

(19)

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 273 704**

(51) Int. Cl.:

**G01N 21/64** (2006.01)**G01N 21/66** (2006.01)**G01N 21/76** (2006.01)**G01N 21/77** (2006.01)**G01N 33/483** (2006.01)**B01L 3/00** (2006.01)**G01N 21/55** (2006.01)**G01N 33/487** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **00943983 .7**(86) Fecha de presentación : **03.07.2000**(87) Número de publicación de la solicitud: **1192448**(87) Fecha de publicación de la solicitud: **03.04.2002**(54) Título: **Procedimiento para utilizar una plataforma de detección.**(30) Prioridad: **05.07.1999 GB 9915703**  
**11.05.2000 GB 0011420**(73) Titular/es: **Novartis AG.**  
**Lichtstrasse 35**  
**4056 Basel, CH**(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.05.2007**(72) Inventor/es: **Budach, Wolfgang, Ernst, Gustav y**  
**Neuschaefer, Dieter**(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.05.2007**(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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

Procedimiento para utilizar una plataforma de detección.

### 5 Antecedentes

#### Descripción

Esta invención se refiere generalmente al campo de analizar muestras y tiene aplicación particular, pero no exclusiva, en el campo de la detección de afinidad, por ejemplo la conocida generalmente como tecnología de chip de ADN, proteína, péptido y anticuerpo. La invención se refiere a un procedimiento para analizar muestras que hace uso de una plataforma de detección.

Se conocen técnicas para analizar series bidimensionales de muestras. Una de tales técnicas se conoce como un ensayo ELISA y se basa en la intensa reacción bioquímica entre anticuerpos y antígenos. Se inmovilizan anticuerpos mono o policlonales especiales sobre sustratos y se hacen reaccionar con especies complementarias. Se añaden indicadores marcados fluoróforos, activados mediante anticuerpos unidos a enzimas, y se irradian las muestras con luz con el fin de inducir la fluorescencia. Se detecta la fluorescencia y la intensidad de la fluorescencia es indicativa de la reacción de afinidad.

Otra técnica conocida es la descrita en el documento W098/27430. Es ella, se inmoviliza un gran número de especies diferentes en una serie sobre un sustrato. Las especies se inmovilizan sobre el sustrato por medio fotolitográfico. Se añaden indicadores marcados fluoróforos a las especies. Se prepara una muestra y se hace reaccionar con las especies inmovilizadas y se explora todo el chip con un haz láser focalizado. Alternativamente, se prepara una muestra y se modifica con indicadores marcados fluoróforos y se hace reaccionar con las especies inmovilizadas y se explora todo el chip con un haz láser focalizado. Se detectan las señales fluorescentes mediante fotodetectores y se produce un patrón en 2D. Los cambios en este patrón entre muestras individuales proporcionan una indicación de diferencias en la expresión génica y por tanto proporcionan información sobre farmacología y toxicidad.

Otra técnica conocida es la basada en detectores de onda evanescente. Hace uso de luz láser coherente que está atrapada en una capa muy fina y crea los denominados campos electromagnéticos evanescentes que se extienden en una distancia pequeña fuera del detector físico real.

Este campo puede interaccionar con moléculas unidas a la superficie del detector. Esta interacción o excitación evanescente está limitada a una región muy cercana a las proximidades del guiaondas, normalmente 0,5 micras para la luz visible desde la superficie. Los campos evanescentes permanecen espacialmente localizados y no transfieren su energía almacenada a otras regiones. La interacción de la luz láser con las moléculas puede utilizarse de varias maneras. Incluyen:

40 1 Detección de luminiscencia inducida por el campo evanescente.

2 Detección de cambios del índice de refracción que se producen cuando las moléculas de una muestra se unen a moléculas de captura.

45 3 Detección de resonancia de plasmón superficial.

Un detector particular que utiliza un campo evanescente se conoce como un detector de guiaonda plano. El detector de guiaonda plano comprende un sustrato plano que tiene formado sobre el mismo una capa de guiado de ondas fina. Parte de la capa de guiado de ondas incorpora una trama sobre la que es incidente la luz láser y desde la que se envía la luz láser de modo que se propaga a través de la capa de guiaondas hacia una región de detección alejada de la trama. El detector de guiaondas puede utilizarse o bien en un modo sensible a la masa (véase 2, 3 anteriormente), o bien con sensibilidad superior en combinación con la detección y excitación de luminiscencia (véase 1 anterior). Las moléculas de captura se inmovilizan sobre la zona de detección y entonces se pone el analito (muestra) en contacto con las moléculas de la zona de detección/captura en presencia de moléculas marcadas añadidas con afinidad similar (competición). Alternativamente, las moléculas de analito pueden unirse a las moléculas de captura inmovilizadas y se introducen marcadores de fluorescencia mediante reacción de una especie marcada adicional con las moléculas de analito capturadas. La luz láser lanzada dentro de la capa de guiado de onda conduce a la excitación evanescente de los fluoróforos que entonces permiten la cuantificación del analito.

60 Se detecta la fluorescencia emitida y la intensidad de la fluorescencia proporciona una indicación de la interacción que se ha producido entre los reactivos de afinidad presentes en el analito y las moléculas de captura inmovilizadas. Debe observarse que en este tipo de disposición la radiación láser se propaga dentro del guiaondas a través de distancias relativamente largas y la trama de acoplamiento y las zonas de detección están geométricamente separadas. (Véanse los documentos WO 95/33197, WO95/33198, y WO 96/35940).

65 El documento EP-0 455 067 A2 describe un detector de guiaondas plano que explota el principio de detección de los cambios del índice de refracción. Las ranuras poco profundas de la plataforma formadas sobre toda la plataforma acoplan luz polarizada, coherente dentro de la capa de guiado de ondas transparente que se desacopla tras una cierta

# ES 2 273 704 T3

distancia. El ángulo del haz de desacoplamiento cambia cuando las moléculas del analito se unen a las moléculas de captura.

Otro ejemplo del tipo de índice de refracción se facilita en el documento US-A-5738825. La plataforma contiene 5 tramas individuales que están en contacto los pocillos de una placa de microtitulación.

El documento EP 178083 describe resonancia de plasmón superficial (SPR) en la que la energía de los fotones entrantes se convierte en energía eléctrica como una onda de plasmón superficial. La arquitectura del detector requiere una capa de metal al contrario que la plataforma de la presente invención, y la cantidad de luz reflejada en el ángulo crítico es, o se aproxima a, cero, al contrario que la presente invención en la que la intensidad reflejada alcanza casi el 10 100%.

Todas las técnicas anteriores presentan diversas desventajas. Algunas son muy lentas debido a que cada muestra 15 debe excitarse individualmente. Otras tales como los guiaondas planos permiten una excitación de más de una muestra a la vez, pero no proporcionan resultados totalmente fiables debido a la interferencia de fluorescencia entre diferentes 20 elementos de captura e intensidades de luz de excitación que varían localmente debido a pérdidas del guiaondas y variaciones locales de potencia acoplada debidas a variaciones de eficacias de acoplamiento de la trama.

La presente invención se refiere a una técnica que permite analizar múltiples muestras simultáneamente de una 20 manera extremadamente sensible, fiable y cuantitativa.

Al contrario que los detectores de guiaondas planos, la presente invención no muestra interferencia de luminiscencia y las intensidades de luz locales están bien definidas. La presente invención permite una auténtica multiplexación, 25 es decir, el transductor no requiere una subestructura superpuesta (como es el caso de los guiaondas planos) y puede considerarse una plataforma universal, en la que, dependiendo de los requisitos, puede hacerse variar el tamaño y número de los elementos de reconocimiento dentro de los límites factibles técnicos, sin requerir cambios en la estructura del chip (las zonas onduladas y zonas de detección no están separadas como en el caso de los guiaondas planos). Además, la invención proporciona intensidades de luminiscencia aproximadamente 100 veces más fuertes comparadas con las técnicas de epifluorescencia anteriores. La configuración experimental es muy sencilla y únicamente requiere 30 un sencillo ajuste del ángulo del haz de luz incidente. Los transductores descritos en la presente invención pueden adaptarse fácilmente a microscopios de fluorescencia convencionales, microscopios confocales, y analizadores láser. Además, para los transductores con un amplio ancho de resonancia (definidos como Anchura de Altura Media, AAM) y una posición de resonancia en, o cerca de, la incidencia normal, los ajustes de ángulo están obsoletos.

35 El procedimiento de producción de la plataforma es relativamente sencillo (barato) y el rendimiento de los sistemas existentes (es decir, analizadores de fluorescencia, microscopios, lectores de placa de microtitulación de fluorescencia, ...) pueden aumentarse fácilmente mediante modificaciones modestas de las configuraciones respectivas.

Según la presente invención se proporciona un procedimiento para analizar una muestra o muestras que comprende 40 poner en contacto la muestra o muestras con la zona de detección de una plataforma de detección, comprendiendo dicha plataforma un sustrato ópticamente transparente que tiene un índice de refracción  $n_1$ , una capa ópticamente transparente no metálica, formada sobre una superficie del sustrato, teniendo dicha capa un índice de refracción  $n_2$  que es superior a  $n_1$ , incorporando dicha plataforma sobre la misma una o múltiples estructuras onduladas que comprenden ranuras periódicas que definen una o múltiples zonas o regiones de detección, cada una para uno o múltiples elementos 45 de captura, en la que

(a) la profundidad de las ranuras está en el intervalo de 3 nm al espesor de la capa ópticamente transparente,

50 (b) el espesor de la capa ópticamente transparente está en el intervalo de 30 a 1000 nm,

(c) el periodo de la estructura ondulada está en el intervalo de 200 a 1000 nm,

(d) la razón de profundidad de ranura con respecto al espesor de la capa ópticamente transparente está en el 55 intervalo de 0,02 a 1, y

(e) la razón de ancho de ranura con respecto al periodo de las ranuras está en el intervalo de 0,2 a 0,8, mediante lo cual

60 1) puede difractarse la luz coherente incidente sobre dicha plataforma a un ángulo apropiado en haces individuales u órdenes de difracción que interfieren dando como resultado una reducción del haz transmitido y una alta reflexión anómala de la luz incidente generando así un aumento del campo evanescente en la superficie de la una o múltiples zonas de detección; o

65 2) puede difractarse la luz coherente y linealmente polarizada incidente sobre dicha plataforma a un ángulo apropiado en haces individuales u órdenes de difracción que interfieren dando como resultado una extinción casi total del haz transmitido y una alta reflexión anómala de la luz incidente generando así un aumento del campo evanescente en la superficie de la una o múltiples zonas de detección, y mediante lo cual la plataforma de detección se irradia con un haz de luz que es incidente sobre la plataforma a un ángulo tal que

## ES 2 273 704 T3

se provoca que se produzca resonancia evanescente creando dicho aumento del campo evanesciente dentro de la zona de detección de la plataforma, y detectando la radiación que emana de la zona de detección.

Tal como se utiliza en el en el presente documento, se entiende que la orientación significa que el vector del campo eléctrico de la luz linealmente polarizada es paralela o perpendicular a las ranuras. Tal como se utiliza en el presente documento, se entiende que la luz coherente significa que la longitud de coherencia de la radiación, es decir el alcance espacial hasta el que el haz incidente tiene una relación de fase definida, es grande comparado con el espesor de la plataforma.

El campo evanesciente disminuye exponencialmente dentro de las dimensiones de la longitud de onda del haz incidente (inferior a 1  $\mu\text{m}$ ).

Un aspecto importante de la presente invención es el uso de una plataforma en la que puede crearse la denominada resonancia evanescente. La reflexión anómala es un fenómeno que se ha descrito teóricamente en la técnica anterior, por ejemplo, en un artículo titulado “Theory and applications of guided mode resonance filters” de SS Wang y R Magnusson en Applied Optics, Vol. 32, Número 14, 10 de mayo de 1993, páginas 2606 a 2613 y en un artículo titulado “Coupling gratings as waveguide functional elements” de O. Parriaux *et al.*, Pure & Applied Optics 5, (1996) páginas 453-469. Tal como se explica en esos artículos, el fenómeno de resonancia puede producirse en tramas de capas dieléctricas planas en las que se produce casi el 100% de cambio de la energía óptica entre las ondas reflejadas y transmitidas cuando las ranuras de la trama de difracción tienen suficiente profundidad y la radiación incidente sobre la estructura ondulada está a un ángulo particular. En la presente invención se explota este fenómeno en la zona de detección de la plataforma cuando la zona de detección incluye ranuras de difracción de suficiente profundidad y se hace que la luz sea incidente sobre la zona de detección de la plataforma a un ángulo de manera que se produce la resonancia evanescente en esa región de detección. Esto crea en la región de detección un aumento del campo evanesciente que se utiliza para excitar muestras en investigación. Debe observarse que el cambio del 100% al que se hizo referencia anteriormente se produce con un haz paralelo y luz coherente linealmente polarizada y el efecto de un aumento del campo evanesciente también puede lograrse con luz no polarizada de un haz láser focalizado no paralelo.

En las condiciones de resonancia los haces individuales interfieren de manera que el haz transmitido se elimina por cancelación (interferencia destructiva) y el haz reflejado interfiere de manera constructiva dando lugar a una alta reflexión anómala.

Seleccionando los parámetros apropiados para la estructura de capas onduladas mencionada anteriormente, la energía de excitación permanece sumamente localizada. Tales estructuras se describen en la bibliografía como estructuras de hueco de banda fotónica, materiales con variaciones espaciales periódicas de su índice de refracción de manera que la radiación electromagnética no puede propagarse en cualquier dirección. Las estructuras de hueco de banda fotónica permiten que aparezcan modos sumamente localizados, véase por ejemplo el artículo titulado “Localisation of One Photon States” de C. Adlard, E. R Pike y S. Sarkar en Physical Review Letters, Vol. 79, Número 9, páginas 1585-87 (1997). Tales estructuras muestran pérdidas de propagación extremadamente grandes que corresponden a un régimen de localización de modo en ellas.

La plataforma utilizada en la presente invención puede considerarse ópticamente activa al contrario que las plataformas ópticamente pasivas construidas a partir de, por ejemplo, vidrio o polímero. En el presente documento, ópticamente activo significa que aumenta el campo electromagnético del haz de excitación mediante confinamiento de energía.

El sustrato de la plataforma puede formarse a partir de materiales inorgánicos tales como vidrio, SiO<sub>2</sub>, cuarzo, Si. Alternativamente, el sustrato puede formarse a partir de materiales orgánicos tales como polímeros, preferiblemente policarbonato (PC), polí(metacrilato de metilo) (PMMA), poliimida (PI), poliestireno (PS), polietileno (PE), polietilenetereftalato (PET) o poliuretano (PU). Estos materiales orgánicos se prefieren especialmente para aplicaciones de centro de atención (“point-of-care”) (POC) y médicas personalizadas ya que el vidrio no se acepta en un entorno de este tipo. Los sustratos plásticos pueden estructurarse (en relieve) mucho más fácilmente que el vidrio. En un ejemplo el sustrato se forma a partir de vidrio.

La capa ópticamente transparente puede formarse a partir de material inorgánico. Alternativamente, puede formarse a partir de material orgánico. En un ejemplo, la capa ópticamente transparente es un óxido de metal tal como TaO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, ZrO<sub>2</sub>, ZnO o HfO<sub>2</sub>. La capa ópticamente transparente es no metálica.

Alternativamente, la capa ópticamente transparente puede fabricarse de material orgánico tal como poliamida, poliimida, polipropileno (PP), PS, PMMA, ácidos poliacrílicos, éteres poliacrílicos, politioéster, poli(sulfuro de fenileno), y derivados de los mismos (véase por ejemplo S. S. Hardecker *et al.*, J. of Polymer Science B: Polymer Physics, vol. 31, 1951-63, 1993).

La profundidad de las ranuras de difracción es preferiblemente de 10 nm con respecto al espesor de la capa ópticamente transparente por ejemplo de 30 nm con respecto al espesor de la capa ópticamente transparente. El espesor de la capa ópticamente transparente es preferiblemente de 50-200 nm, el periodo de la estructura ondulada es preferiblemente de 250-500 nm, la razón de la profundidad de ranura con respecto al espesor de la capa ópticamente transparente

## ES 2 273 704 T3

es preferiblemente de 0,3 a 0,7, y la razón de la anchura de las ranuras con respecto al periodo de las ranuras (“ciclo de trabajo”) puede encontrarse en el intervalo de 0,4 a 0,6.

Las ranuras pueden ser generalmente rectangulares en un corte transversal. Alternativamente, las ranuras pueden ser sinusoidales o dentadas en una vista en corte transversal. La estructura de superficie puede ser generalmente simétrica. Las geometrías preferidas incluyen cortes transversales rectangulares, sinusoidales y trapezoidales. Alternativamente, las ranuras pueden ser dentadas en una vista en corte transversal (trama glaseada) o de otra geometría asimétrica. En otro aspecto la profundidad de ranura puede variar, por ejemplo, en modulaciones periódicas.

La plataforma puede ser cuadrada o rectangular, y las ranuras pueden expandirse linealmente a lo largo de la plataforma de manera que se cubra la superficie. Alternativamente, la plataforma puede tener forma de disco, y las ranuras pueden ser circulares o lineales.

Las ranuras pueden estar formadas sobre una superficie del sustrato. Alternativamente, las ranuras pueden estar formadas sobre una superficie de la capa ópticamente transparente. Como alternativa adicional, las ranuras pueden estar formadas tanto sobre la superficie del sustrato que es la superficie de contacto como sobre la superficie de la capa ópticamente transparente.

La superficie ondulada de una sola zona de detección puede optimizarse para una longitud de onda de excitación concreta y para un tipo concreto de polarización. Mediante medios apropiados, por ejemplo la superposición de varias estructuras periódicas que son paralelas o perpendiculares unas con otras, pueden obtenerse relieves de superficie periódicos que son adecuados para la utilización de la plataforma de longitud de onda múltiple (aplicaciones “de múltiples colores”). Alternativamente, las zonas de detección individuales sobre una plataforma pueden optimizarse para distintas longitudes de onda y/u orientaciones de polarización.

La superficie de la capa ópticamente transparente puede incluir una o una pluralidad de zonas de detección onduladas, pudiendo soportar cada una o una pluralidad de elementos de captura.

Cada elemento de captura puede contener moléculas de captura individuales y/o mezclas de las mismas que son susceptibles de reacciones de afinidad. La forma de un elemento de captura individual puede ser rectangular, circular, elipsoidal, o de cualquier otra forma. La zona de un elemento de captura individual está entre 1  $\mu\text{m}^2$  y 10  $\text{mm}^2$ , por ejemplo entre 20  $\mu\text{m}$  y 1  $\text{mm}^2$ , y preferiblemente entre 100  $\mu\text{m}^2$  y 1  $\text{mm}^2$ . Los elementos de captura pueden disponerse en una serie bidimensional regular.

La distancia de centro a centro (ctc) de los elementos de captura puede estar entre 1  $\mu\text{m}$  y 1 mm, por ejemplo de 5  $\mu\text{m}$  a 1 m, preferiblemente de 10  $\mu\text{m}$  a 1 mm.

El número de elementos de captura por zona de detección está entre 1 y 1.000.000, preferiblemente 1 y 100.000. En otro aspecto, el número de elementos de captura que ha de inmovilizarse sobre la plataforma puede no estar limitado y puede corresponder con, por ejemplo, el número de genes, secuencias de ADN, motivos de ADN, microsatélites de ADN, polimorfismos de nucleótido único (SNP), proteínas o fragmentos celulares que constituyen un genoma de una especie u organismo de interés, o una selección o combinación de los mismos. En un aspecto adicional, la plataforma puede contener los genomas de dos o más especies, por ejemplo de ratón y rata.

La plataforma puede incluir una capa que promueva la adhesión dispuesta en la superficie de la capa ópticamente transparente, con el fin de permitir la inmovilización de moléculas de captura. La capa que promueve la adhesión puede comprender también una capa con microporosa (de cerámica, cristal, Si) para aumentar adicionalmente la eficacia del ensayo y la detección o de las capas de gel que pueden utilizarse también como medio para llevar a cabo la inmovilización del elemento captura y el análisis de la muestra, incrementando de ese modo adicionalmente la eficacia del ensayo y la detección, o que permiten la separación de mezclas de analitos en el sentido de electroforesis en gel. La plataforma puede formarse con una pluralidad de zonas o regiones de detección, presentando cada una sus propias ranuras de difracción.

Una característica de esta invención es que la energía lumínica que entra en la capa ópticamente transparente se difracta inmediatamente de la capa debido a la naturaleza de la plataforma ondulada. Por tanto no se produce un guiado de ondas, o se produce de manera insignificante. La distancia de propagación es típicamente de 100  $\mu\text{m}$  o inferior, preferiblemente de 10  $\mu\text{m}$  o inferior. Esta es una distancia sorprendentemente muy corta. La distancia de propagación es la distancia a lo largo de la que la energía de radiación se reduce a 1/e.

El intervalo de ángulos del haz de luz incidente sobre la plataforma adecuado para crear un estado de resonancia está limitado por el ángulo de reflexión total para la luz incidente sobre la plataforma. Los ángulos preferidos son inferiores a 45°, por ejemplo de 30° o inferiores, por ejemplo de 20° a 10° o por debajo, por ejemplo de 0,1° a 9,9°. El ángulo puede igualarse o aproximarse a la incidencia normal. El haz de luz puede generarse mediante medios generadores de luz que comprenden un láser para emitir un haz de láser coherente. Otras fuentes de luz adecuadas incluyen lámparas de descarga o lámparas de baja presión, por ejemplo de Hg o Xe, en las que las líneas espectrales emitidas tienen una longitud de coherencia suficiente, y diodos emisores de luz (LED). El aparato para llevar a cabo el procedimiento puede incluir elementos ópticos para dirigir el haz de láser de manera que incida sobre la plataforma en un ángulo 0, y elementos para conformar el plano de polarización del haz coherente, por ejemplo adaptado para

# ES 2 273 704 T3

transmitir luz polarizada linealmente. El ángulo  $\theta$  puede definirse mediante la expresión  $\sin\theta=n/A$  en la que A es un periodo de las ranuras de difracción, X es la longitud de onda de la luz incidente y n es el índice de refracción efectivo de la capa ópticamente transparente.

- 5 Ejemplos de láseres que pueden utilizarse son láseres de gas, láseres de estado sólido, láseres de color, láseres de semiconductores. En caso necesario, la longitud de onda de emisión puede doblarse mediante elementos ópticos no lineales. Láseres especialmente adecuados son los láseres de ión argón, láseres de ión criptón, láseres de ión argón/criptón, y láseres de helio/neón que emiten a longitudes de onda entre 275 y 753 nm. Son muy adecuados los láseres de diodos o láseres de diodos de doble frecuencia de material semiconductor que presentan dimensiones 10 reducidas y bajo consumo de potencia.

Otro tipo adecuado de excitación hace uso de los VCSEL (“vertical cavity surface-emitting lasers”, láseres de emisión superficial de cavidad vertical) que pueden excitar individualmente a los elementos de reconocimiento sobre la plataforma.

- 15 El aparato para llevar a cabo el procedimiento puede incluir medios de detección dispuestos para detectar una luminiscencia tal como la fluorescencia. Los reactivos de afinidad pueden marcarse de tal manera que la transferencia de energía de fluorescencia Förster (FRET) pueda suceder al unirse las moléculas de analito a las moléculas de captura. El máximo de la intensidad de luminiscencia podría estar desplazado ligeramente respecto a la posición de la mayor 20 reflexión anómala, dependiendo de los valores de índice de refracción del sistema de capas y los correspondientes coeficientes de Fresnel.

Las muestras pueden utilizarse tanto no diluidas como con disolventes añadidos. Los disolventes adecuados incluyen agua, soluciones tampón acuosas, soluciones de proteínas, soluciones de oligómeros o polímeros naturales o 25 artificiales, y disolventes orgánicos. Los disolventes orgánicos adecuados incluyen alcohol, cetonas, ésteres, hidrocarburos alifáticos, aldehídos, acetonitrilo o nitrilos.

Pueden incluirse solubilizantes o aditivos, y pueden ser compuestos orgánicos o inorgánicos o reactivos bioquímicos tales como el dietilpirocíonato, fenol, formamida, SSC (citrato de sodio/cloruro de sodio), SDS (docecilsulfato de sodio), reactivos tampón, enzimas, transcriptasa inversa, ARN-polimerasa, polímeros orgánicos o inorgánicos.

La muestra puede comprender también constituyentes que no son solubles en el disolvente utilizado, tales como partículas de pigmentos, dispersantes y oligómeros o polímeros naturales y sintéticos.

- 35 Los colorantes de luminiscencia utilizados como indicadores pueden estar enlazados, químicamente o físicamente, por ejemplo electroestáticamente, a uno o múltiples reactivos de unión de afinidad (o derivados de los mismos) presentes en la solución de análisis y/o unidos a la plataforma. En caso de aparición de manera natural de oligómeros o polímeros tales como ADN, ARN, sacáridos, proteínas, o péptidos, así como oligómeros y polímeros sintéticos, implicados en la reacción de afinidad, los colorantes de intercalación también son adecuados. Pueden unirse luminóforos a los reactivos 40 de afinidad presentes en la solución de análisis a través de interacción biológica tal como la unión biotina/avidina o formación de complejos metálicos tales como el acoplamiento HIS-tag.

45 Pueden unirse uno o múltiples indicadores de luminiscencia a los reactivos de afinidad presentes en la solución de análisis, para capturar elementos inmovilizados sobre la plataforma, o tanto para los reactivos de afinidad presentes en la solución de análisis como los elementos de captura inmovilizados en la plataforma, con el fin de determinar cuantitativamente la presencia de uno o múltiples reactivos de unión de afinidad. Las propiedades espectroscópicas de los indicadores de luminiscencia pueden elegirse para corresponderse con los estados para transferencia de energía Förster o transferencia electrónica fotoinducida. La distancia y la luminiscencia dependientes de la concentración de aceptores y donadores pueden entonces utilizarse para la cuantificación de moléculas de analitos.

- 50 La cuantificación de reactivos de unión de afinidad puede basarse en la interacción intermolecular y/o intramolecular entre los donadores y aceptores de este tipo unidos a moléculas implicadas en reacciones de afinidad. También pueden utilizarse Compuestos intramoleculares de donadores y aceptores de luminiscencia unidos covalentemente a reactivos de unión de afinidad, Molecular Beacons (S. Tyagi *et al.*, Nature Biotechnology) que cambian la distancia entre donadores y aceptores tras la reacción de afinidad, para capturar moléculas o aditivos para la solución de analitos. Además pueden utilizarse pH y luminóforos potencialmente sensibles o luminóforos sensibles a la actividad enzimática, tal como la formación mediada por enzimas de derivados fluorescentes.

60 Los transfluoróforos o derivados de los mismos pueden utilizarse para el marcado de fluorescencia, y las moléculas quimioluminiscentes o electroluminiscentes pueden utilizarse como indicadores.

Los componentes luminescentes que tienen luminiscencia en el intervalo desde 400 nm hasta 1200 nm que se han funcionarizado o modificado con el fin de unirse a uno o más de los reactivos de afinidad, tales como los derivados del polifenilo y compuestos heteroaromáticos

- 65 estilbenos,  
cumarinas,

# ES 2 273 704 T3

- colorantes de xanteno,  
colorantes de metina,  
5 colorantes de oxacina,  
rodaminas,  
fluoresceínas,  
10 cumarinas, estilbenos,  
pirenos, perilenos,  
cianinas, oxacianinas, ftalocianinas, porfirinas, naftalocianinas, derivados del azobenceno, diestirilbifenilos, complejos de metales de transición por ejemplo complejos de polipiridilo/rutenio, cloruro de tris(2,2'-bipiridil)rutenio, cloruro de tris(1,10-fenantrolina)rutenio, cloruro de tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)rutenio y complejos de polipiridilo/fenazina/rutenio, tales como octaetilo-platino-porfirina, complejos de europio y terbio  
20 pueden utilizarse como indicadores de luminiscencia.  
Los colorantes adecuados para el análisis de sangre o suero tienen longitudes de onda de absorción y emisión en el intervalo de desde 400 nm hasta 1000 nm. Además pueden utilizarse luminóforos adecuados para la excitación de dos o tres fotones.  
25 Los colorantes que son adecuados en esta invención pueden contener grupos funcionales para enlace covalente, por ejemplo derivados de fluoresceína, tales como isotiocianato de fluoresceína.  
También son adecuados los colorantes fluorescentes funcionales disponibles comercialmente desde Amersham  
30 Life Science, Inc. Texas. y Molecular Probes Inc.  
Otros colorantes adecuados incluyen colorantes modificados con desoxinucleótido trifosfato (dNTP) que pueden incorporarse enzimáticamente en cadenas de ARN o ADN.  
35 Otros colorantes adecuados incluyen perlas o partículas de punto cuántico (Quantum Dot) (Quantum Dot Cooperation, Palo Alto, CA) o derivados de las mismas o derivados de complejos de metales de transición que pueden excitarse a una y a la misma longitud de onda definida, y los derivados muestran emisión de luminiscencia a longitudes de onda diferentes.  
40 Los analitos pueden detectarse o bien por medio de indicadores de luminiscencia unidos directamente, o indirectamente mediante la competición con especies marcadas por luminiscencia añadidas, o mediante la interacción dependiente de la concentración, de la distancia, del pH, del potencial o del potencial redox de los donadores de luminiscencia y los aceptores de luminiscencia/electrones utilizados como indicadores unidos a una y/o múltiples especies de analitos y/o elementos de captura. La luminiscencia del donador y/o la luminiscencia del extintor pueden medirse para la cuantificación de los analitos.  
45 De la misma manera los reactivos de afinidad pueden etiquetarse de tal modo que la transferencia electrónica o transferencia electrónica fotoinducida conduce a la extinción de la fluorescencia uniendo las moléculas de analito a las moléculas de captura.  
50 Los detectores apropiados para la luminiscencia incluyen cámaras CCD, tubos fotomultiplicadores, diodos de avalancha, fotodiodos, tubos fotomultiplicados híbridos.  
Los medios de detección pueden disponerse para detectar además cambios en el índice de refracción.  
55 El haz incidente puede disponerse para iluminar la zona de detección o todas las zonas de detección en una plataforma común. Alternativamente, el haz puede disponerse para iluminar sólo una subzona pequeña de la zona de detección que ha de analizarse y el haz y/o la plataforma pueden disponerse de tal modo que pueden someterse a un movimiento relativo con el fin de hacer un barrido de la zona de detección de la plataforma.  
60 En consecuencia los medios de detección pueden disponerse de una manera apropiada para adquirir las intensidades de señal de luminiscencia de toda la zona de detección en una única etapa de exposición.  
65 Alternativamente los medios de detección y/o excitación pueden disponerse con el fin de hacer un barrido de las zonas de detección por etapas.  
El aparato puede incluir un cartucho para la localización frente a la zona de detección de la plataforma para poner en contacto una muestra con la zona de detección. El cartucho puede contener medios adicionales con el fin de llevar

# ES 2 273 704 T3

a cabo la preparación de la muestra, diluyendo, concentrando, mezclando, reacciones bio/químicas, separaciones, en un formato miniaturizado (véase el documento WO 97/02357). El aparato puede incluir un dispositivo de tipo microtitulación para contener una pluralidad de muestras que han de investigarse.

5 La invención se describirá ahora a modo de ejemplo sólo con referencia particular a los dibujos adjuntos. En los dibujos:

la figura 1 es una ilustración esquemática de un aparato de control de calidad para analizar los parámetros ópticos y el estado de resonancia evanescente de una plataforma de detección.

10 La figura 2 es una ilustración esquemática de una plataforma de detección.

La figura 3 es una vista esquemática que muestra el perfil de campo evanesciente en relación con la plataforma;

15 las figura 4a y 4b son vistas esquemáticas que muestra un cartucho de chip;

la figura 5 muestra una disposición en serie en un ejemplo de la presente invención;

20 la figura 6 muestra esquemáticamente la disposición utilizada para medir fluorescencias según un ejemplo de la invención;

la figura 7 muestra una comparación de resultados obtenidos mediante una técnica de la técnica anterior y la presente invención;

25 la figura 8 ilustra formas alternativas de plataforma;

las figuras 9a a 9c muestran imágenes de fluorescencia obtenidas tras la incubación de analito PM 30 pm, regeneración, y analito MM 30 pM utilizando la presente plataforma en estados de resonancia tal como se describen en el ejemplo 5, y

30 la figura 10 muestra imágenes de fluorescencia y datos obtenidos utilizando la presente plataforma con estados de epifluorescencia y resonancia tal como se describe en el ejemplo 6.

35 La invención se describirá en los términos de la determinación de luminiscencia excitada en muestras. Esta determinación implica el uso de una plataforma de detección que constituye un aspecto de la presente invención, pero se apreciará que el uso de una plataforma de este tipo no se restringe necesariamente a esta aplicación particular que va a describirse. El uso de la plataforma está restringido al procedimiento definido en la reivindicación 1. Antes de describir la plataforma en detalle se aportará una descripción en términos generales del modo en que puede utilizarse la plataforma para determinar la luminiscencia de las muestras.

40 Las siguientes son definiciones de los términos que se utilizarán es la descripción:

Plataforma: un transductor/chip completo que contiene una o una pluralidad de zonas de detección

45 Zona de detección: una zona ondulada completa que puede crear un campo evanescente mediante un efecto de resonancia y que contiene uno o una pluralidad de elementos de captura

Elemento de captura: un punto de detección individual que contiene una o una variedad de especies de moléculas de captura

50 Molécula de captura: una molécula individual que puede producir una reacción de afinidad.

En los ejemplos siguientes todas las temperaturas son en grados centígrados y están sin corregir.

55 En referencia a la figura 1 se muestra una plataforma utilizada en la presente invención en (10) y puede recibir luz coherente de un láser (11), habiéndose expandido la luz láser mediante un conjunto de lentes (12, 14) que producen un haz (16) paralelo y expandido, y polarizado mediante un polarizador (18). Tal como se explicará con más detalle posteriormente, la plataforma (10) tiene una zona de detección a la que se unen moléculas de captura. La longitud de onda de la luz estará normalmente en el intervalo de UV a NIR, preferiblemente entre 350 nm y 1000 nm.

60 El aparato también incluye un detector (20) que puede detectar la luz transmitida a través de la plataforma (10), una cámara (21) CCD para detectar la luz reflejada y una unidad (22) de procesamiento de datos.

65 Al usar el aparato se provoca que un haz (16) láser sumamente paralelo, expandido, coherente, polarizado linealmente, incida sobre la zona de detección de la plataforma (10) con un ángulo apropiado y la luz transmitida a través de la plataforma se detecta por el detector (20) y la luz reflejada se registra por la cámara (21) CCD. El diámetro del haz de excitación expandido supera el tamaño de la plataforma (10). El ángulo de incidencia del haz sobre la plataforma se ajusta mediante la rotación de la plataforma hasta que el detector (20) detecta de manera eficaz que no se transmite

## ES 2 273 704 T3

luz a través de la plataforma. Esto indica la existencia de una posición de resonancia a la que se está produciendo resonancia evanescente en la zona de detección de la plataforma. En este estado, la intensidad de la luz refleja registrada por la cámara (21) alcanza un máximo y los datos de la cámara pasan a la unidad (22) de procesamiento de datos para su procesamiento.

- 5 Pasando ahora a la figura 2 de los dibujos, una realización de la plataforma (10) comprende un sustrato (30) de vidrio en la superficie superior de la cual se han grabado una pluralidad de ranuras (31). Una capa del óxido (32) de metal ópticamente transparente se deposita en la superficie superior del sustrato (30) y esa capa (32) también tiene ranuras (33) formadas sobre la misma. El sustrato (30) puede formarse por ejemplo a partir de vidrio tal como vidrio  
10 AF45 producido por Schott y normalmente tiene un espesor de 0,5 mm-1,0 mm. Se apreciará que pueden utilizarse otros materiales orgánicos o inorgánicos para el sustrato siempre que sea ópticamente transparente.

La capa ópticamente transparente es una película de óxido metálico transparente dieléctrica tal como  $Ta_2O_5$  con un índice de refracción elevado de aproximadamente 2,2 a una longitud de onda 633 nm, es decir, significativamente  
15 superior que el índice de refracción del sustrato. El espesor de esta capa estará normalmente en el intervalo de 50 a 200 nm o superior por ejemplo de 50 a 300 nm. Las estructuras (31) y (33) onduladas tienen un periodo en el intervalo de 200-1000 nm, por ejemplo de 200 a 500 nm, normalmente de 250-500 nm. La profundidad de las estructuras onduladas/ranuras de difracción puede estar en el intervalo de 3 nm al espesor de la capa ópticamente transparente, preferiblemente de 10 nm al espesor de la capa ópticamente transparente. El óxido metálico puede ser cualquiera de  
20 una variedad de ejemplos tales como  $Ta_2O_5$ ,  $TiO_2$ ,  $Nb_2O_5$ ,  $ZrO_2$ ,  $ZnO$  o  $HfO_2$ .

En una plataforma tal como se muestra en la figura 2, cuando un haz paralelo de luz láser polarizado incide sobre ella con un ángulo de incidencia particular, se produce un efecto conocido como reflexión anómala en la capa (32). Cuando se produce este efecto básicamente no se transmite luz a través de la plataforma (10) y se refleja de manera  
25 eficaz toda la luz en la capa (32) de modo que la luz láser coherente se confina en la capa (32) muy delgada de óxido metálico. El campo láser elevado resultante sale parcialmente fuera de la capa (32) creando un campo evanescente que excita de manera evanescente el material fluorescente que está en la superficie o en la proximidad cercana de la capa (32). Debe observarse que este estado de resonancia sólo puede alcanzarse si se emplean las ranuras (31, 33) de difracción que tiene una profundidad particular o superior y también debe observarse que las pérdidas de  
30 radiación de una estructura ondulada de este tipo son muy elevadas de modo que no se produce de manera eficaz ningún guiaondas de ninguna radiación electromagnética en el intervalo de longitudes de onda preferido en la capa (32) de óxido metálico. Se prefiere que la profundidad de las ranuras sea al menos de 10 nm pero la resonancia de evanescencia empieza a formarse con ranuras menos profundas. Sin embargo, siempre que la muestra que ha de  
35 investigarse esté en la proximidad de la capa (32) en la que se crea la resonancia puede utilizarse el campo evanescente mejorado para excitar la luminiscencia tal como fluorescencia en la muestra.

Una característica importante de la presente plataforma es que la amplitud de este campo evanescente en la posición de resonancia es significativamente mayor que el de las disposiciones de la técnica anterior (epifluorescencia que corresponde al estado de fuera de resonancia) en un orden de aproximadamente 100.

40 Esto significa que la intensidad de luminiscencia, por ejemplo fluorescencia, que puede crearse a partir de muestras también aumenta en un factor de 100. La función de la plataforma verse en términos de la estructura de difracción que actúa como una trama de volumen que difracta la luz y que los haces de difracción interfieren creando un estado de resonancia en el que la luz reflejada desde la primera superficie de contacto y la luz reflejada desde la superficie  
45 de contacto superior que es la superficie superior de la capa (32) interfieren de manera constructiva dando lugar a la reflexión máxima. En estados de resonancia, la energía láser está sustancialmente confinada al espesor de la capa (32) delgada aumentando de este modo la potencia del campo eléctrico. Para una longitud de onda láser dada y un periodo de la estructura ondulada, la resonancia depende del ángulo. La resonancia dependiente del ángulo normalmente tiene un ancho en la mitad de la altura máxima (AAM) de  $> 0,1^\circ$  preferiblemente  $0,5^\circ$  o superior por ejemplo  $1,0^\circ$  o superior.  
50 Este ancho de resonancia depende de la profundidad de las ranuras, el coeficiente de utilización y la geometría de la estructura ondulada. En comparación con el comportamiento de acoplamiento de una trama de guiaondas, el AAM de la resonancia descrita es mayor por muchos órdenes de magnitud.

55 Se apreciará que las ranuras (31,33) de difracción pueden formarse sobre la plataforma mediante técnicas convencionales apropiadas. Una manera de conseguir esto es grabar las ranuras mediante una técnica fotográfica. En ésta, se deposita una composición fotorresistente sobre la superficie del sustrato hasta una profundidad de aproximadamente  $1 \mu m$ , entonces se escribe una estructura periódica que corresponde a la formación de ranuras en la capa protectora o bien mediante holografía/interferometría de dos haces o bien utilizando una máscara de fase y entonces se graba la capa protectora con una técnica de grabado de ión reactivo utilizando gas argón y finalmente se retira el material fotorresistente residual de la superficie. Esta técnica puede utilizarse para formar tanto ranuras (31) como ranuras (33). Otras maneras de incorporar las estructuras onduladas incluyen estampado, escritura con haz electrónico, ablación por láser, procedimiento LIGA.

60 Con el fin de preparar una plataforma del tipo descrito con referencia a la figura 2 de modo que pueda utilizarse en mediciones tal como se ilustra en la figura 6, deben seguirse una variedad de procedimientos.

La primera etapa es limpiar la plataforma para eliminar las impurezas de la superficie de la plataforma. El procedimiento de limpieza puede conseguirse mediante una variedad de medios, por ejemplo por medio de un limpiador

## ES 2 273 704 T3

ultravioleta, mediante limpieza por plasma, o mediante limpieza química utilizando materiales tales como ácidos, bases, disolventes, gases y líquidos.

Una vez limpia la plataforma la siguiente etapa es aplicar en la superficie de la capa de óxido metálico una capa de un agente promotor de la adhesión. Esta capa se aplica a la plataforma ya que los elementos de captura que han de depositarse sobre la plataforma pueden no adherirse fácilmente a la propia capa de óxido metálico. Existen varias maneras en las que puede formarse esta capa. Una manera es formar una capa de una red de moléculas de silano y otra manera es utilizar lo que se conoce como monocapas autoensambladas (SAM, self-assembled monolayers). Éstas son técnicas conocidas que resultarán evidentes para el experto en la técnica. La silanización por ejemplo que puede implicar una fase líquida o gaseosa se describe en Colloids and Interface Science 6, L Boksanyi, O Liardon, E Kovats, 1976, 95-237. La formación de monocapas autoensambladas se describe por ejemplo en "Ultra thin organic films" por Abraham Ulman, 1991, Academic Press inc. Además, existen métodos adicionales disponibles para la inmovilización de elementos de captura tales como

- la modificación química de la superficie del chip con grupos reactivos y de las moléculas de captura con ligadores apropiados (U. Maskos y E.M. Southern, Nucleic Acids Research 1992, vol. 20, 1679-84)

- la modificación de moléculas de superficie y de captura con grupos/ligadores fotorreactivos (documentos WO 98/27430 y WO 91/16425)

- la inmovilización por medio de la interacción culómbica (documento EP 0 472 990 A2)

- el acoplamiento por medio de etiquetas (por ejemplo proteínas-tag, HIS-tag) en reacciones de quelatación

- y varios métodos adicionales, por ejemplo tal como se describen en Methods in Enzymology Academic Press, Nueva York, Klaus Mosbacher (ed.), vol. 137, Immobilised enzymes and Cells, 1988.

- la inmovilización inducida por plasma/generación de capas promotoras de la adhesión que contienen grupos reactivos/funcionales, que permiten un acoplamiento directo de moléculas de captura o moléculas de captura derivatizadas, o un acoplamiento indirecto de moléculas de captura o moléculas de captura derivatizadas por medio de ligadores químicos o ligadores fotoquímicos.

Una capa promotora de la adhesión puede producirse por ejemplo mediante la silanización con 3-(glicidoxipropil) trimetoxisilanos (GOPTS). Los compuestos que contienen grupos nucleófilos tales como aminas pueden reaccionar con la función epoxilo de los silanos con el fin de inmovilizarse covalentemente. Por tanto una silanización de este tipo puede utilizarse por ejemplo para la inmovilización de anticuerpos que contienen múltiples grupos amino ya que los anticuerpos consisten en aminoácidos. Además, las cadenas ADN/ARN/APN como moléculas de captura también pueden modificarse con grupos amino con el fin de unir estas moléculas de captura covalentemente a la plataforma, tal como se muestra aplicando el ejemplo 4 (discriminación de SNP). En este ejemplo, los oligonucleótidos con función amino se han inmovilizado covalentemente en la superficie de la plataforma. Sin embargo, pueden modificarse otros tipos de moléculas de captura para este fin.

Además, una capa promotora de la adhesión puede modificarse además químicamente con el fin de alterar las propiedades superficiales. Por ejemplo, una plataforma silanizada con GOPTS puede hacerse reaccionar con moléculas/derivados orgánicos/heteroorgánicos/inorgánicos saturados o insaturados funcionalizados con el fin de manipular el equilibrio hidrófobo/hidrófilo de la plataforma, es decir, cambiar el ángulo de contacto de la plataforma. Además, pueden utilizarse compuestos iónicos o potencialmente iónicos para crear cargas positivas o negativas en la superficie de la plataforma. Las moléculas de captura pueden unirse o bien covalentemente o bien mediante fisisorción o bien mediante interacción culómbica de moléculas cargadas o bien mediante un mezcla de las mismas a tales plataformas/superficies modificadas. Esto se demuestra aplicando el ejemplo 2 a continuación, en el que se utiliza 3-amino-1-propanol para modificar las características superficiales de la plataforma silanizada con GOPTS en una segunda etapa de reacción con el fin de inmovilizar las moléculas de captura de ADN/ARN/APN. En este ejemplo el nitrógeno (grupo amino) introducido en la superficie de la plataforma se cuaterniza mediante protones y proporciona por tanto cargas positivas que interaccionan con cargas negativas del ADN (naturaleza polielectrolítica). En lugar de 3-amino-1-propanol pueden utilizarse también otros derivados orgánicos de aminas, por ejemplo aminas alifáticas, o aminas alifáticas ramificadas, o aminas que contienen estructuras cíclicas aromáticas o no aromáticas, o aminas que contienen heteroátomos, o aminas que contienen grupos funcionales, o aminas que contienen combinaciones de los mismos para la inmovilización de moléculas de captura, por ejemplo cadenas de ADN/ARN/APN.

Pueden utilizarse moléculas orgánicas funcionarizadas que proporcionan cadenas hidrocarbonadas para convertir la plataforma en más hidrófoba, pueden utilizarse grupos polares para convertir la plataforma en más hidrófila, o pueden utilizarse grupos iónicos, o grupos potencialmente iónicos para introducir cargas. Por ejemplo puede utilizarse polietilenglicol (PEG) o derivados del mismo para convertir la plataforma en hidrófila, lo que impide la absorción no específica de proteínas a la plataforma/superficie.

Pueden unirse grupos reactivos o fotorreactivos a la superficie de la plataforma que pueden servir como grupos de anclaje para etapas de reacción adicionales.

## ES 2 273 704 T3

Puede obtenerse una SAM como capa promotora de la adhesión adecuada para la inmovilización de anticuerpos mediante el tratamiento de la plataforma con alquilfosfatos anfífilos (por ejemplo, fosfato de estearilo). El grupo de cabeza del fosfato reacciona con los grupos hidroxilo en la superficie de la plataforma y conduce a la formación de una monocapa ordenada de los alquilfosfatos anfífilos. Las cadenas de alquilo hidrófobas convierten la superficie de la plataforma en hidrófoba y permiten así la fisisorción de anticuerpos, tal como se muestra aplicando el ejemplo 6 (inmunoensayos multiplexados).

También puede utilizarse una SAM para la inmovilización de otras moléculas de captura, por ejemplo para cadenas de ADN/ARN/APN. En este caso, también pueden utilizarse fosfatos anfífilos/fosfatos modificados por ejemplo con 10 grupos amino o grupos epoxilo. Las moléculas de captura pueden o bien acoplarse directamente a la SAM, por ejemplo a una SAM modificada con amina, o bien después de que la plataforma haya reaccionado con derivados orgánicos de las aminas, por ejemplo aminas alifáticas, o aminas alifáticas ramificadas, o aminas que contienen estructuras cíclicas aromáticas o no aromáticas, o aminas que contienen heteroátomos, o aminas que contienen grupos funcionales, o aminas que contienen combinaciones de los mismos o cualquier otra molécula orgánica, heteroorgánica y/o inorgánica 15 (por ejemplo SAM modificada con epoxilo).

Una capa promotora de adhesión puede consistir en múltiples capas con el fin de manipular las características superficiales, por ejemplo hidrofobicidad, ángulo de contacto, densidad de la carga. Además, una capa unida a la 20 plataforma con cualquiera de los métodos mencionados anteriormente puede proporcionar o introducir una funcionalidad química que se requiere o bien para la capa posterior, siguiente, o bien para el acoplamiento de las moléculas de captura o moléculas de captura derivatizadas. Una unión de moléculas ligadoras químicas o moléculas ligadoras fotoquímicas también puede verse como una capa intermedia que permite la unión de las moléculas de captura a la plataforma.

25 Esta combinación controlada de capas/moléculas con diferentes funcionalidades se atribuye en general como química supramolecular (J.-M. Lehn, Supramolecular chemistry - Scope and perspectives. Molecules, supermolecules, and molecular devices, (Nobel Lecture, 8.12.1987), Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 27, 89, 1988.). La estructura supramolecular obtenida proporciona una funcionalidad que difiere de la funcionalidad de las moléculas individuales utilizadas para las capas individuales. Para la presente invención, una capa intermedia puede introducir también luminóforos en 30 un sistema de capas de este tipo, que puede utilizarse o bien como donador de energía o bien como extintor/aceptor de energía en el sentido de la transferencia de energía de Förster (FRET) o la transferencia electrónica fotoinducida, luminóforos sensibles al potencial, antes de que las moléculas de captura o las moléculas de captura modificadas se unan a la plataforma.

35 Para los métodos anteriormente descritos de tratamiento de superficie, pueden utilizarse las siguientes moléculas orgánicas o inorgánicas y derivados de las mismas:

aminas, aminas modificadas, jeffamines, aminas alifáticas, alcoholes, ácidos, aldehídos, cetonas, amidas, anhídridos, fosfatos, fosfonatos, sulfatos, sulfonatos, tioles, compuestos que contienen heteroátomos, moléculas funcionalizadas orgánicas aromáticas y alifáticas, moléculas heteroorgánicas aromáticas y alifáticas,

polímeros naturales y artificiales, silanos, moléculas modificadas con grupos activos químicos o fotoquímicos, derivados de los mismos y derivados funcionalizados, por ejemplo omega-funcionalizados de las especies enumeradas.

45 En principio, para el desarrollo de estructuras de capas que consisten en una o múltiples capas, se necesitan grupos reactivos químicos y/o grupos químicos que tengan propiedades físicas o electroquímicas especiales (por ejemplo, cargas) para las moléculas utilizadas con todos los tratamientos de superficie descritos anteriormente.

50 Tanto las interacciones químicas/fotoquímicas (por ejemplo, adición, sustitución nucleófila/electrófila, reacción de radicales, condensación, reacciones con derivados de carbonilo orgánicos/ heteroorgánicos/inorgánicos, o reacciones fotoinducidas, o reacciones termoinducidas, concepto ácido/base de Lewis), como

interacciones físicas/electroquímicas (por ejemplo interacción de Coulomb, interacción hidrófoba/hidrófila), y/o

55 interacción biológica (por ejemplo antígeno/anticuerpo, hibridación, interacción estreptavidina/avidina-biotina, interacción agonista/antagonista), y/o

interacción fotoquímica/fotofísica

60 pueden emplearse para el acoplamiento entre moléculas/componentes incorporados en un sistema de capas/capa promotora de la adhesión de este tipo.

La promoción de la adhesión también puede lograrse mediante la deposición de capas microporosas o geles sobre 65 la superficie de la plataforma, las funcionalidad/características superficiales de las capas microporosas o geles facilitan la deposición de elementos de captura acortando el tiempo necesario de incubación y aumentando la sensibilidad de las medidas posteriores. Las capas microporosas pueden comprender compuestos orgánicos tales como polímeros, monómeros, uniones moleculares y uniones supramoleculares, o puede comprender compuestos inorgánicos tales como vidrio, cuarzo, cerámica, sílice y semiconductores.

# ES 2 273 704 T3

Una capa promotora de la adhesión puede producirse mediante silanización por ejemplo utilizando 3-(glicidoxipropil)trimetoxsilano (GOPTS). La capa promotora de la adhesión puede además modificarse químicamente con el fin de alterar las propiedades superficiales. Por ejemplo, una plataforma silanizada con GOPTS puede hacerse reaccionar con moléculas orgánicas saturadas o insaturadas funcionarizadas con el fin de manipular el equilibrio hidrófobo/hidrófilo de la plataforma, y de ese modo alterar el ángulo de contacto de la plataforma.

Una vez que la capa promotora de la adhesión se ha formado sobre la plataforma, pueden ser necesarias una etapa o etapas de limpieza adicionales para quitar el exceso de productos químicos utilizados en la preparación de una capa de este tipo. Tras esa limpieza, la plataforma está entonces preparada para recibir elementos de captura.

Una serie bidimensional de elementos de captura o reconocimiento se forma sobre la superficie 3D de la capa promotora de la adhesión depositada previamente sobre la plataforma. La serie de elementos de captura puede depositarse de varias maneras. Las técnicas que pueden utilizarse para depositar elementos de captura incluyen impresoras de chorro de tinta que presentan actuadores piezoeléctricos, actuadores electromagnéticos, actuadores de válvula de presión/solenoide y otros transductores de fuerza; impresoras de inyección de tinta por burbuja que utilizan actuadores termoeléctricos; o actuadores de láser; impresoras de puntos en configuración de anillo; explorador de herramientas por puntos (pin tool-spotter); "síntesis en chip" tal como se describe en los documentos WO90/03382 o WO92/10092; síntesis de polímeros inmovilizados a muy gran escala (VLSIPS, very large scale immobilised polymer synthesis) tal como lo descrito en el documento WO98/27430; foto-activación/fotodesprotección de grupos fotorreactivos de diseño especial anclados a la superficie de la capa promotora de la adhesión; impresión por microcontacto; bolígrafos de escritura por microcontacto; lápiz de dibujo o transferencia de atenuador/estampación de elementos de captura; canales microfluídicos y células de flujo realizados moldeando a partir de un polímero tal como lotes maestros de PMMA por ejemplo utilizando PDMS (polidimetilsilosano) o mediante medios micromecánicos o mecánicos, o realizados mediante técnicas de grabado para la entrega local de elementos de captura; estructurar los elementos de captura mediante fotoablação; o deposición de elementos de captura sobre atenuadores de gel que utilizan una de las técnicas mencionadas anteriormente o cualquier otra técnica de fotoinmovilización.

Los elementos de captura o reconocimiento que pueden depositarse sobre la plataforma son muchos y variados. Hablando en términos generales, las moléculas de captura utilizadas deberían poder realizar reacciones de afinidad. Ejemplos de moléculas de reconocimiento o captura que pueden utilizarse con la presente plataforma son los siguientes:

- nucleótidos, oligonucleótidos (y derivados químicos de los mismos)
- 35 ADN (cadena doble, cadena única) a) lineal (y derivados químicos de las mismas)
  - b) circular (por ejemplo plásmidos, cósmidos, BAC, YAC)
- 40 ARN total, ARN mensajero, ARNc, ARN mitocondrial, ARN artificial, aptámeros
- APN (ácidos peptonucleicos)
- 45 Anticuerpos policlonales, monoclonales, recombinantes, modificados genéticamente, antígenos, haptenos, subunidades de anticuerpos FAB (modificadas en caso necesario)
- 50 proteínas, proteínas modificadas, enzimas, cofactores o inhibidores enzimáticos, complejos proteínicos, lectinas, proteínas marcadas con histidina, quelatantes para componentes de etiqueta de histidina (etiqueta HIS), proteínas etiquetadas, anticuerpos artificiales, impresiones moleculares, anticuerpos artificiales ("plastibodies")
- 55 receptores de membrana, células completas, fragmentos de células y estructuras secundarias celulares, sinapsis, agonistas/antagonistas, células, orgánulos celulares, por ejemplo microsomas
  - moléculas pequeñas tales como benzodiazepinas,
  - prostaglandinas,
  - antibióticos, fármacos, metabolitos, metabolitos de fármacos
  - productos naturales
  - carbohidratos y derivados
  - ligandos naturales y artificiales
  - esteroides, hormonas
  - péptidos
- 60
- 65

polímeros naturales o artificiales  
 sondas moleculares  
 5 receptores naturales y artificiales  
 y derivados químicos de los mismos  
 reactivos quelantes, éter corona, ligandos, disposiciones supramoleculares  
 10 indicadores (pH, potencial, potencial de membrana, potencial redox)  
 muestras de tejidos (microseries de tejidos).

15 La actividad o densidad de las moléculas de captura puede optimizarse de varias maneras. La plataforma con los elementos de captura depositados sobre ella puede incubarse en atmósfera saturada de vapor de agua durante un periodo definido con el fin de rehidratar los loci impresos. Esto optimiza la densidad de las moléculas de captura, es decir, aumenta los puntos de unión disponibles por unidad de área. Posteriormente los chips incubados pueden cocerse durante un periodo definido, por ejemplo 1 minuto a 80°C para obtener moléculas de captura de ADNc. La plataforma  
 20 puede lavarse humedeciéndose con una cantidad pequeña de agua pura o cualesquiera otros líquidos y soluciones adecuados para evitar la contaminación cruzada de los elementos de captura por exceso de material desligado. Tras estos procedimientos, la plataforma preparada puede almacenarse en un desecador hasta que se utilice. Previamente a la utilización del chip, puede necesitarse un procedimiento adicional de lavado con tampón de hibridación de 0,1 a 10 ml u otras soluciones/líquidos adecuados para reactivar/rehidratar los elementos de captura secos y para quitar además  
 25 el exceso de elementos de captura desligados/residuos de tampón. En el caso de las moléculas de captura de ADN, se ha encontrado que el procedimiento de lavado es más eficaz cuando se realiza a una temperatura de entre 50 y 85°C.

Las etapas del procedimiento para el manejo de chips pueden automatizarse mediante la utilización de estaciones de hibridación tales como por ejemplo la estación GeneTAC®Hybridization de Genomic Solutions Inc., Michigan, EE.UU.  
 30

La técnica de medición concreta que va a describirse es aquella que implica luminiscencia, en concreto fluorescencia. Al llevar a cabo una medición, una muestra que va a investigarse se coloca sobre la zona de detección de la plataforma en la que los elementos de captura han sido proporcionados. Con el fin de lograr la fluorescencia, se añaden fluoróforos al sistema antes de tomar la medición. Los fluoróforos pueden añadirse a la muestra por ejemplo como reactivos de afinidad marcados aunque también es posible adjuntar fluoróforos a los elementos de captura sobre la plataforma. Las mediciones se basan en el hecho de que la emisión fluorescente desde los elementos de captura que contienen moléculas de captura marcadas y/o desde reactivos de afinidad marcados se cambia por su interacción con el analito o muestra bajo investigación. Pueden utilizarse etiquetas de diferentes longitudes de onda de excitación y emisión, habiendo una o varias etiquetas diferentes, siendo la etiqueta 1 para un experimento de control y la etiqueta 2 para el experimento.  
 40

La figura 3 muestra esquemáticamente el perfil de energía del campo evanescente en la posición de resonancia, y cómo se extiende más allá de la superficie de la capa (32) de óxido de metal de manera que pueda excitar los fluoróforos en las proximidades cercanas de la superficie de la zona de detección, por ejemplo fluoróforos adjuntos a las moléculas de captura o fluoróforos adjuntos a las moléculas unidas a las moléculas (38) de captura. El campo evanescente decrece exponencialmente hasta cero en aproximadamente una micra.  
 45

Se apreciará que al llevar a cabo un análisis, se realizan una o múltiples mediciones. Una puede ser medición de fondo antes que la muestra se ponga en contacto con los elementos de captura. Una segunda medición puede realizarse con/después de que la muestra se haya puesto en contacto con los elementos de captura. Para la comparación de múltiples muestras, por ejemplo muestra de "control" y "tratada" en experimentos de expresión génica, el chip puede regenerarse después del experimento de "control" tal como se describe aplicando el ejemplo 2, y una medida de fondo adicional y una medida tras/con la muestra "tratada" (que fue) aplicada al chip puede registrarse. Para obtener información con respecto a la cinética de reacción de los reactivos de afinidad, puede registrarse un conjunto completo de mediciones como una función de tiempo de incubación y/o de tiempo de lavado posterior. Una disposición típica para una medición de este tipo se muestra en la figura 6. La plataforma mostrada en la figura 2 se ajusta al ángulo al que se consigue una resonancia evanescente y se realiza una medición de la fluorescencia emitida desde la superficie de la plataforma utilizando la cámara (66) CCD. Esto proporciona una indicación de la fluorescencia emitida desde cada posición en la serie de elementos de captura depositados en la plataforma. Esto puede analizarse para deducir la afinidad de las reacciones que se han producido entre los elementos de captura y la muestra en investigación.  
 55

Una disposición como se muestra en la figura 6 captura toda la luminiscencia, por ejemplo, la fluorescencia, imagen de toda la plataforma en una toma sin tener que mover las partes durante la medición. Un dispositivo de este tipo de no barrido puede ser muy simple y barato y es especialmente adecuado para la aplicación de punto de cuidado o los sistemas portátiles. Otra disposición típica reduce la luz de láser coherente a las dimensiones de micrómetros mediante elementos ópticos aumentando de esta manera el campo eléctrico en el punto focal y barre la zona o zonas de detección.  
 60

## ES 2 273 704 T3

Se apreciará que puede analizarse una amplia variedad de muestras usando la presente técnica. Generalmente se toma la muestra para que sea toda la solución que va a analizarse y esta puede comprender una o varias sustancias a detectar. La muestra puede ser una solución de tejido purificado y procesado, u otros materiales obtenidos a partir de biopsia e investigación de examen y desarrollo que incluyen muestras para fines de diagnóstico. La muestra puede 5 ser también un medio biológico, tal como una yema de huevo, fluidos o componentes corporales del mismo, tal como sangre, suero y orina. Puede ser también agua superficial, solución o extractos de medios sintéticos o naturales, tales como suelos o partes de plantas, licores de procesos biológicos o licores sintéticos.

Para llevar a cabo la medición, puede introducirse la muestra en una celda de muestra del tipo mostrado en las 10 figuras 4a y 4b de los dibujos. Esta celda comprende una carcasa (41) que se fabrica a partir de un polímero tal como PMMA. Este polímero se ha trabajado con máquinas para definir un compartimiento (44) central con dimensiones correspondientes a las dimensiones de la plataforma. Una depresión adicional se forma en el compartimiento (44) para definir una cámara (46) que se obtura alrededor de su borde mediante una junta (47) tórica. La cámara (46) se abre en su parte superior e inferior. Puede introducirse la solución para analizar en la cámara (46) dentro de la junta (47) tórica 15 a través de una línea (45) de flujo. El flujo dentro de la línea (45) de flujo puede controlarse mediante una válvula (43). La celda incluye una cubierta (49) que puede situarse sobre y fijarse a la carcasa (41) para cerrar la parte superior de la celda. La cubierta (49) incluye una ventana (50) que se sitúa por encima del compartimiento (46) y permite de esta manera que la radiación pase a través de la cubierta y dentro de la celda (46).

20 En uso de la celda, el alojamiento (41) se sitúa contra la superficie de la plataforma que presenta los elementos de captura formados sobre la misma de manera que la tapa (49) está lejos de esa superficie. Esto pone a la cámara (46) en comunicación con la zona de detección de la plataforma. La muestra que va a investigarse se alimenta entonces al compartimiento (46) a través de la línea (45) de flujo de manera que se pone en contacto con los elementos de captura 25 sobre la superficie de la plataforma. Una medición de la fluorescencia inducida en varios puntos de captura se lleva a cabo entonces de la manera descrita anteriormente.

La figura 8 ilustra posibles formas alternativas de la plataforma.

Los elementos de detección pueden disponerse de varias maneras, por ejemplo, rectangular, circular, céntrica hexagonal, elipsoidal, lineal o laberíntica. La zona de detección puede ser rectangular, redonda o de cualquier otra forma. Las ranuras pueden disponerse o bien linealmente equidistantes o circularmente equidistantes, o pueden corresponder 30 a segmentos de tales estructuras.

La plataforma puede ser o bien rectangular o en forma de disco, o de cualquier otra geometría. La plataforma puede 35 comprender una o múltiples zonas de detección, cada zona de detección puede comprender uno o múltiples elementos de captura, y cada elemento de captura puede comprender una o más moléculas de captura marcadas o sin marcar.

La plataforma puede adaptarse también a dispositivos/placas de tipo de microtitulación para realizar uno o múltiples ensayos en los pocillos de microtitulación individuales. Esto puede conseguirse para todos los tipos de placas: 40 96, 384, 1536 o números superiores de pocillos, independientemente de las dimensiones de la placa de microtitulación respectiva.

Lo siguiente es un ejemplo específico de una plataforma:

### 45 1. Rendimiento físico de una plataforma 3-D: reflexión anómala

#### 1a. Plataforma 1

La plataforma de transductor de chip de genes comprende un sustrato plano, transparente (vidrio AF45 por Schott) 50 de 0,7 mm de espesor. En el sustrato, se graba una estructura de superficie periódica mediante medios fotolítográficos (deposición de capa fotorresistente, < 1  $\mu\text{m}$ ; escritura de estructura periódica en la capa protectora bien mediante dos haces de interferometría/holografía; grabar la capa protectora con grabado por iones reactivos usando gas Ar; eliminación del fotorresistente residual).

55 Las formas de la estructura de superficie son aproximadamente sinusoidales. El ancho (periodo) de una estructura individual es de 360 nm. La profundidad de las ranuras es de aproximadamente 38 nm.

En la parte superior de la superficie de vidrio estructurada de manera homogénea se deposita una película de óxido de metal transparente dieléctrica ( $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ) con alto índice de refracción de aproximadamente 2,2 a 633 nm de 60 longitud de onda. El procedimiento se realiza mediante recubrimiento iónico. La capa de espesor es de 130 nm. La estructura/arquitectura primaria de la superficie de vidrio se transfiere a la parte superior de la capa de óxido de metal debido al procedimiento de deposición anisotrópico y extremadamente energético.

Cuando un haz de láser extremadamente coherente, expandido paralelo se dirige al transductor a distintos ángulos 65  $\theta$ , correspondientes a una denominada posición de resonancia, se refleja casi toda la luz mediante la plataforma de transductor y la intensidad de transmisión de orden 0. se reduce a menos de un 1% (comparado con el 90-95% a un ángulo arbitrario).

## ES 2 273 704 T3

El ancho  $\Delta\theta$  del estado de resonancia, en el que se refleja casi toda la luz, es proporcional a la longitud de onda  $\lambda$  (633 nm, fija) y al coeficiente de pérdida de radiación  $\alpha$ . El coeficiente de pérdida de radiación se regula mediante la profundidad de las ranuras de trama, geometría y ciclo de trabajo de la estructura ondulada, y aumenta casi cuadráticamente con profundidades de ranura crecientes. Para este caso (633 nm de longitud de onda del láser, 130 nm de la capa de óxido de metal, 38 nm de profundidad de ranura) la pérdida de radiación es de aproximadamente 2000/cm, es decir, la distancia de propagación de un haz de láser guiado en un sistema de capas de este tipo antes de que se difracte fuera de la plataforma mediante la estructura periódica es de 1/2000 cm. = 5  $\mu\text{m}$ . Sorprendentemente esto es una distancia corta. Por tanto en estas circunstancias no se produce ninguna guíaonda. Puede reducirse adicionalmente la distancia de propagación mediante la mejora de las especificaciones de la plataforma.

Para la caracterización del efecto de resonancia, la intensidad del haz paralelo, (polarización TE) se ajusta a 100  $\mu\text{W}$  para una zona de diámetro de 4 mm (vatímetro Newport NRC 1835). El ángulo entre la plataforma normal y el haz incidente se gira de 1 a 2 grados lejos de la posición central de la reflexión anómala (estado de resonancia). La posición central está a 2,5°. La plataforma después se gira en etapas de 5/1000° (controlador PM 500 de Newport NRC) y el cambio de la potencia del haz transmitido se monitoriza. En el ángulo de resonancia, menos del 1% (< 1  $\mu\text{W}$ ) del haz transmitido original alcanza el detector. La potencial del haz de láser incidente se refleja totalmente (haz reflejado de manera especular: aproximadamente el 100%).

El ancho total en la mitad del máximo de resonancia para la reflexión anómala (FWHM) es en este caso 0,9°. La homogeneidad de la reflexión por toda la superficie del transductor (18 mm x 18 mm) es superior al 90%.

### 1b. Plataforma 2

Las formas de la estructura de superficie son aproximadamente rectangulares. El ancho (periodo) de una estructura individual es 360 nm. La profundidad de las ranuras es de aproximadamente 52 nm. En la parte superior de la superficie de vidrio estructurada de manera homogénea se deposita una película de óxido de metal transparente dieléctrica (Ta205) con alto índice de refracción de aproximadamente 2,15 a 633 nm de longitud de onda. El procedimiento se realiza mediante pulverización catódica. El espesor de la capa es de 150 nm. La estructura/arquitectura primaria de la superficie de vidrio se transfiere a la parte superior de la capa de óxido de metal debido al procedimiento de deposición anisotrópico y extremadamente energético.

Cuando un haz de láser extremadamente coherente, expandido paralelo se dirige al transductor a distintos ángulos  $\theta$ , correspondientes a una posición de resonancia, se refleja casi toda la luz mediante la plataforma de transductor y la intensidad de transmisión de orden 0. se reduce a menos de un 1% (comparado con el 90-95% en un ángulo arbitrario).

El ancho  $\Delta\theta$  del estado de resonancia, en el que se refleja casi toda la luz, es proporcional al coeficiente de pérdida de radiación  $\alpha$ . El coeficiente de pérdida de radiación en este caso (633 nm de longitud de onda, 150 nm de la capa de óxido de metal, 52 nm de profundidad de ranura) es superior a 2000/cm; es decir, la distancia de propagación de luz lanzada a un sistema de capas de este tipo antes de que se difracte fuera de la plataforma mediante la estructura periódica es de 1/2000 cm. = 5  $\mu\text{m}$ . Por tanto en estas circunstancias no se produce ninguna guíaonda.

Para la caracterización del efecto de resonancia, la intensidad del haz paralelo, (polarización TE) se ajusta a 600  $\mu\text{W}$  para una zona de diámetro de 4 mm (vatímetro Newport NRC 1835). El ángulo entre la plataforma normal y el haz incidente se gira 4 grados lejos de la incidencia normal. La plataforma después se gira en etapas de 5/1000° (controlador PM 500 de Newport NRC) y el cambio de la potencia del haz transmitido se monitoriza. En el ángulo de resonancia, menos del 0,5% (< 3  $\mu\text{W}$ ) del haz transmitido original alcanza el detector. La potencia del haz de láser incidente se refleja totalmente (haz reflejado de manera especular: aproximadamente el 100%).

Debido al ensanchamiento del ancho de resonancia de la plataforma 2 según ranuras más profundas comparadas con la plataforma 1, las curvas de resonancia del orden de difracción +1 y -1 se solapan creando una resonancia única extremadamente ancha situada exactamente a incidencia normal. El ancho total en la mitad del máximo de resonancia para la reflexión anómala (FWHM) es en este caso 4,2°. La homogeneidad de la reflexión por toda la superficie del transductor (18 mm x 18 mm) es superior al 95%.

### 55 2. Ejemplo para el análisis de expresión génica

#### a) Preparación

Las plataformas de detección (dimensiones 18 x 18 mm<sup>2</sup>) del tipo descrito con referencia a la figura 2 se sonicaron en primer lugar dos veces en cloroformo (FLUKA, "muy puro") y posteriormente dos veces en isopropanol (Merck, "Uvasol®"), durante 15 min en cada caso. Entonces se secó la plataforma a vacío y se limpió en un limpiador UV durante 30 min (Boeckel industries Inc, modelo 135500). Se calentó oxígeno a 75°C (agitación) y se añadieron 3-glicidoxipropil-trimetoxisilano (Fluka, "puro") al 2% v/v y también N-etildiisopropilamina (Fluka, "puro") al 0,2% v/v al disolvente calentado (agitación). Se introdujeron las plataformas en armarios metálicos y se incubaron durante 7 h en la solución a 75°C (agitación). Posteriormente se sonicaron las plataformas tres veces en acetonitrilo fresco (Fluka, "calidad para HPLC"), durante 15 min en cada caso. Entonces se sonicaron las plataformas en una solución de 3-amino-1-propanol (Fluka, "puro") al 2% v/v en acetonitrilo durante 15 min y después se incubaron en la misma solución toda la noche a temperatura ambiente (agitación). Al día siguiente, se sonicaron las plataformas tres veces

# ES 2 273 704 T3

durante 15 min en isopropanol fresco (Fluka. “calidad para HPLC”) y después tres veces durante 15 min en metanol fresco (Merck, “Uvasol®”). Finalmente, las plataformas se secaron y almacenaron a vacío

## b) Inmovilización de elementos de reconocimiento

Se imprimieron series que consisten en 10 ADNc diferentes (cada ADNc 10 réplicas: CYP 450 1A1, CYP 450 2B1 EST., CYP450 2B1, CYP 450 2B2, CYP 450 3A1 humano, CYP 450 3A2, CYP 450 4A1,  $\beta$ -actina, GAPDH, patrón externo) en la plataformas con impresoras de chorro de tinta (Microdrop GmbH, Norderstedt, Alemania). La concentración de las soluciones de ADNc era de 50 ng/ $\mu$ L. El diámetro (10 gotitas de chorro de tinta/posición) era aproximadamente de 250  $\mu$ m y el paso de los puntos era alrededor de 500  $\mu$ m. Por tanto, la dimensión global de las series 10 x 10 era alrededor de 5 x 5 mm<sup>2</sup>. Se muestra el diseño y la asignación de los puntos ADNc inmovilizados esquemáticamente en la figura 5. Se imprimieron las series en el centro de las plataformas con las dimensiones (18 x 18mm<sup>2</sup>). Posteriormente, se incubaron las plataformas durante la noche en un contenedor cerrado en atmósfera de vapor de agua saturada. Al día siguiente se cocieron los chips incubados durante un periodo definido, por ejemplo 1 minuto a 80°C. Después se aclararon las plataformas con agua desionizada y se secaron con flujo de nitrógeno.

## c) Configuración de la detección

Se muestra la configuración de la detección de manera esquemática en la figura 6. Un láser (61) de excitación (láser de HeNe, 633 nm, 1,3 mW) y un expensor (64) de haz 20x se montaron (62) unidos sobre un goniómetro (63). El haz de láser expandido se dirigió hacia la plataforma (67) mediante un espejo (68) dicroico. El centro de rotación para el haz de láser se dispone en el plano de la capa de óxido de metal de la plataforma (67). La fluorescencia emitida desde la superficie de la plataforma se captó a través del espejo (68) dicroico. Se utilizaron filtros (65) de fluorescencia adicionales para separar la fluorescencia (69) de la luz de excitación. Se utilizó una cámara (66) CCD (Astrocam EEV 30/11) enfriada equipada con una lente Nikon Noct (apertura numérica 1,2) para medir las imágenes de fluorescencia desde las plataformas de superficie. El goniómetro permitió el ajuste del ángulo del haz de láser expandido incidente con respecto a la superficie normal de la plataforma. Se tomaron las imágenes de fluorescencia en estados de resonancia evanescente (es decir, el haz de láser expandido incidente se ajustó a ese ángulo en el que la luz transmitida a través de la plataforma muestra un mínimo).

## d) Cartucho de chip

Se montó la plataforma en el cartucho (41) especialmente diseñado fabricado a partir de polímero/PMMA que se muestra esquemáticamente en la figura 4. La depresión (44) tenía las dimensiones (18 x 18 x 0,7 mm<sup>3</sup>) y la cámara (46) de incubación era de 0,2 mm de profundidad. Se intercambió la solución en la cámara de incubación a través de canales (45) de flujo de 0,5 mm de diámetro que se perforaron en el PMMA. Se intercambió el contenido del cartucho a través de la entrada/salida (42). Se situó la plataforma en la depresión correspondiente del cartucho con la zona de detección dirigida hacia la cámara de incubación. Se fijó la cubierta (49) para presionar la plataforma contra la obturación. La ventana (50) micromecanizada/fresada en la cubierta permitió la iluminación con luz de excitación y la adquisición de imágenes de fluorescencia de la superficie de la plataforma. El volumen válvula a válvula del cartucho era aproximadamente 14  $\mu$ L.

## e) Unidad de desnaturización

Se usó un elemento termoeléctrico para controlar la temperatura para la desnaturización (79°C), incubación, (42°C) regeneración (79°C) y lavado (42°C) de la plataforma en el cartucho de flujo.

## f) Preparación de la muestra

Se usaron 2 grupos de ratas (3 ratas en cada caso) para el presente estudio. Se trató un grupo (tratado) con 80 mg de fenobarbital, sal de sodio, en solución salina (NaCl al 0.9% p/v) por kg de peso corporal y el segundo grupo (control) solamente con NaCl al 0.9%. Se proporcionó un tratamiento diario en 4 días consecutivos. Al final de los 4 días, se sacrificaron los animales y se congelaron bruscamente muestras de hígado en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

Posteriormente y, se aisló el ARNm/ARN total y se marcó mediante transcripción inversa en una primera cadena de ADNc (incorporación de desoxinucleótidos marcados, las mismas o diferentes etiquetas para el control y tratada), se purificó y se disolvió en 20  $\mu$ L de tampón de hibridación.

## g) Procedimiento de ensayo

Se usó una jeringa gradual Cavro para bombear/aspirar los tampones y soluciones dentro del cartucho.

Se ejecutaron las siguientes etapas para medir la inducción CYP 450 en ratas:

1) 30 min de lavado previo a 79°C con 1 ml de tampón de hibridación (HB), medición del fondo I de la plataforma in contacto con HB.

# ES 2 273 704 T3

- 2) Inyección de muestra de “control” en el cartucho, 30 min de desnaturalización a 79°C, después incubación durante la noche a 42°C.
- 5 3) 10 min de lavado posterior a 42°C con 1 ml de HB, medición de intensidades de “control” de la plataforma en contacto con HB.
- 10 4) Regeneración: 30 min de lavado a 79°C con 1 ml de tampón de hibridación (HB), medición del fondo 2 de la plataforma en contacto con HB.
- 15 5) Inyección de muestra “tratada” en el cartucho, 30 min de desnaturalización a 79°C, después incubación durante la noche a 42°C.
- 6) 10 min de lavado posterior a 42°C con 1 ml de HB, medición de intensidades “tratadas” de la plataforma en contacto con HB.

15 Todas las imágenes de fluorescencia se midieron en condiciones de resonancia evanescente.

## *h) Procesamiento de datos*

20 Se calcularon las intensidades netas (fondo de control 1 y fondo tratado 2) de todos los puntos y todas las intensidades del conjunto de datos tratados se normalizaron con la ayuda de las intensidades del patrón externo. Las razones de expresión (número de veces de cambio - “fold change”) entre los genes respectivos se calcularon mediante la división de

25 
$$\text{número de veces del cambio} = \text{control/tratado normalizado}$$

Se calcularon los valores medios de cada una de las 10 copias.

## *i) Resultados*

30 Los chips ER medidos en condiciones de resonancia evanescente mostraron en general intensidades aproximadamente 100 veces más fuertes y razones mejoradas de señal/fondo.

35 Los valores medios para el número de veces del cambio se resumen en la siguiente tabla:

GENES	Número de veces del cambio
CYP 450 1 A1 (rata)	1,6
CYP 450 2B1 EST. (rata)	16
CYP 450 2B1(rata)	25
CYP 2B2 (rata)	32
CYP 450 3A1 (humano)	3,2
CYP 450 3A2 (rata)	2,5
CYP 450 4A1(rata)	1,6
$\beta$ -actina (rata)	2,1
GAPDH (rata)	2,3

## *3. Ejemplo para ilustrar la amplificación aumentada*

60 Se preparó y se procesó una plataforma según el ejemplo que acaba de describirse. Posteriormente a la incubación con la muestra, se tomaron 2 imágenes con la configuración de detección con la cámara CDD descrita anteriormente con referencia a la figura 6. La primera imagen se tomó en modo de epifluorescencia sin ajustarse a las condiciones para la resonancia evanescente (“epifluorescencia” en la figura 7a). La segunda imagen se tomó en condiciones de resonancia evanescente (“aumento ER” en la figura. 7b), es decir, el ángulo del haz de láser incidente se ajustó con respecto a la normal a la superficie hasta que la luz transmitida a través del chip mostró un mínimo. Los perfiles de imagen (señales netas) muestran que las intensidades medidas con aumento ER son aproximadamente 100 veces más fuertes que las intensidades obtenidas con epifluorescencia convencional.

# ES 2 273 704 T3

En el ejemplo descrito anteriormente se usa una única célula (41) de muestra para poner a la muestra en contacto con la zona de detección de la plataforma. Se apreciará que puede usarse el recipiente de muestras del tipo de microtitulación en compensación con una plataforma que presenta una pluralidad de zonas de detección para permitir la medición de una pluralidad de muestras y mejorando de este modo la eficiencia de la medición.

5

## 4. Microchip oligonucleótido para la discriminación de polimorfismo de nucleótido único (SNP)

### a. Preparación del chip

10 Las plataformas de detección (dimensiones 18 x 18 mm<sup>2</sup>) del tipo descrito con referencia a la figura 2 se sonicaron en primer lugar dos veces en cloroformo (FLUKA, "muy puro") y posteriormente dos veces en isopropanol (Merck, "Uvasol®"), durante 15 min en cada caso. Las plataformas se secaron a vacío y se limpiaron en un limpiador UV durante 30 min (Boeckel industries Inc, modelo 135500). Se calentó O-xileno a 75°C (agitación) y se añadió 3-glicidoxipropil-trimetoxisilano (Fluka, "muy puro") al 2% v/v y también N-etildiisopropilamina (Fluka, "muy puro") al 0,2% v/v al disolvente calentado (agitación). Las plataformas se montaron en soportes y se incubaron durante 7 h en la solución a 75°C (agitación). Posteriormente las plataformas se lavaron tres veces en acetonitrilo nuevo (Fluka, "grado HPLC"), durante 15 min en cada caso. Finalmente las plataformas se secaron y se almacenaron a vacío.

15

### b. Inmovilización de elementos de captura

20

Se imprimieron dos oligonucleótidos modificados con amino diferentes (sondas de captura) en un diseño de tipo tablero de ajedrez (5 x 5 = 25 puntos) en las plataformas silanizadas. Se usó una disposición de puntos en configuración de anillo GMS 417 para la impresión (Genetic Microsystems, Boston, MA). La concentración de los oligonucleótidos usada como moléculas de captura era de 100 nmol/ml. El diámetro de los puntos era de 125 micrómetros con 25 500 micrómetros de distancia de centro-a-centro. Los 2 oligonucleótidos se denominaron cPM ("capture perfect match" - correspondencia perfecta de captura) y cMM ("capture mismatch" - falta de correspondencia de captura) y se diferencian solamente en una base

30



35

cPM y cMM se marcaron con un grupo amino en el extremo 5' que permite la unión covalente de los oligonucleótidos con las plataformas funcionalizadas de epoxilo. Las series se imprimieron en el centro de las plataformas con las dimensiones (18 x 18 mm<sup>2</sup>). Posteriormente las plataformas se incubaron durante la noche en un recipiente cerrado en atmósfera de vapor de agua saturada. Al día siguiente los chips se secaron y se lavaron con 1 ml de solución de urea al 50% acuosa. Alternativamente, se usó una solución de albúmina de suero bovino (BSA, 1 mg/ml) acuosa. Tras el bloqueo los chips se aclararon con agua desionizada y se secaron con flujo de nitrógeno.

### c. Configuración de detección

40

Se usó configuración de detección descrita en el ejemplo anterior.

### d. Cartucho del chip

45

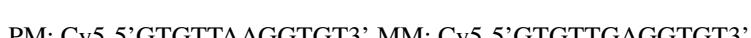
Se usó el cartucho del chip descrito en el ejemplo anterior.

50

### e. Analitos /muestras

55

Se usaron dos oligonucleótidos marcados con Cy5 denominados PM ("perfect match") y MM ("mismatch") con secuencias complementarias a los oligonucleótidos de captura inmovilizados cPM y cMM como los analitos:



La concentración de las soluciones de analitos era de 30 pM en cada caso

55

### f. Procedimiento de ensayo

En primer lugar se lavó una plataforma 2 veces con 1 ml de tampón de hibridación (HB), con 1 min de retraso entre los lavados. Posteriormente se inyectaron aproximadamente 15 ml de una solución (30 pM) de analitos PM en el cartucho de flujo. Tras 30 min de incubación, la plataforma se lavó con HB de 1 ml y una imagen de fluorescencia ("PM" en Fig. 9a) se tomó en la posición de resonancia del chip. Posteriormente, los oligonucleótidos marcados con fluorescencia unidos se eliminaron (retiraron) mediante inyección de 2 x 1 ml de una solución de urea al 50% acuosa con 2 min de retraso entre las inyecciones. Tras 2 min adicionales el chip se lavó mediante inyección de 2 x 1 ml de HB con 2 min de retraso entre las inyecciones y se tomó una imagen de fluorescencia ("regeneración" en la figura 9b) en la posición de resonancia del chip. Finalmente, se inyectaron aproximadamente 15 microlitros de solución (30 pM) de analito MM en el cartucho de flujo. Tras 30 min de incubación, la plataforma se lavó de nuevo con 1 ml de HB y una imagen de fluorescencia ("MM" en la figura. 9c) se tomó en la posición de resonancia del chip. Todas las etapas se realización a temperatura ambiente.

g. *Procesamiento de datos*

Se calculó la intensidad media de los 2 grupos diferentes de puntos de captura (cPM y cMM) para ambos experimentos (incubación de analito PM 30 pM y analito MM 30 pM). Además, se calculó la diferencia de la intensidad media cPM-cMM y la razón cPM/cMM.

h. *Resultados*

Se resumieron todos los datos calculados en la tabla siguiente. A partir de los datos obtenidos pueden distinguirse claramente los dos analitos de oligonucleótidos, PM marcado con Cy-5 y MM marcado con Cy-5, que sólo difieren en una base (SNP).

	Intensidad media de analito PM 30 pM [recuentos]	Intensidad media de analito MM 30 pM [recuentos]
Puntos cPM	1140	704
Puntos cMM	24	2075
cPM-cMM	1116	-1371
cPM/cMM	48	0,34

5. *Ejemplo de inmunoensayo para anticuerpos*

Los anticuerpos primarios están inmovilizados de manera espacialmente determinada (por ejemplo patrón de tablero de ajedrez) sobre la superficie de la plataforma de detección. La unión de los antígenos que han de detectarse y de los anticuerpos secundarios marcados con luminiscencia (usados para la detección de un segundo epítopo de los antígenos individuales que han de detectarse) se consigue mediante la incubación posterior, en primer lugar con el analito que contiene los diferentes antígenos en diferentes concentraciones, y luego con los anticuerpos secundarios marcados con luminiscencia.

Alternativamente, pueden mezclarse los antígenos (analito) y anticuerpos secundarios marcados con luminiscencia en una etapa de incubación previa, que permite la formación de complejos de anticuerpos secundarios marcados con luminiscencia con los antígenos. Tras esta etapa de incubación previa, la superficie de plataforma de detección se incuba con la mezcla.

Se cuantificaron los inmunocomplejos marcados con luminiscencia unidos a la superficie con la configuración ER (lavado previo con tampón adecuado, PBS, y lavado posterior si se requiere).

6. *Microchips de proteínas para inmunoensayos multiplexados*

a. *Preparación del chip*

Se sonicaron dos veces las plataformas de detección (dimensiones 18 x 18 mm<sup>2</sup>) del tipo descrito anteriormente en cloroformo (FLUKA, "muy puro") y posteriormente dos veces en isopropanol (Merck, "Uvasol®"), cada vez 15 min. Se secaron las plataformas a vacío y se limpiaron en un limpiador de UV durante 30 minutos (Boeckel Industries Inc, modelo 135500). Se colocaron los chips en un contenedor pequeño y se almacenaron en una solución molar 0,5 M de fosfato de octadecilo en propanol durante 24 horas. Posteriormente, se lavaron los chips con 5 ml de isopropanol para eliminar el exceso de fosfato de alquilo y se secó en un flujo de nitrógeno. Este procedimiento creó una monocapa autoensamblada (SAM) de fosfato de alquilo en la superficie de las plataformas. Esta capa que promueve la adhesión hizo que la plataforma fuera hidrófoba (ángulo de contacto de aproximadamente 100°) y permitió la adsorción de las proteínas sobre la plataforma mediante la interacción hidrófoba.

b. *Inmovilización de elementos de captura*

Se imprimieron dos anticuerpos monoclonales diferentes, gonadotropina coriónica antihumana (anti-hCG) y anti-interleucina 6 (anti-IL6) en un diseño de tipo tablero de ajedrez sobre las plataformas hidrófobas en una atmósfera de vapor de agua saturada (disposición 4 x 4,8 puntos para cada anticuerpo). La concentración de las soluciones de anticuerpo de captura fue de 400 y 100 microgramos/ml, respectivamente. Se usó una impresora de chorro de tinta para la impresión (Microdrop, Norderstedt, Alemania). El diámetro de los puntos fue de 150 micrómetros con una distancia de centro a centro de 320 micrómetros. Se incubaron las disposiciones impresas durante 2 horas en un contenedor cerrado en atmósfera de vapor de agua saturada. Posteriormente, se secaron los chips y aclararon con 10 ml de una solución de solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía el 10% de albúmina de suero bovino (BSA), el 5% en sacarosa y el 0,02% en azida de sodio. Esta etapa de lavado bloqueó la superficie hidrófoba

# ES 2 273 704 T3

de los chips mediante la adsorción de BSA e hizo que la superficie fuera más hidrófila después de que se hubieran inmovilizado los elementos de captura. En consecuencia, el procedimiento de bloqueo evitó una unión no específica de las proteínas a la plataforma que podrían causar un incremento en la fluorescencia de fondo. Tras el bloqueo, los chips se aclararon con agua desionizada y se secaron con flujo de nitrógeno. Se almacenaron las plataformas en un refrigerador hasta su uso.

5        *c. Configuración de detección*

10      Se usó la configuración CCD descrita en el ejemplo 2.

10        *d. Cartucho de chip*

15      Se usó el cartucho descrito en el ejemplo 2.

15        *e. Analitos/muestras*

15      Se prepararon 3 soluciones de analitos:

20      I) una solución que contiene 500 ng/ml del antígeno IL6 marcado con Cy-5

20      II) una solución que contiene 50 ng/ml del antígeno gonadotropina coriónica humano (hCG) marcado con Cy-5

25      III) una mezcla incubada previamente (1 hora) que contiene 50 ng/ml de IL6 y 100 ng/ml de anticuerpo anti-IL6 policlonal marcado con Cy5.

25      Para los analitos se utiliza PBS a pH 7.0 que contiene el 1% de BSA como disolvente para los analitos.

30        *f. Procesamiento del ensayo*

30      Se prepararon tres plataformas (como se describió en 6b) para la incubación de analitos (véase e) montando las plataformas en cartuchos y lavándolas con 1 ml de PBS a pH 7.0 que contenía el 1% de BSA. Posteriormente, se inyectaron aproximadamente 15 microlitros de las soluciones de analitos I), II) y III) en los cartuchos de flujo. El tiempo de incubación fue de 2 horas para cada I) y II). Para el analito III) el tiempo de incubación fue de 12 horas. Tras la incubación del analito, se lavaron las plataformas con 1 ml de PBS a pH 7.0 que contenía el 1% de BSA.

35      Se tomaron imágenes de fluorescencia de los chips en condiciones fuera de resonancia (epifluorescencia, aproximadamente 7° fuera del ángulo de resonancia) y en condición de resonancia para cada chip (resonancia, luz incidente aproximadamente 2,5° con respecto a la normal). Las imágenes y datos obtenidos se muestran en la figura 10. Todas las etapas se realizaron a temperatura ambiente.

40        *g. Procesamiento de datos*

40      Se calcularon las intensidades medias y el fondo de los puntos mediante la ayuda del software Array Imagene (TM) (Biodiscovery, Los Angeles, CA). La media de puntos de la figura 10 representa la intensidad media corregida de fondo de los elementos de captura respectivos de interés. Además, se calculó el ruido como desviación estándar del fondo de las imágenes de fluorescencia. Por tanto, la señal/ruido de la figura 10 corresponde a la razón de la media de puntos sobre la desviación estándar de fondo.

45        *h. Resultados*

50      En la figura 1a se resumen todos los datos calculados. En la figura 10 se resumen las imágenes y los datos obtenidos en el modo de epifluorescencia así como en condiciones de resonancia. Las filas I) y II) muestran los resultados de una inmunorreacción entre los anticuerpos de captura monoclonales inmovilizados y los antígenos marcados (IL6 marcado con Cy5 y hCG respectivamente).

55      La fila III) corresponde a una inmunorreacción de tipo intercalado entre un anticuerpo monoclonal inmovilizado (anti IL6) y una mezcla incubada previamente de antígeno IL6 y un anticuerpo polyclonal secundario marcado con CY5 frente a IL6.

60      Para los resultados de la fila I) la intensidad de la señal aumenta de 46 recuentos en modo de epifluorescencia a 1100 recuentos en modo de resonancia de la plataforma. Esto corresponde a un factor de aumento de aproximadamente 24 con respecto a los valores medios de puntos. La razón señal/ruido mejora de 7,0 (epifluorescencia) a 69,2 (resonancia), correspondiendo a un factor de 10.

65      Para los resultados de la fila II) la intensidad de la señal aumenta de 32 recuentos en modo de epifluorescencia a 646 recuentos en modo de resonancia de la plataforma. Esto corresponde a un factor de aumento de aproximadamente 20 con respecto a los valores medios de puntos. La razón señal/ruido mejora de 5,0 (epifluorescencia) a 75,1 (resonancia), correspondiendo a un factor de 15.

# ES 2 273 704 T3

Para los resultados de la fila III) la intensidad de la señal aumenta de 25 recuentos en modo de epifluorescencia a 296 recuentos en modo de resonancia de la plataforma. Esto corresponde a un factor de aumento de aproximadamente 12 con respecto a los valores medios de puntos. La razón señal/ruido mejora de 3,8 (epifluorescencia) a 44,1 (resonancia), correspondiendo a un factor de 12.

5 Los valores medios de puntos y de señal/ruido para los 3 ensayos son al menos un orden de magnitud superior para los chips en modo de resonancia en comparación a los mismos chips en modo de no resonancia (epifluorescencia). Las imágenes de fluorescencia de las filas I) y II) son complementarias (diseño de tablero de ajedrez). Todos los chips utilizados tienen el mismo conjunto de elementos de captura, es decir anti-hCG monoclonal y anti-IL6 monoclonal.

10 Se apreciará que son posibles muchas alternativas a las realizaciones descritas.

Otra característica de la presente plataforma es que permite adquirir en paralelo conjuntos de datos más amplios. También puede usarse varias veces. Pueden regenerarse los complejos de afinidad inmovilizados a una temperatura elevada usando disolventes orgánicos/o reactivos caotrópicos (disoluciones salinas) mientras que se mantiene la capacidad de unión de forma sustancialmente completa.

15 En la descripción anteriormente dada se irradia toda la zona de una región de detección. También es posible utilizar un láser con un haz convergente no expandido y explorar la zona de detección de modo que a su vez se excita el elemento de captura final. Esta disposición permite el uso de un fotodetector más barato que la cámara CCD por ejemplo puede usarse un fotomultiplicador, fotodiodo de avalancha. Esta disposición también aumentará adicionalmente la sensibilidad debido al hecho de que la energía láser está más limitada.

20 También es posible diseñar plataformas para su uso como portaobjetos permitiendo de este modo su uso con un microscopio de fluorescencia.

25 También pueden diseñarse las plataformas para su uso con sistemas microfluídicos a gran escala tales como los descritos en el documento WO97/02357.

30 En la descripción anterior se ha descrito el uso de la plataforma en aplicación con fluorescencia de excitación y detección. Se apreciará que puede utilizarse la plataforma en disposiciones en las que las reacciones de afinidad se detectan por cambios de luminiscencia. También se apreciará que puede usarse la plataforma en disposiciones en las que las reacciones de afinidad se detectan por cambios en el índice de refracción.

35 Puede usarse un procedimiento según la presente invención en muchas aplicaciones de las que la siguiente es una lista no exclusiva.

- Expresión génica

40 - Genómica

- Farmacogenómica

- Toxicogenómica

45 - Toxicoproteómica

- Genética

50 - Farmacogenética

- Toxicogenética

- Obtención de perfiles de la expresión exón/intrón

55 - Tipificación de los antígenos de leucocitos humanos (HLA)

- Análisis de variantes de corte y empalme

60 - Proteómica (ensayos de proteínas en chips)

- Monitorización de pacientes (fármaco, metabolitos, y marcadores)

- Punto-de-cuidado, "medicina personalizada"

65 - Diagnosis

- Geles 2d en chip para proteómica o separación 2d en general

## ES 2 273 704 T3

- SNP (“single nucleotides polymorphism”, polimorfismo de nucleótido único), mini-secuenciado
  - Detección de alto rendimiento
  - 5 - Química combinatoria
  - Interacción proteína-proteína
  - Interacción molecular
  - 10 - Interacción de proteína-anticuerpo y péptido basada en chips
  - Proteína fluorescente verde (GFP, “Green fluorescent protein”)
  - 15 - Hibridación *in-situ*
  - Microscopía confocal
  - Espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS)
  - 20 - Microscopía convencional
  - MALDI-TOF MS.
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para analizar una muestra o muestras que comprende poner la muestra o muestras en contacto con la zona de detección de una plataforma (10) de detección, comprendiendo dicha plataforma un sustrato (10) ópticamente transparente que presenta un índice  $n_1$  de refracción, una capa (32) ópticamente transparente no metálica, formada sobre una superficie del sustrato, presentando dicha capa un índice  $n_2$  de refracción que es superior a  $n_1$ , incorporando dicha plataforma en la misma una o múltiple estructuras (33) onduladas que comprenden ranuras periódicas que definen una o múltiples regiones o zonas de detección, cada una para uno o múltiples elementos de captura, en el que
- (a) la profundidad de las ranuras está en el intervalo de 3 nm con respecto al espesor de la capa ópticamente transparente,
- (b) el espesor de la capa (32) ópticamente transparente está en el intervalo de 30 a 1000 nm,
- (c) el periodo de la estructura (33) ondulada está en el intervalo de 200 a 1000 nm,
- (d) la razón de profundidad de ranura con respecto al espesor de la capa (32) ópticamente transparente está en el intervalo de 0,02 a 1, y
- (e) la razón de ancho de ranura con respecto al periodo de las ranuras está en el intervalo de 0,2 a 0,8, según lo cual
- 1) la luz coherente incidente sobre dicha plataforma en un ángulo apropiado puede difractarse en haces individuales u órdenes de difracción que interfieren dando como resultado la reducción del haz transmitido y una alta reflexión anómala de la luz incidente, generando de este modo un aumento del campo evanescente en la superficie de la una o múltiples zonas de detección; o
- 2) la luz coherente y linealmente polarizada incidente sobre dicha plataforma en un ángulo adecuado puede difractarse en haces individuales u órdenes de difracción que interfieren dando como resultado la extinción casi total del haz transmitido y una alta reflexión anómala de la luz incidente, generando de este modo un aumento del campo evanescente en la superficie de la una o múltiples zonas de detección, y por lo que se irradia la plataforma de detección con un haz (16) de luz que es incidente sobre la plataforma (10) en un ángulo tal que se provoca que se produzca una resonancia evanescente creando dicho aumento del campo evanescente dentro de la zona de detección de la plataforma, y detectando la radiación que emana de la zona de detección.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichas estructuras (33) onduladas comprenden ranuras periódicas sustancialmente paralelas que son de difracción única o múltiple y ranuras que representan una o múltiples regiones o zonas de detección.
3. Procedimiento según una cualquiera de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el sustrato (30) de la plataforma se forma de material inorgánico.
4. Procedimiento según una cualquiera de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el sustrato (30) se forma de material orgánico.
5. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que el sustrato (30) se forma de cristal,  $\text{SiO}_2$ , cuarzo o Si.
6. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que el sustrato (30) se forma de polímeros orgánicos tales como PP, PC, PMMA, PI, PS, PE, PET o PU.
7. Procedimiento según una cualquiera de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la capa (32) ópticamente transparente se forma de material inorgánico.
8. Procedimiento según una cualquiera de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la capa (32) ópticamente transparente se forma de material orgánico.
9. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que la capa (32) ópticamente transparente es un óxido de metal tal como  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{ZnO}$  o  $\text{HfO}_2$ .
10. Procedimiento según la reivindicación 8, en la que la capa (32) ópticamente transparente se forma de poliamida, poliimida, PP, PS, PMMA, ácidos poliacrílicos, ésteres poliacrílicos, politioéter, o poli(sulfuro de fenileno) y derivados de los mismos.
11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la profundidad de las ranuras de difracción es de 10 nm con respecto al espesor de la capa ópticamente transparente.

## ES 2 273 704 T3

12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las ranuras son generalmente rectangulares en un corte transversal.
13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que las ranuras son sinusoidales, trapezoidales o dentadas en una vista en corte transversal.
14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la plataforma (10) es cuadrada o rectangular y las ranuras se extienden linealmente a lo largo de la plataforma.
15. 15. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la plataforma (10) tiene forma de disco y las ranuras son circulares o lineales.
16. Procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que las ranuras se forman sobre una superficie del sustrato (30).
17. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que las ranuras se forman sobre una superficie de la capa (32) ópticamente transparente.
18. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que las ranuras se forman tanto sobre la superficie del sustrato (30) como sobre la superficie de la capa (32) ópticamente transparente.
19. Procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que se optimiza la superficie ondulada de una o más zonas de detección para una longitud de onda de excitación concreta y/o un tipo de polarización concreto.
20. 20. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que se optimiza la superficie ondulada de una o más zonas de detección para distintas longitudes de onda y/u orientaciones de polarización.
21. Procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que la superficie de la capa (32) ópticamente transparente incluye una o una pluralidad de zonas de detección, la que o cada una de las que soporta uno o una pluralidad de elementos de captura.
22. Procedimiento según la reivindicación 21, en el que cada elemento de captura contiene moléculas de captura individuales y/o mezcladas de las mismas, que son susceptibles de reacciones de afinidad.
23. Procedimiento según la reivindicación 21, en el que los elementos de captura se disponen en una serie bidimensional.
24. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, en el que la plataforma (10) incluye una capa que promueve la adhesión dispuesta en la superficie de la capa ópticamente transparente con el fin de permitir la inmovilización de las moléculas de captura.
25. Procedimiento según la reivindicación 24, en el que la capa que promueve la adhesión comprende una o múltiples capas de moléculas inorgánicas y/u orgánicas o derivados de las mismas que proporcionan propiedades químicas, físicas, espectroscópicas y/o fotofísicas fotoquímicas/biológicas/bioquímicas adicionales con el fin de manipular las propiedades funcionales globales del sistema de capas que promueve la adhesión resultante.
26. Procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que la plataforma (10) se forma con una pluralidad de regiones o zonas de detección, presentando cada una sus propias ranuras de difracción o múltiples ranuras superpuestas adecuadas para una excitación de múltiples colores y detección de muestras.
27. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 en el que el número de elementos o moléculas de captura que han de inmovilizarse sobre la plataforma no está limitado y se corresponde con el número de genes, secuencias de ADN, motivos de ADN, microsatélites de ADN, polimorfismos de nucleótido único, fragmentos de células o proteínas que contribuyen a un genoma de una especie u organismo de interés, o una selección o combinación de los mismos.
28. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 27 en el que el elemento o elementos o moléculas de captura comprenden uno o más de los siguientes:
- 60 nucleótidos, oligonucleótidos (y derivados químicos de los mismos)
- ADN (cadena doble, cadena única) a) lineal (y derivados químicos de las mismas)
- b) circular (por ejemplo plásmidos, cósmidos, BAC, YAC)
- 65 ARN total, ARN mensajero, ARNc, ARN mitocondrial, ARN artificial, aptámeros
- APN (ácidos peptonucleicos)

# ES 2 273 704 T3

Anticuerpos policlonales, monoclonales, recombinantes, modificados genéticamente, antígenos, haptenos, subunidades de anticuerpos FAB (modificadas en caso necesario)

5 proteínas, proteínas modificadas, enzimas, cofactores o inhibidores enzimáticos, complejos proteínicos, lectinas, proteínas marcadas con histidina, quelatantes para componentes de etiqueta de histidina (etiqueta HIS), proteínas etiquetadas, anticuerpos artificiales, impresiones moleculares, anticuerpos artificiales ("plastibodies")

receptores de membrana, células completas, fragmentos de células y estructuras secundarias celulares, sinapsis, agonistas/antagonistas, células, orgánulos celulares, por ejemplo microsomas

10 moléculas pequeñas tales como benzodiazepinas,

prostaglandinas,

15 antibióticos, fármacos, metabolitos, metabolitos de fármacos

productos naturales

carbohidratos y derivados

20 ligandos naturales y artificiales

esteroides, hormonas

25 péptidos

polímeros naturales o artificiales

sondas moleculares

30 receptores naturales y artificiales

y derivados químicos de los mismos

35 reactivos quelantes, éter corona, ligandos, disposiciones supramoleculares

indicadores (pH, potencial, potencial de membrana, potencial redox)

muestras de tejidos (microseries de tejidos).

40 29. Procedimiento según cualquier reivindicaciones anterior, que incluye añadir material que induce fluorescencia a las muestras de investigación y detectar la fluorescencia inducida en dichas muestras mediante la excitación de las muestras por el aumento del campo evanescente.

45 30. Procedimiento según la reivindicación 29 en el que el material que induce fluorescencia comprende un marcador luminiscente.

50 31. Procedimiento según la reivindicación 30, en el que el marcador luminiscente comprende un compuesto o compuestos que presentan luminiscencia en el intervalo de desde 400 nm a 1200 nm que están funcionalizados o modificados con el fin de unirse a uno o más de los reactivos de afinidad, que incluyen derivados de uno o más de los siguientes:

polifenilo y compuestos heteroaromáticos

estilbenos,

55 cumarinas,

colorantes de xanteno,

60 colorantes de metina,

colorantes de oxacina,

rodaminas,

65 fluoresceínas,

cumarinas, estilbenos,

# ES 2 273 704 T3

pirenos, perilenos,

cianinas, oxacianinas, ftalocianinas, porfirinas, naftalocianinas, derivados del azobenceno, diestirilbifenilos,

5 complejos de metales de transición por ejemplo complejos de polipiridilo/rutenio, cloruro de tris(2,2'-bipiridil)rutenio, cloruro de tris(1,10-fenantrolina)rutenio, cloruro de tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)rutenio y complejos de polipiridilo/fenazina/rutenio, tales como octaetilo-platino-porfirina, complejos de europio y terbio

10 haces/partículas de puntos cuánticos o derivados de los mismos.

15 32. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores cuando se utiliza en uno cualquiera o más de los siguientes:

- Expresión génica

20 - Genómica

- Farmacogenómica

- Toxicogenómica

- Toxicoproteómica

- Genética

25 - Farmacogenética

- Toxicogenética

30 - Obtención de perfiles de la expresión exón/intrón

- Tipificación de los antígenos de leucocitos humanos (HLA)

- Análisis de variantes de corte y empalme

35 - Proteómica (ensayos de proteínas en chips)

- Monitorización de pacientes (fármaco, metabolitos, y marcadores)

40 - Punto-de-cuidado, “medicina personalizada”

- Diagnosis

- Geles 2d en chip para proteómica

45 - SNP (“single nucleotides polymorphism”, polimorfismo de nucleótido único), mini-secuenciado

- Detección de alto rendimiento

- Química combinatoria

50 - Interacción proteína-proteína

- Interacción molecular

55 - Interacción de proteína-anticuerpo y péptido basada en chips

- Proteína fluorescente verde (GFP, “Green fluorescent protein”)

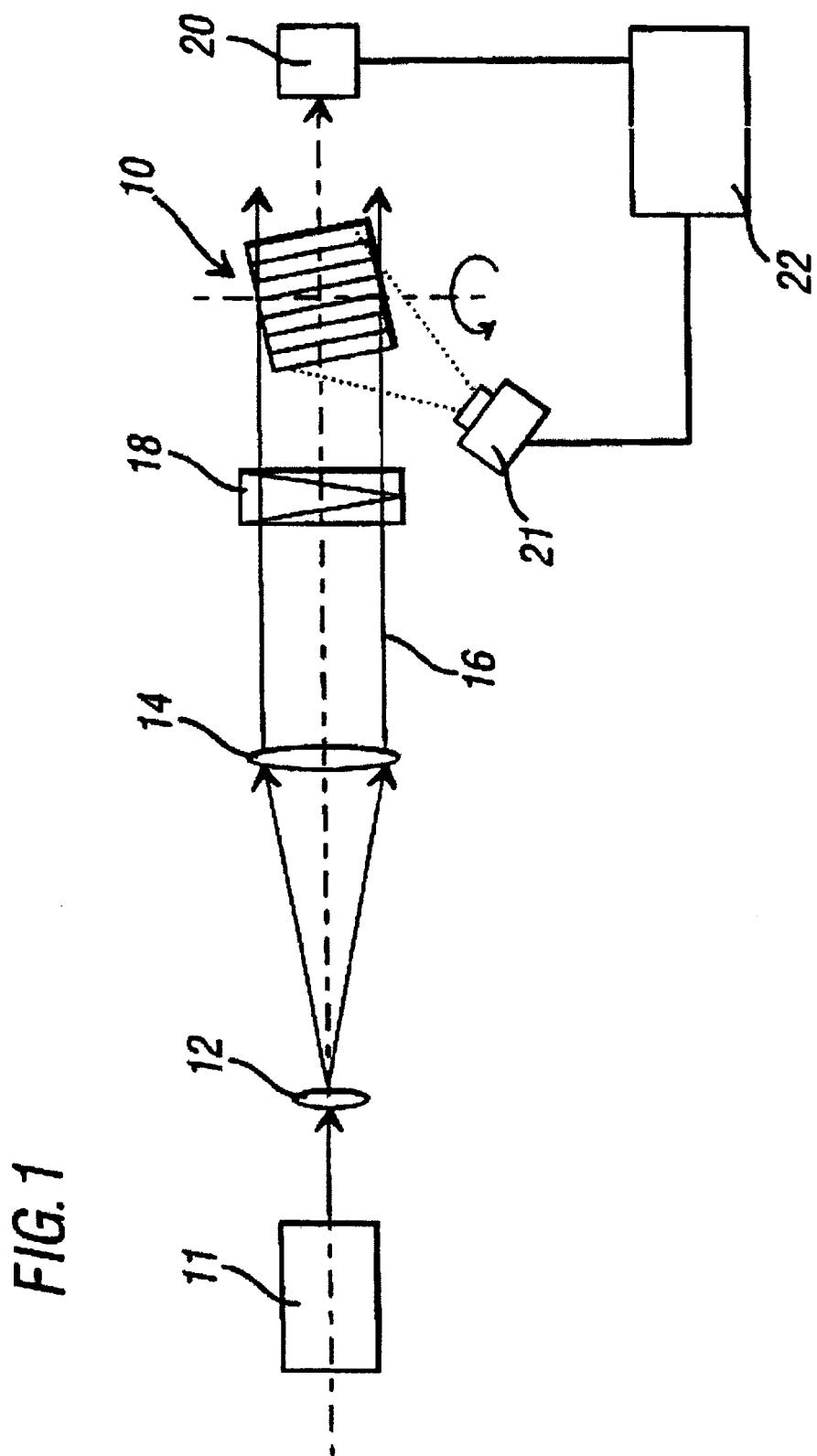
- Hibridación *in-situ*

60 - Microscopía confocal

- Espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS)

65 - Microscopía convencional

- MALDI-TOF MS.



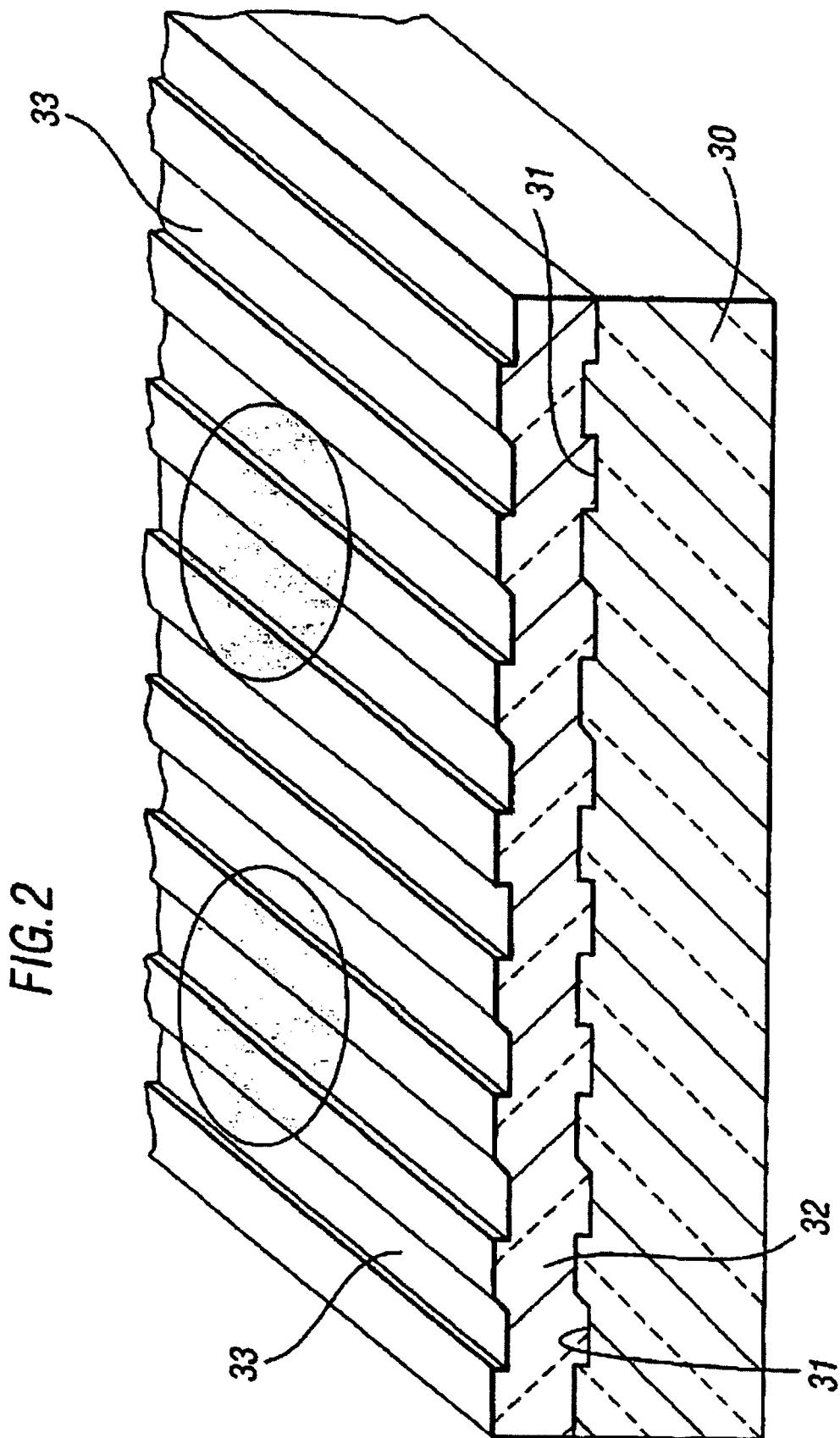


FIG. 2

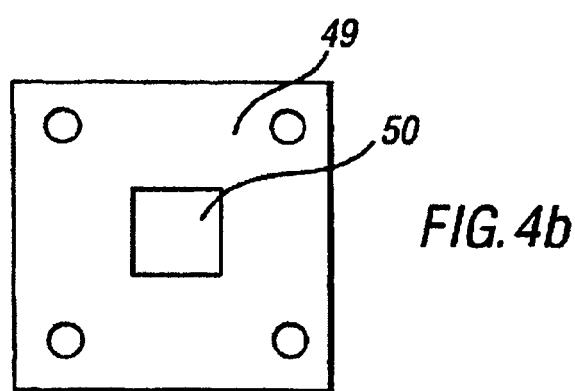
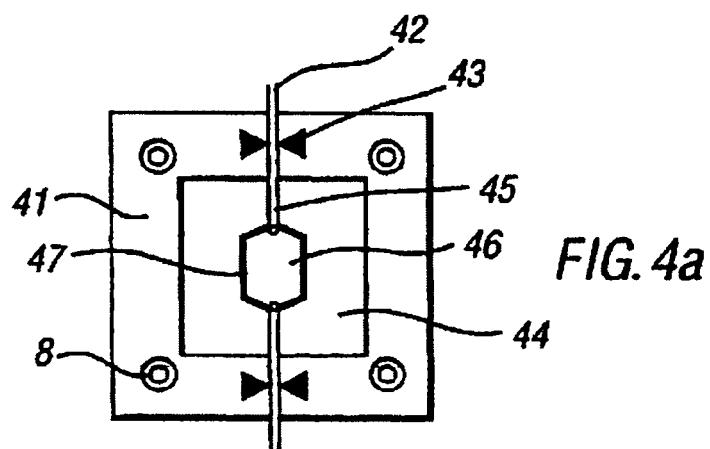
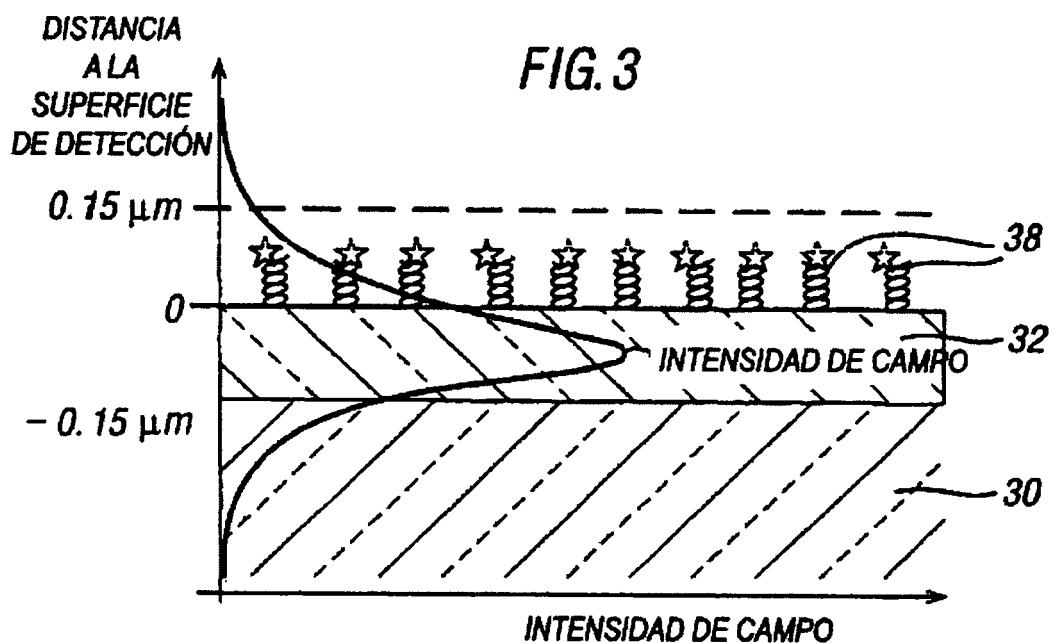


FIG.5

#	ADNc
1	1A1
2	2B1 EST
3	2B1
4	2B2
5	3A1 h.
6	3A2
7	4A1
8	$\beta$ -actina
9	GAPDH
10	Patrón ext

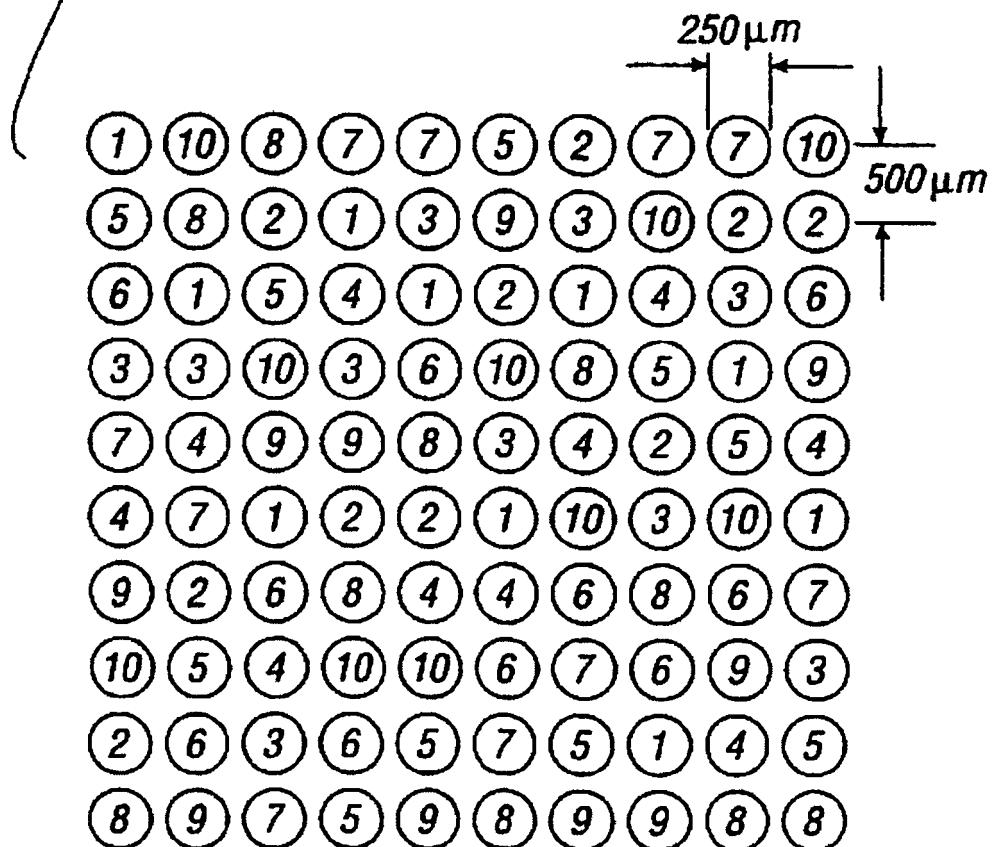


FIG. 6

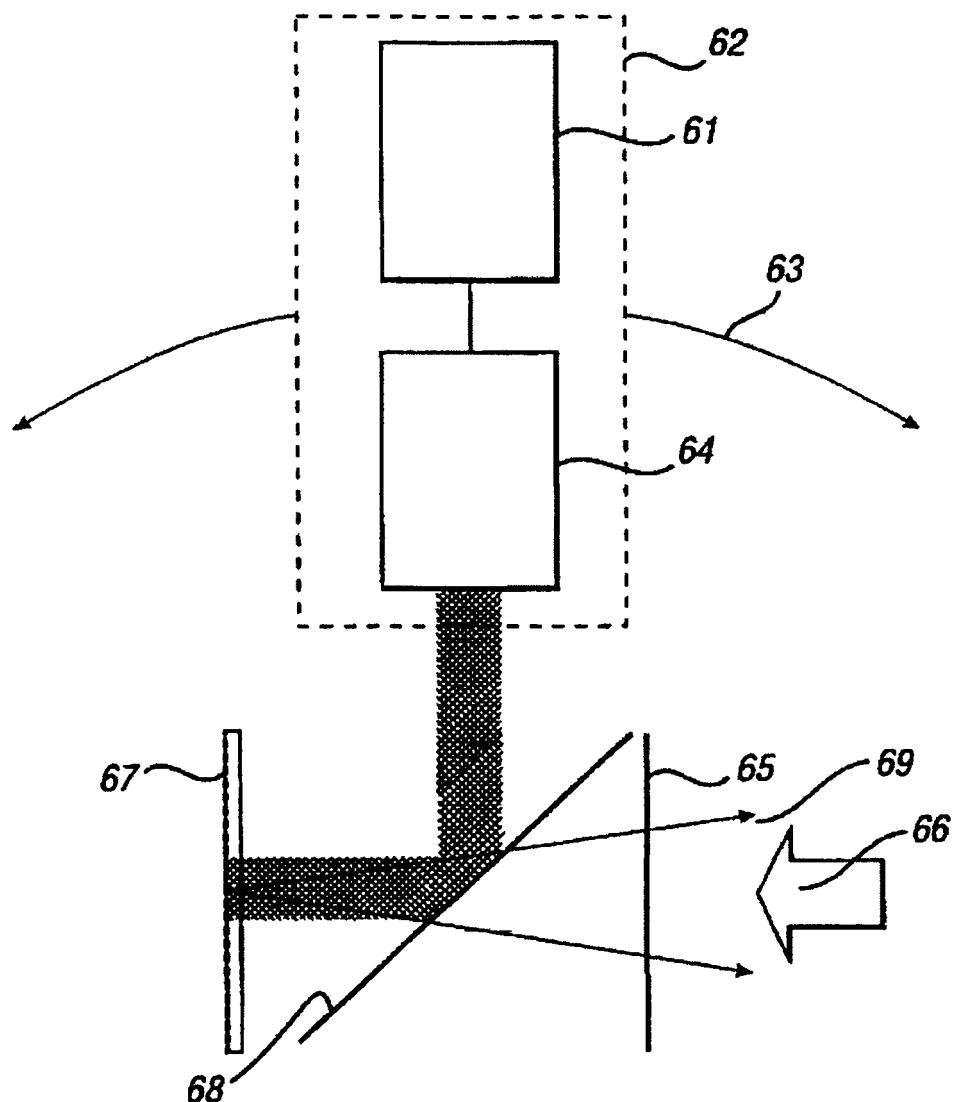


FIG. 7a

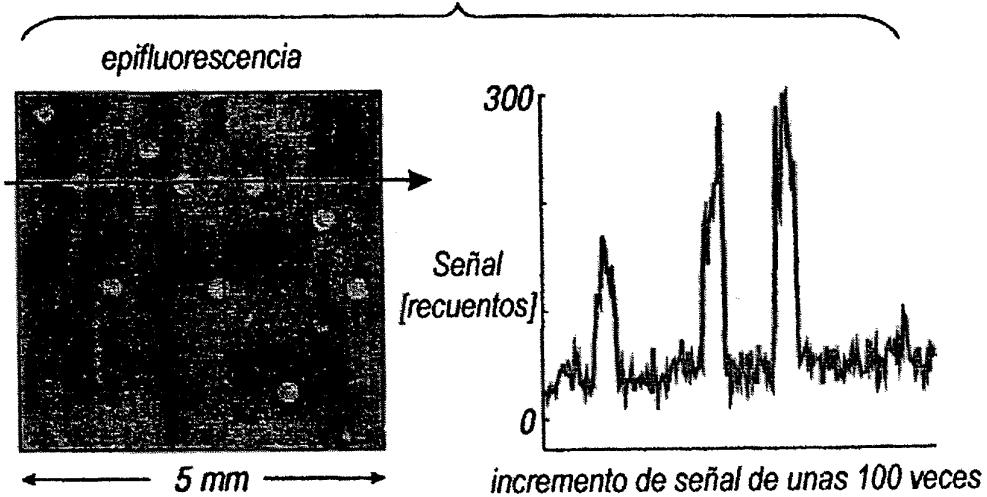
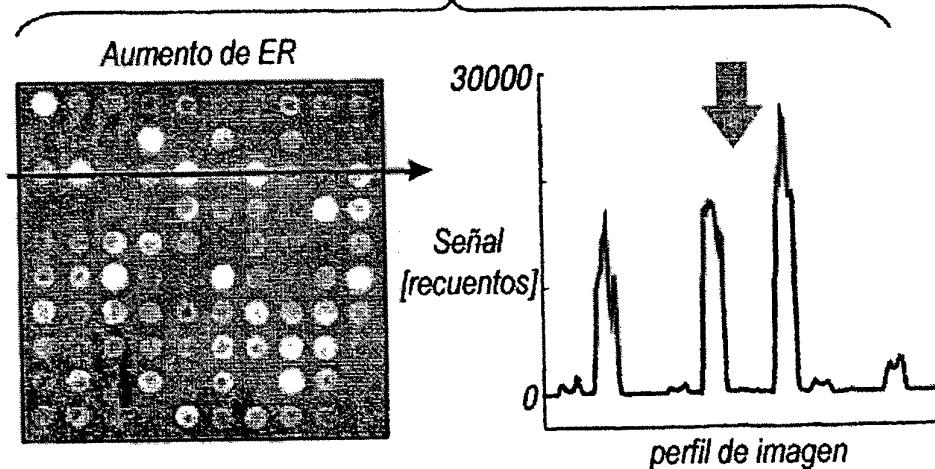
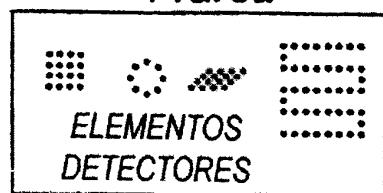


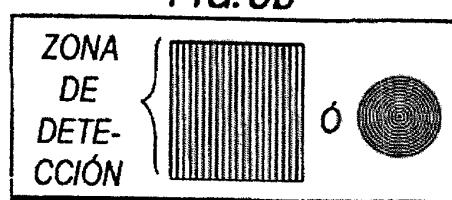
FIG. 7b



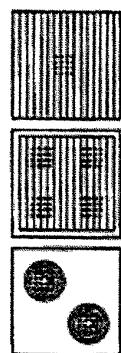
*FIG. 8a*



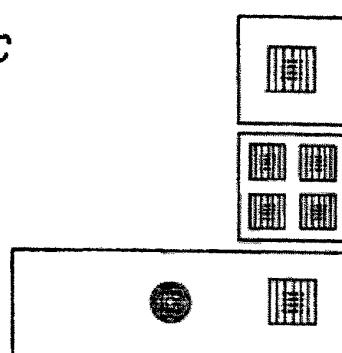
*FIG. 8b*



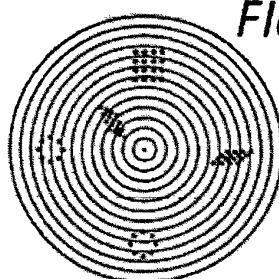
*FIG. 8c*



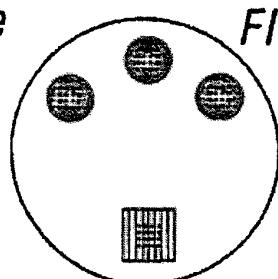
*FIG. 8d*



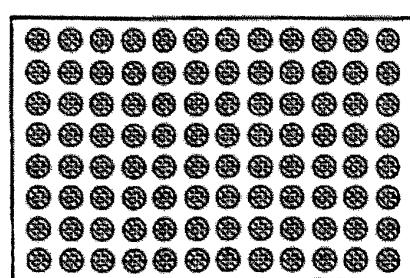
*FIG. 8e*



*FIG. 8f*



PLATAFORMA CON FORMA DE DISCO



*FIG. 8g*

DISPOSITIVOS DE TIPO  
MICROTITULACIÓN  
/ NANOTITULACIÓN  
(96/384/...)

REGENERACIÓN  
UREA AL 50%

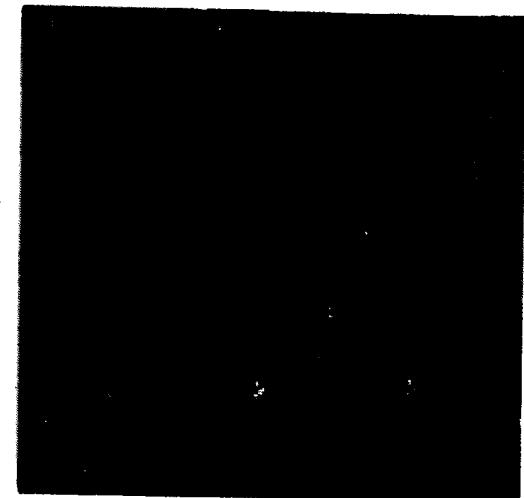


FIG. 9b

PM

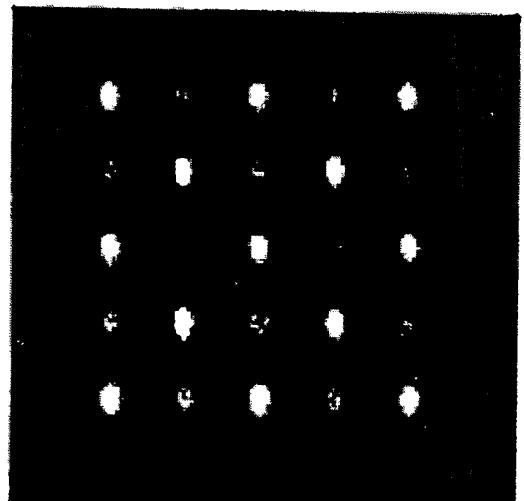


FIG. 9c

MM

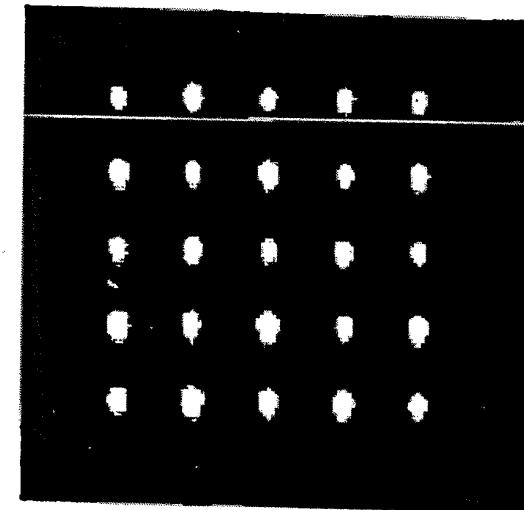
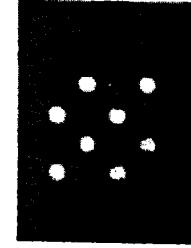
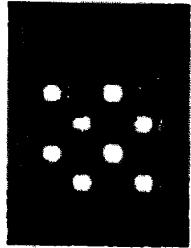
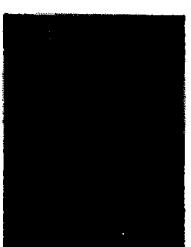
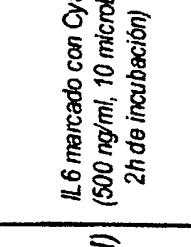
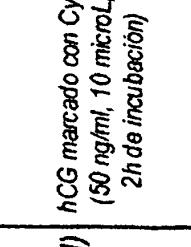


FIG. 9c

FIG. 10

		epi fluorescencia			resonancia		
	proto-chips incubados con	imagen	media de puntos (recuentos)	señal/ ruido*)	imagen	media de puntos (recuentos)	señal/ ruido*)
I)	IL6 marcado con Cy5 (500 ng/ml, 10 microl, 2h de incubación)		46	7.0		1100	69.2
II)	hCG marcado con Cy5 (50 ng/ml, 10 microl, 2h de incubación)		32	5.0		646	75.1
III)	Mezcla de anti-IL6 (políclonal) / IL6 marcada con Cy5 (50 ng/ml, 10 microl, 12h de incubación)		25	3.8		296	44.1

\*) ruido [recuentos] definido como desviación estándar de fondo de imagen