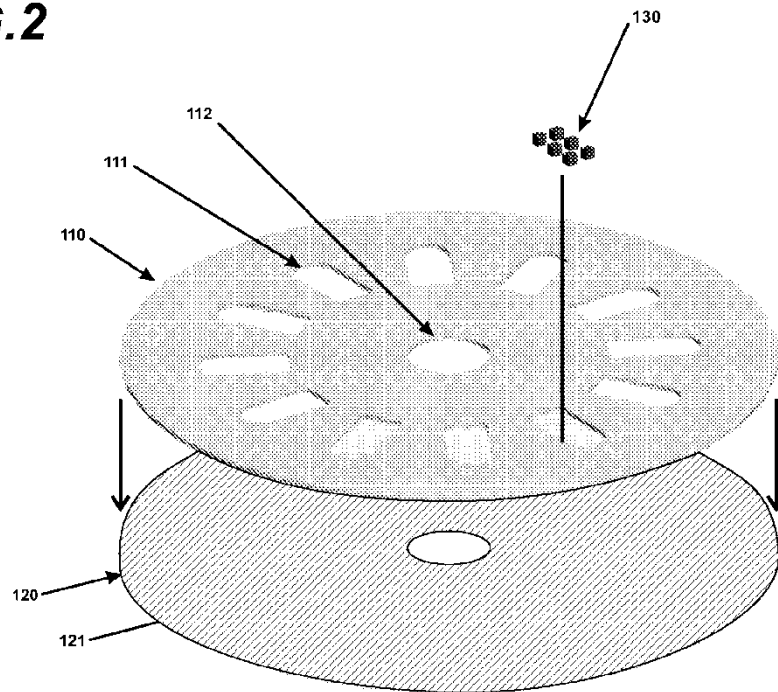


FIG.3

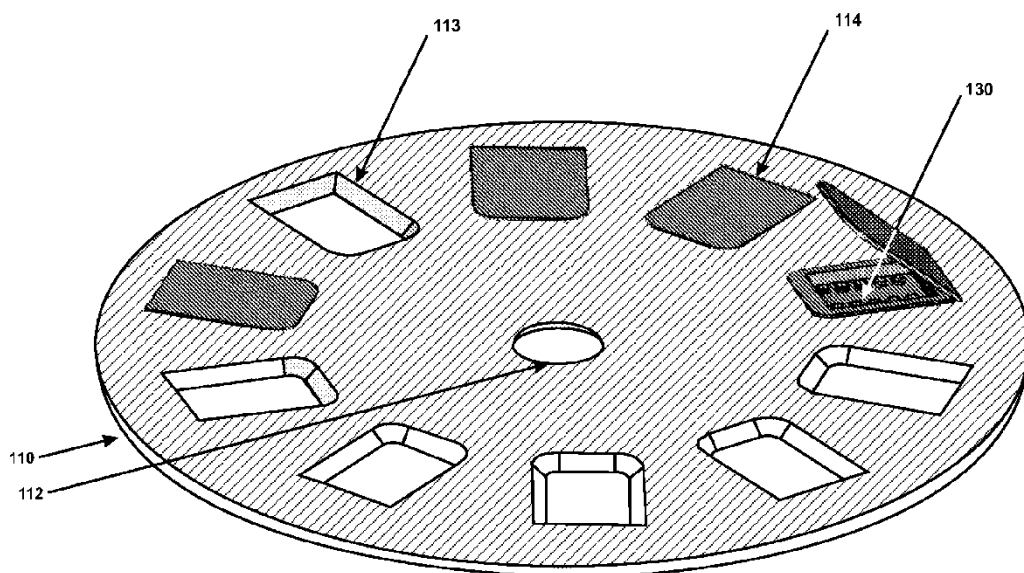


FIG.4

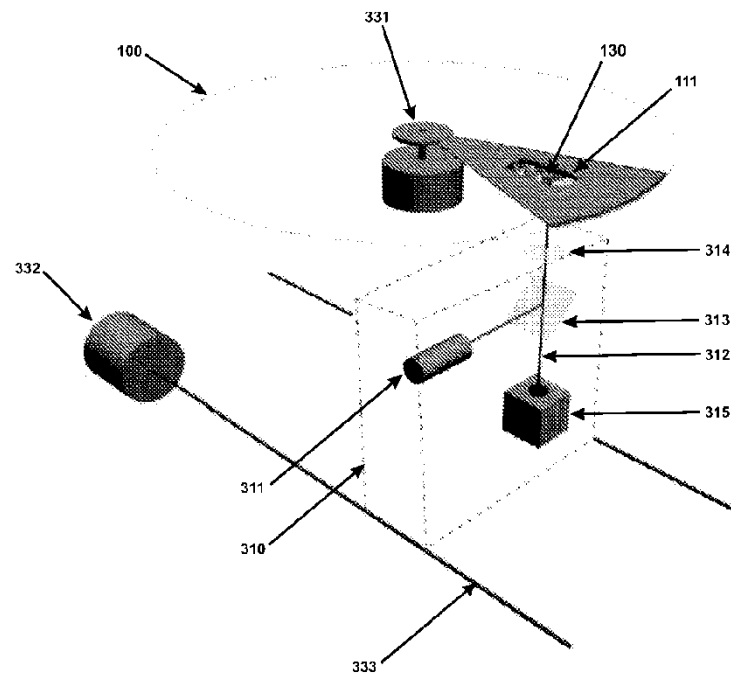


FIG.5

