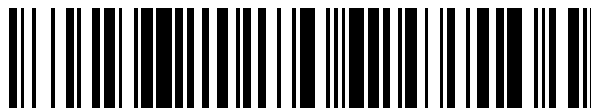


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 623**

21 Número de solicitud: 201430058

51 Int. Cl.:

G01N 21/01 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

22.01.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

22.07.2015

Fecha de la concesión:

06.05.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

13.05.2016

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)**

**C/ Serrano, 117
28006 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**RODRÍGUEZ RUIZ, Isaac;
GAVIRA GALLARDO, José Antonio;
LLOBERA ADÁN, Andreu;
GARCÍA RUIZ, Juan Manuel y
GÓMEZ MORALES, Jaime**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Sistema optofluídico para reacciones biocatalíticas con cristales de enzimas entrecruzados**

57 Resumen:

Sistema optofluídico para reacciones biocatalíticas con cristales de enzimas entrecruzados.

Permite cristalización y entrecruzamiento de cristales (12) enzimáticos in situ y comprende: a) cámara de mezcla con: i) primera entrada (2) para alimentar una disolución reactante, ii) segunda entrada (1) para la alimentación de un fluido de transporte, inmiscible con la disolución reactante, iii) zona de mezcla (3) para mezclar disolución reactante y fluido de transporte, y iv) canales de unión (13, 14) entre cada entrada (1, 2) de alimentación y la zona de mezcla (3); b) zona de detección con al menos un par de canales de interrogación (6) óptica para sensores de UV-VIS, que constan de elementos para confinar, colimar y/o propagar la luz dentro del sistema; c) un reactor de flujo microfluídico entre la zona de mezcla (3) y la zona de detección; y d) zona de almacenamiento de gotas, con sistemas individuales de atrapamiento de gotas.

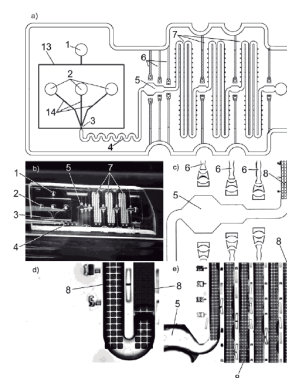


FIG. 1

ES 2 541 623 B1

**SISTEMA OPTOFLUÍDICO PARA REACCIONES BIOCATALÍTICAS CON CRISTALES DE
ENZIMAS ENTRECruzADOS**

DESCRIPCION

SECTOR Y OBJETO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a un sistema optofluídico (OFS) que comprende al menos un reactor de flujo microfluídico, sensores ópticos y medios para el almacenamiento de gotas de fluido. En particular, esta solicitud de patente describe un sistema optofluídico de bajo coste de fabricación, especialmente diseñado para su utilización en procesos de cristalización y entrecruzamiento de enzimas, así como en reacciones catalizadas por los
10 cristales enzimáticos entrecruzados.

ESTADO DE LA TÉCNICA

La biocatálisis, mediante el uso de enzimas aisladas, permite la formación selectiva y controlada de productos químicos y bioquímicos. En comparación con los métodos
15 tradicionales de síntesis química, la biocatálisis presenta unas ventajas excelentes en términos de selectividad química, de localización molecular y estereoselectividad, mientras que, en términos medioambientales tiene un impacto menos nocivo que la química convencional. El uso de enzimas está muy extendido en gran variedad de industrias, tales como la alimentaria (tanto para humanos como para animales), como en la farmacéutica, en
20 el tratamiento de materiales y de residuos, o incluso en la producción de biocombustibles. A un nivel similar de desarrollo tecnológico, las enzimas también se aplican actualmente como biosensores. Sin embargo, en el uso de enzimas en reacciones catalíticas también existen inconvenientes. Pueden presentar una conversión baja, ser inestables en las condiciones prácticas de operación, pueden tener una durabilidad corta en almacenaje, los tratamientos
25 secundarios requeridos pueden ser complicados, el escalado de los procesos enzimáticos es complejo con frecuencia y el abastecimiento de proteínas en cantidades industriales es también limitado habitualmente. A la vista de todo esto, el desarrollo de un biocatalizador estable, robusto, y preferentemente insoluble, se presenta como un gran reto para los biocatalizadores industriales. Todas estas características pueden ser logradas mediante la
30 inmovilización de las enzimas.

La inmovilización de las enzimas mejora los procesos biocatalíticos, debido a la capacidad de mantener, incluso de aumentar, la actividad enzimática; permite la recuperación de la enzima tras su utilización y aumenta su estabilidad (ante la temperatura, la naturaleza de los solventes utilizados, etc), entre otros beneficios. A pesar de ello, se estima que solo un 20% de los procesos biocatalíticos existentes hacen uso de enzimas inmovilizadas. Tradicionalmente existen tres métodos para la inmovilización de enzimas: unión a un soporte, encapsulación, y entrecruzamiento.

En los dos primeros métodos, la unión al encapsulante o al soporte puede ser de naturaleza física, iónica, o covalente. Sin embargo, la unión física generalmente es demasiado débil para mantener a la enzima fijada al soporte en condiciones de operación industriales, con elevadas concentraciones de reactivo y producto, así como en un medio con elevada fuerza iónica. En estos casos, la enzima se inmoviliza o se encapsula con la ayuda de polímeros (basados en siliconas, típicamente alquilsilano o polisiloxano, epóxidos, etc.) o una combinación de ambos métodos [Brady D, Jordaan J. *Advances in enzyme immobilisation*; Biotechnol Lett. (2009) 31(11):1639-50]. El uso de un soporte causa inevitablemente la dilución de la actividad en términos de volumen y especificidad, dado que dichos soportes pueden comprender desde el 90% a más del 99% del peso o volumen de catalizador, dando lugar a menores rendimientos y productividades.

Un segundo tipo de metodologías, basadas en la producción de enzimas con una gran concentración de actividad, esto es, concentración de enzima, y una alta estabilidad, consiste en entrecruzamiento de precipitados enzimáticos (agregados o cristalinos), de forma que no es necesario el uso de un soporte. El entrecruzamiento se lleva a cabo mediante procesos químicos, usando típicamente ligandos bidentados, tales como el glutaraldehído, aldehído-dextrano, hexametilendiisocianato, etc. para producir cristales de enzima entrecruzados (CLECs, del inglés "Cross-Linked Enzyme Crystals") o agregados de enzima entrecruzados (CLEAs, del inglés "Cross-Linked Enzyme Aggregates") [St. Clair NL, Navia MA. *Cross-linked enzyme crystals as robust biocatalysts*; Journal of the American Chemical Society. (1992) 114(18):7314-6.].

El entrecruzado químico de los cristales de proteína fue desarrollado por primera vez en los años sesenta, con el propósito de estabilizar cristales de proteína para facilitar su manipulación y la recogida de datos cristalográficos con rayos-X. Sin embargo, pronto se descubrió que las enzimas entrecruzadas en estado cristalino siguen siendo catalíticamente activas. Los CLECs se crean mediante una primera cristalización de la proteína, seguida por un entrecruzamiento químico, que bloquea el estado cristalino de las mismas,

independientemente de las condiciones de cristalización externas. Por ello los CLECs pueden proporcionar material proteico microporoso activo, insoluble y mecánicamente robusto bajo condiciones de entrecruzamiento determinadas. Tanto los CLECs como los CLEAs se han usado hasta la fecha en distintos procesos de producción enzimáticos, como

5 matrices de separación, como biosensores, y como vehículo para transporte de fármacos [Illanes, A., et al., *Recent trends in biocatalysis engineering. Bioresource Technology*; 115 (2012) 48–57].

En consecuencia, y bajo el punto de vista de los biocatalizadores, los CLECs y CLEAs presentan numerosas ventajas en comparación con las enzimas unidas a soporte o libres:

10 tienen de 10 a 1000 veces más actividad volumétrica (U/g), una estabilidad superior en condiciones no naturales (alta temperatura, solventes orgánicos, etc.) y, en casos particulares, una mayor selectividad. Aunque los CLEAs son la forma más económica y fácil de producir estos materiales tan activos, los agregados amorfos presentan dos principales desventajas en comparación con los CLECs: su distribución de tamaño de partícula no es

15 controlable, y no tienen resistencia mecánica.

Por otro lado, el proceso de cristalización es un factor limitante para la producción de CLECs [Brady, D., et al., *Spherezymes: A novel structured self-immobilisation enzyme technology*; BMC Biotechnology 2008, 8:8]. En este contexto, el principal objetivo de esta invención es proporcionar una plataforma única para dos procesos consecutivos: primero, la producción y

20 la inmovilización de cristales de proteína (enzimas), que pueden ser entrecruzados in situ; y segundo, el uso del mismo dispositivo en el que las enzimas han sido cristalizadas y entrecruzadas como un reactor catalítico para distintas aplicaciones biotecnológicas. En este contexto, la implementación de un sistema de detección óptica/fotónica en el reactor de microfluídica (optofluídica) permite la monitorización de la reacción via espectroscopía UV-

25 Vis.

Se señalan a continuación algunos documentos que reflejan el estado de la técnica:

- El documento de patente WO2004038363 se refiere a un método microfluidico en el que se pueden llevar a cabo reacciones en contacto con un sustrato. Dicho método consiste en introducir en un primer canal, formado por dicho sustrato, un fluido de transporte (carrier-fluid) y al menos dos fluidos con los que se lleva a cabo una reacción o una precipitación, y

30 que son inmiscibles con el fluido de transporte. Mediante una zona de mezcla, se generan volúmenes discretos de fluido ("plugs") separados por el mencionado "carrier-fluid". Con dicho método puede llevarse a cabo una gran variedad de reacciones tales como polimerización, cristalización (de pequeñas moléculas y proteínas), síntesis de

nanopartículas, reacciones catalizadas por enzimas, uniones de proteínas etc. Más concretamente se ha llevado a cabo la cristalización de proteínas (lisozima) dentro de “plugs” almacenados en pocillos, fabricados en el mismo sustrato.

Además, pueden llevarse a cabo reacciones de co-cristalización. Por otro lado, los canales de dicho dispositivo pueden estar hechos de PDMS (polidimetilsiloxano) y por último se pueden añadir aditivos que afecten a la cristalización, alterando la morfología de los cristales o la fase/polimorfo que cristaliza; entre estos aditivos se encuentran también los agentes de entrecruzamiento/reticulado que permiten la estabilización de los cristales.

- El documento US2006094119 trata sobre un sistema microfluidico que es capaz de llevar a cabo un gran número de reacciones en paralelo, entre las que se encuentran la cristalización y más concretamente, la cristalización de proteínas. Pueden emplearse agentes aditivos entre los que se encuentran agentes de entrecruzamiento. Por otro lado, los microcanales se encuentran formados por PDMS. Además, el curso de las reacciones puede ser monitorizado mediante espectroscopía UV-vis. En uno de los ejemplos se observa la cristalización de una proteína de membrana (FAAH: “Fatty Acid Amide Hydrolase”) cuyos cristales se generan en un chip utilizando el método de “microbatch”. Se construyó para ello un dispositivo híbrido de PDMS y capilares de teflón con tres entradas acuosas y una entrada de un fluido de transporte.

- El documento Bo Zheng, Cory J Gerdt y Rustem F. Ismagilov; *Using nanoliter plugs in microfluidics to facilitate and understand protein crystallization*; Current Opinion in Structural Biology, 2005, Vol. 15, págs. 548-555 describe la cristalización de proteínas en “plugs” de nanolitros generados en sistemas microfluídicos. Por “plugs” se entiende gotas confinadas en canales microfluídicos y rodeadas de un fluido de transporte inmiscible. La formación de “plugs” ocurre espontáneamente en canales microfluídicos, sin necesidad de válvulas; por ejemplo, cuando corrientes continuas acuosas de proteínas y precipitantes se combinan y se injertan en el flujo de un fluido de transporte. Cada “plug” que contiene proteína y precipitante es equivalente a un ensayo de cristalización. De esta manera, pueden darse rápidamente miles de ensayos de cristalización en “plugs” dentro de un canal microfluídico. Una vez que se para el flujo, los “plugs” se incuban y se monitoriza la formación de cristales.

- El documento Chun-Guang Yang, Zhang-Run Xu, Jian-Hua Wang *Manipulation of droplets in microfluidic systems*; Trends in Analytical Chemistry, 2010, Vol. 29, págs. 141-157 contiene un análisis del progreso que han sufrido los sistemas microfluídicos de formación de gotas y sus aplicaciones. Entre las aplicaciones descritas se encuentra la cristalización de proteínas.

- El documento Bo Zheng, Joshua D. Tice and Rustem F. Ismagilov; *Formation of droplets of alternating composition in microfluidic channels and applications to indexing of concentrations in droplet-based assays*; Anal Chem, 2004, Vol. 76, págs 4977-4982, se refiere a un método para detectar las condiciones óptimas de cristalización de una proteína, para ello se lleva a cabo un experimento de cristalización, en el que variando la relación de la concentración de la proteína y del precipitante en cada gota, se pueden estudiar dichas condiciones de precipitación. Cada gota tiene una mezcla de proteína y precipitante a diferentes concentraciones y representa una condición única de cristalización. Para identificar las condiciones de cristalización es necesario analizar la concentración de proteína y precipitante en cada gota.

- El documento Tao Xu, Prasanna Thwar et al. *Digital microfluidic biochip design for protein crystallization*; 2007 IEEE/NIH Life Science Systems and Applications Workshop, LISA 2008. págs. 140-141 trata sobre un diseño de "biochip" microfluidico digital para llevar a cabo la cristalización de proteínas.

Por último, la solicitud de patente P201331570 muestra un sistema de detección óptica unido a un sistema microfluídico de aplicación en estudios de cristalización de moléculas pequeñas que comprende una cámara de mezcla, una zona de detección y un reactor de flujo microfluidico ubicado entre la cámara de mezcla y la zona de detección. La principal característica del sistema es que está fabricado en una resina epoxi fotocurable negativa que permite el desarrollo de procesos con disolventes orgánicos, y que mediante los sistemas de detección óptica que incorpora, permite el seguimiento de los fenómenos de cristalización de forma automatizable.

EXPLICACION DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un sistema optofluídico que comprende un reactor de flujo microfluídico especialmente diseñado para realizar, en un mismo sistema, la cristalización de proteínas y su entrecruzamiento, y posteriormente llevar a cabo reacciones enzimáticas catalizadas por los cristales de enzimas entrecruzados. En dicho sistema, e integrado a lo largo del reactor, se han dispuesto compartimentos diseñados para llevar a cabo la detección en continuo de dicha reacción basado en espectroscopía UV-Vis, que potencialmente puede proporcionar un control por retroalimentación para optimizar la conversión de reactivos, en función de sus flujos de entrada. Esto permite aumentar el rendimiento del reactor. Este sistema de detección también facilita la determinación de parámetros cinéticos, pudiéndose obtener *in situ*, a través de medidas de absorptividad

molar, la cinética de la reacción. Los beneficios principales de reducir físicamente el tamaño del reactor hasta dimensiones microfluídicas, no son solo la reducción de tamaño y de consumo de reactivos, sino también una mejora del rendimiento analítico.

En un primer aspecto, la presente invención describe un sistema optofluídico para reacciones biocatalíticas con cristales de enzimas entrecruzados que comprende:

a) una cámara de mezcla que a su vez comprende:

i) al menos una entrada para la alimentación de una disolución reactante,

ii) al menos una entrada para la alimentación de un fluido de transporte, inmiscible con la disolución reactante,

iii) una zona de mezcla de la disolución reactante y el fluido de transporte, y

iv) canales de unión entre cada entrada de alimentación y la zona de mezcla,

b) al menos una zona de detección que comprende al menos un par de canales de interrogación óptica para sensores de UV-VIS, que constan de elementos para confinar, colimar y/o propagar la luz dentro del sistema.

c) un reactor de flujo microfluídico entre la zona de mezcla iii) y la zona de detección b) y

d) una zona de almacenamiento de gotas compuesta por sistemas individuales de atrapamiento de gotas.

En un modo de realización particular del sistema optofluídico de la invención, en la zona de mezcla se combinan el fluido de transporte y más de una disolución reactante.

En sucesivas formas de realización el sistema optofluídico presenta otras características:

- tras la zona de mezcla y previo a la zona de detección y reactor de flujo, se implementa un mezclador pasivo que permite una rápida homogeneización de la mezcla de reactivos.

- los elementos para confinar, colimar y/o propagar la luz, ubicados en la zona de detección, consisten en canales de alineación para inserción de fibras ópticas y al menos un par de microlentes.

- la primera zona de detección comprende un paso de camino óptico variable con un mínimo de 3 caminos ópticos distintos, colocados de forma consecutiva, incluyendo cada zona de camino óptico distinto un canal de interrogación óptica, que consta de elementos para confinar, colimar y/o propagar la luz dentro del sistema permitiendo la determinación de la absorptividad molar, y por tanto de la concentración, de un compuesto mediante el ajuste de las medidas obtenidas a una recta de calibración.

- la zona de almacenamiento de gotas comprende un canal principal en forma de serpentín con un sistema de atrapamiento, que comprende una red de micropocillos construidos sobre el canal principal, a una altura diferente.

En una configuración alternativa, el sistema optofluídico comprende varios reactores de flujo microfluidico separados entre ellos por diferentes zonas de detección, formando todo el conjunto parte de un mismo canal microfluídico.

En otro aspecto de la presente invención, se describe el uso del sistema optofluídico, en cualquiera de sus configuraciones, como biosensor y también en la síntesis de productos de alto valor añadido, particularmente productos de interés farmacéutico.

Un diseño genérico de este reactor optofluídico se presenta en la figura 1a y 1b. El uso de un fluido de transporte, si se desea, convierte la zona de mezcla en una fábrica de gotas, o "plug factory", de forma similar a la descrita en los documentos anteriormente citados.

Adicionalmente, en un diseño preferido, tras la zona de mezcla y previo a la zona de detección y reactor de flujo, se implementa un mezclador pasivo que permite una rápida homogeneización de la mezcla de reactivos. En una configuración aún más preferida, la zona de detección constará de una zona con distintos caminos ópticos colocados de forma consecutiva, con un par de microlentes y de canales de inserción de fibra óptica (canales de interrogación) en cada zona de camino óptico distinto (figura 1a), permitiendo la determinación de la absorptividad molar de una sustancia, mediante el ajuste de las medidas obtenidas a una recta de calibración. En una configuración aún más preferida, la zona de almacenamiento de gotas comprende un canal principal en forma de serpentín (figura 1a-7) compuesto por sistemas individuales de atrapamiento de gotas. Dichos sistemas consisten en una red de micropocillos construidos sobre el canal principal (figura 1c-8). La diferencia de densidad entre el fluido de transporte y la solución acuosa permite el paso del fluido de transporte sin modificar la situación de las gotas atrapadas en la red de micropocillos.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La estrategia para cristalizar proteínas consiste en encontrar las condiciones óptimas en las que la solución que contiene la proteína se puede llevar a un estado de sobresaturación, seguido de un proceso de equilibrado, el cual favorezca la menor cantidad posible de eventos de nucleación y un crecimiento cristalino óptimo. Para la producción de CLECs se requiere un ajuste fino de las condiciones precipitantes, mientras que los CLEAs se pueden generar fácilmente si dichas condiciones causan una precipitación masiva, siempre sin afectar la estabilidad de la proteína. Existen varios procedimientos y dispositivos para llevar a sobresaturación una disolución de proteína. Uno de los más exitosos a la hora de obtener

cristales es el método “batch”. La cristalización en “batch” consiste en la mezcla directa de una solución subsaturada de proteína con una solución precipitante. La sobresaturación se alcanza inmediatamente, como resultado del cambio de solubilidad de la proteína, causado por la solución precipitante. En consecuencia, si las condiciones de mezcla y precipitante son las adecuadas, se forma un sólido cristalino. Como las reacciones en “batch” son el método más extendido para la producción de CLECs y CLEAs, se contempla la implementación de un mezclador en el sistema optofluídico para permitir la realización de estas precipitaciones. Adicionalmente, la reducción de volumen hasta escala microfluídica previene la aparición de fuerzas de convección por gravedad durante el proceso de crecimiento cristalino generadas por el consumo del soluto cerca de la superficie cristalina, y a la sedimentación del cristal en la gota. La convección causa heterogeneidad en el medio, comprometiendo el crecimiento uniforme y la calidad del cristal. Este efecto en la calidad cristalina, intrínseco en las técnicas de cristalización, puede evitarse usando medios en los que el transporte de masa esté controlado por procesos difusivos, tales como en los sistemas microfluídicos. Existe también otro método diferente, generalmente llamado difusión interfacial libre, o difusión líquido-líquido, en la que se tienen en consideración las ventajas de un medio de transporte difusivo con el propósito de alcanzar la sobresaturación crítica para la nucleación de una forma muy lenta, en busca de un único evento de nucleación. Con este propósito, el sistema optofluídico está diseñado para operar en distintos modos:

- Se puede llenar con una solución metaestable, previamente mezclada, que contenga proteína y agentes precipitantes (una solución coloreada muestra este proceso en la figura 1d). Un segundo flujo de aire o un fluido inmiscible (aceites inertes) elimina la solución metaestable del canal principal, mientras que en el sistema de atrapamiento las gotas permanecen almacenadas a lo largo del serpentín (figura 1d) listas para nuclear.
- De forma análoga, se puede generar la mezcla de proteína y agente precipitante directamente en el sistema, con la ayuda del mezclador, con la posibilidad de generar gotas con la ayuda del fluido de transporte inmiscible, que quedarían almacenadas en el sistema de atrapamiento por la diferencia de densidad con el fluido de transporte.
- El dispositivo se puede llenar con una primera solución de proteína y, tras el atrapamiento de las gotas de esta solución (al introducir el flujo de aire o aceite inerte), se puede rellenar con una solución precipitante, que entraría en contacto con las gotas atrapadas, generando miles de experimentos “batch” independientes, en régimen de difusión interfacial libre;

Finalmente, para proteínas con una solubilidad con dependencia a la temperatura, se puede generar sobresaturación mediante un descenso controlado de la temperatura con la ayuda de un control termostático externo.

Una vez los cristales de proteína se han obtenido en los micropocillos del sistema de atrapamiento mediante alguno de los métodos descritos anteriormente, se puede introducir en el dispositivo una solución con agente entrecruzante. Una vez los cristales se encuentren entrecruzados, es posible introducir una corriente continua de solución reactante, y seguir la reacción enzimática (catalizada por los cristales de proteína) por espectroscopía UV-Vis. Para este propósito, pares de fibra óptica se distribuyen, preferentemente a diferentes y equidistantes longitudes del canal, permitiendo el seguimiento de la reacción catalítica en distintos puntos del reactor. La figura 2 muestra una representación 3D de un haz de luz, insertado mediante una fibra óptica, colimado por un par de micro-lentes, y pasando a través de una de las zonas de medida, para posteriormente ser recogido por otro par de micro-lentes análogas a las primeras, y una segunda fibra óptica, que estaría conectada a un micro-espectrómetro.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1: a) Esquema de un reactor optofluídico con un canal de 500 μm de anchura. Una disolución reactante es alimentada por una primera entrada (2), así como un fluido de transporte, inmiscible con la disolución reactante, es alimentado por una segunda entrada (1), configurando una fábrica de gotas o “plug factory” en una zona de mezcla (3) cuando, tal como se ha indicado anteriormente, se usa en la segunda entrada (1) un fluido de transporte inmiscible con la disolución reactante introducida en la primera entrada (2). Entre cada entrada (1, 2) y la zona de mezcla (3) existen correspondientes canales de unión (13, 14) para comunicar la zona de mezcla (3) con su respectiva entrada (1, 2). En caso de mezcla de varias disoluciones reactantes en la primera entrada (2), se dispone de un mezclador pasivo (4) en zigzag, para una rápida homogeneización de las soluciones reactantes. Adicionalmente se muestra una zona de camino óptico (5) variable para determinación de la absorptividad molar de una sustancia, mediante el ajuste de las medidas obtenidas a una recta de calibración. A distintas longitudes (equidistantes) del reactor, se distribuyen varios canales de interrogación (6) para fibras ópticas (9) (ver figura 2). El reactor comprende adicionalmente una zona de almacenamiento de gotas, en la que están ubicados sistemas individuales de atrapamiento de gotas que comprenden unos serpentines (7) de

almacenamiento de gotas. b) Fotografía de un microreactor optofluídico fabricado en PDMS, donde se aprecian las partes mencionadas en la descripción de la figura 1; c) Detalle de una zona de camino óptico variable (5), para la determinación del coeficiente de absorptividad molar (concentración), en un microreactor optofluídico de 500 μm de anchura donde se
 5 aprecia el sistema de atrapamiento de gotas, consistente en una red de micropocillos (8); d), e) detalles de la red de micropocillos (8). Una solución coloreada, utilizada para llenar el microreactor, está siendo expulsada del canal principal por un fluido de transporte (aceite fluorinerte FC-70 en este caso), mientras gotas de la misma solución permanecen almacenadas en el sistema de atrapamiento.

10 **Figura 2:** Representación 3D de un canal de interrogación (6) del sistema optofluídico, con un par de fibras ópticas (9) insertadas. (10) corresponde a una representación bidimensional del haz de luz colimado por el grupo de microlentes (11) del canal de interrogación (6).

Figura 3: a,b) Cristales (12) de lisozima crecidos en el sistema de atrapamiento de gotas (8) de un microreactor optofluídico de 500 μm de anchura, de una solución compuesta por 15
 15 mg/ml de lisozima y 5% de NaCl (0.1% de surfactante Triton X-100). La longitud de la barra de escala equivale a 100 μm ; c), d) cristales (12) de lisozima entrecruzados en el mismo microreactor, tras contacto con una solución de glutaraldehído al 5% durante 5 minutos. La longitud de la barra de escala equivale a 50 μm .

20 MODO DE REALIZACION DE LA INVENCION

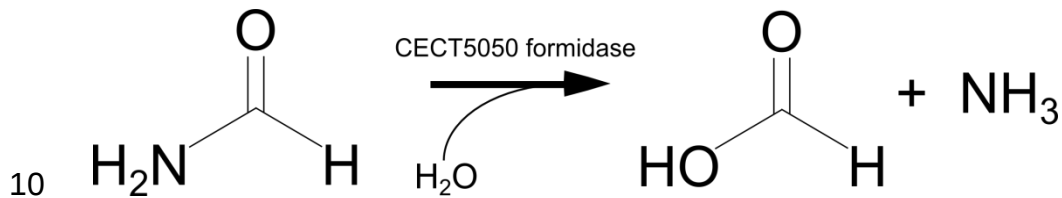
Ejemplo 1

La aplicación del microreactor diseñado es primeramente testeada con una proteína modelo, lisozima, con la intención de desarrollar y validar una metodología fiable para su posterior aplicación en otros productos de alto valor añadido. La lisozima cataliza la hidrólisis del
 25 metilumbelliferil N,N',N"-triacetil-b-chitotriosa (GlcNAc)₃-MeU. La liberación de 4-metilumbelliferona puede seguirse mediante medidas de fluorescencia. La hidrólisis catalítica de (GlcNAc)₃-MeU en presencia de cristales de lisozima puede ser monitorizada mediante medidas de intensidad emitida a 450 nm, utilizando como fuente de excitación un láser de 360 nm, a través de los canales de interrogación con fibras ópticas. Actualmente,
 30 los experimentos de cristalización en el sistema optofluídico, así como el consiguiente proceso de entrecruzamiento, han sido realizados exitosamente. En la figura 3 se muestran imágenes de los cristales de lisozima precipitados en el sistema de atrapamiento de gotas de un microreactor de 500 μm de anchura de canal (figura 3a-b), y su entrecruzamiento

(figura 3c-d), mostrando las típicas marcas/surcos y color oscurecido de los CLECs, y permaneciendo estables fuera de la solución, en agua ó en contacto con aire.

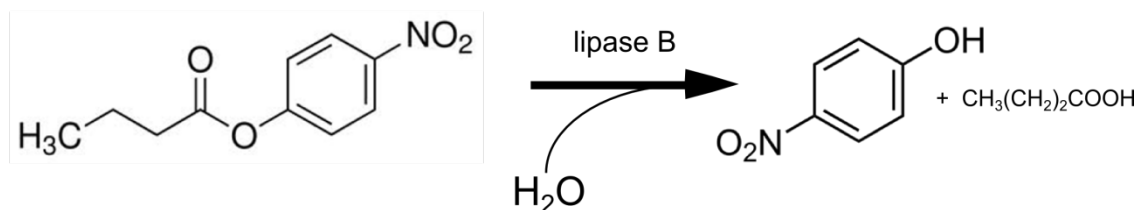
Ejemplo 2

- 5 Una segunda proteína, formidasa obtenida de *Bacillus cereus* CECT5050, puede ser cristalizada y entrecruzada en el microreactor optofluídico. Esta enzima cataliza la conversión de formamida en ácido fórmico, liberando amonio en el medio, que puede ser monitorizado espectrofotométricamente. La reacción esquemática del proceso catalítico es la siguiente:



Ejemplo 3

- 15 Finalmente, la actividad enzimática de la lipasa B (obtenida de *Candida Antarctica*), que tiene interés en la producción de biodiesel, sería cuantificable por la hidrólisis de p-nitrofenil butirato produciendo p-nitrofenol. La estructura química del p-nitrofenil butirato y el p-nitrofenol se muestran en la siguiente representación esquemática de la reacción catalítica:



Mientras el p-nitrofenil es incoloro, las cantidades de 4-nitrofenol producidas mediante catálisis pueden ser detectadas espectrofotométricamente a 415 nm.

REIVINDICACIONES

1.- Sistema optofluídico para reacciones biocatalíticas con cristales de enzimas entrecruzados que comprende:

5 a) una cámara de mezcla que a su vez comprende:

i) al menos una primera entrada (2) para la alimentación de una disolución reactante,

ii) al menos una segunda entrada (1) para la alimentación de un fluido de transporte, inmisible con la disolución reactante,

iii) una zona de mezcla (3) de la disolución reactante y el fluido de transporte, y

10 iv) canales de unión (13, 14) entre cada entrada (1, 2) de alimentación y la zona de mezcla,

b) al menos una zona de detección que comprende al menos un par de canales de interrogación (6) óptica para sensores de UV-VIS, que constan de elementos para confinar, colimar y/o propagar la luz dentro del sistema.

15 c) un reactor de flujo microfluídico entre la zona de mezcla (3) y la zona de detección; caracterizado por incluir una zona de almacenamiento de gotas en la que se encuentran ubicados sistemas individuales de atrapamiento de gotas.

2.- Sistema optofluídico según la reivindicación 1, caracterizado por que en la zona de mezcla (3) se combinan el fluido de transporte y más de una disolución reactante.

3.- Sistema optofluídico según las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que tras la zona de mezcla (3) y previo a la zona de detección y reactor de flujo, se implementa un mezclador pasivo (4) que permite una rápida homogeneización de la mezcla de reactivos.

25 **4.-** Sistema optofluídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que los elementos para confinar, colimar y/o propagar la luz, ubicados en la zona de detección, consisten en: canales de alineación para inserción de fibras ópticas (9), y al menos un par de microlentes (11).

30 **5.-** Sistema optofluídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que la zona de detección comprende una zona de camino óptico (5) variable con un mínimo de 3 caminos ópticos distintos, colocados de forma consecutiva.

- 5 **6.-** Sistema optofluídico según la reivindicación 5, caracterizado por que cada zona de camino óptico (5) distinto incluye un canal de interrogación (6) óptica, que consta de elementos para confinar, colimar y/o propagar la luz dentro del sistema permitiendo la determinación de la absorptividad molar de un compuesto mediante el ajuste de las medidas obtenidas a una recta de calibración.
- 10 **7.-** Sistema optofluídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que la zona de almacenamiento de gotas comprende un canal principal en forma de serpentín (7), así como los sistemas individuales de atrapamiento de gotas comprenden una red de micropocillos (8) construidos sobre el serpentín (7), a una altura diferente.
- 15 **8.-** Sistema optofluídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que comprende varios reactores de flujo microfluidico separados entre ellos por diferentes zonas de detección, formando todo el conjunto parte de un mismo canal microfluidico.
- 20 **9.-** Uso del sistema optofluídico tal como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 como biosensor.
- 20 **10.-** Uso del sistema optofluídico tal como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en síntesis de productos de interés farmacéutico.

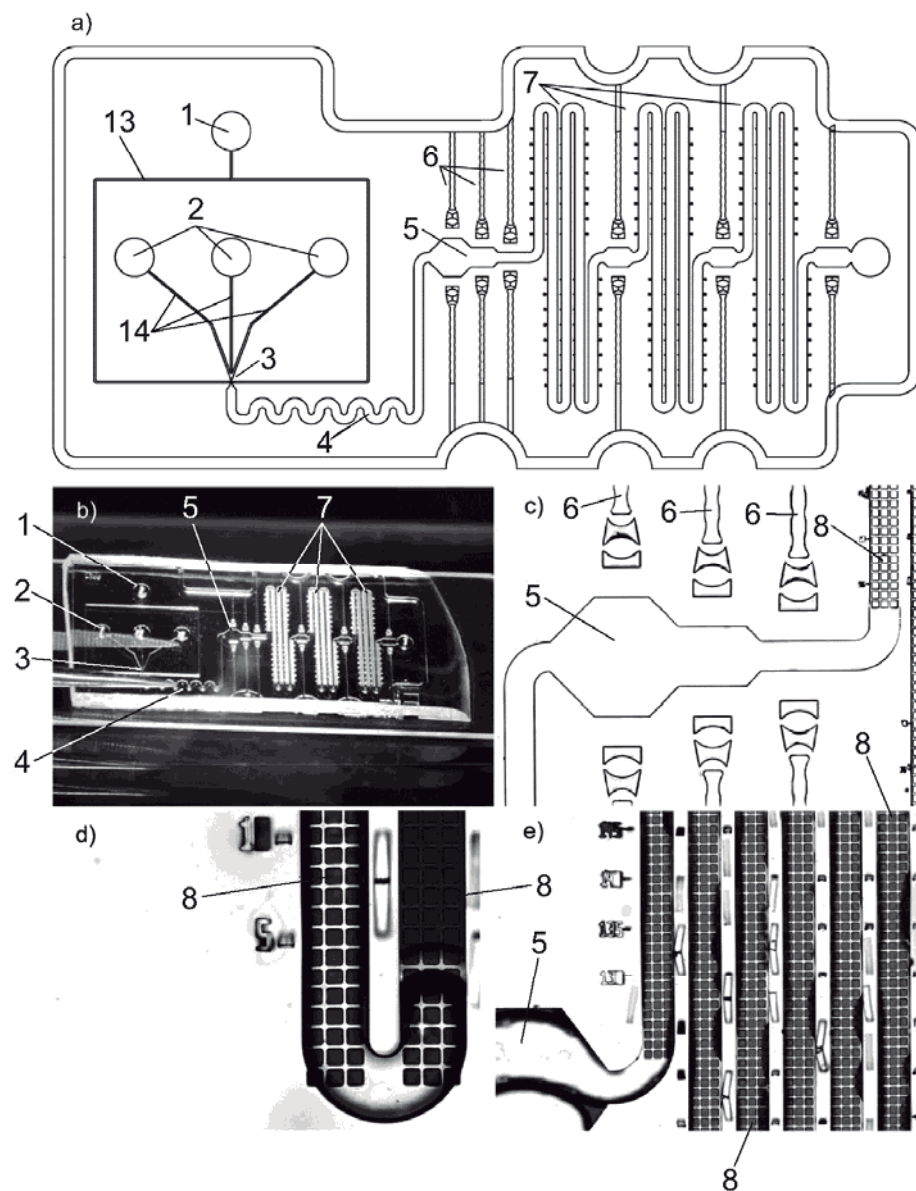


FIG. 1

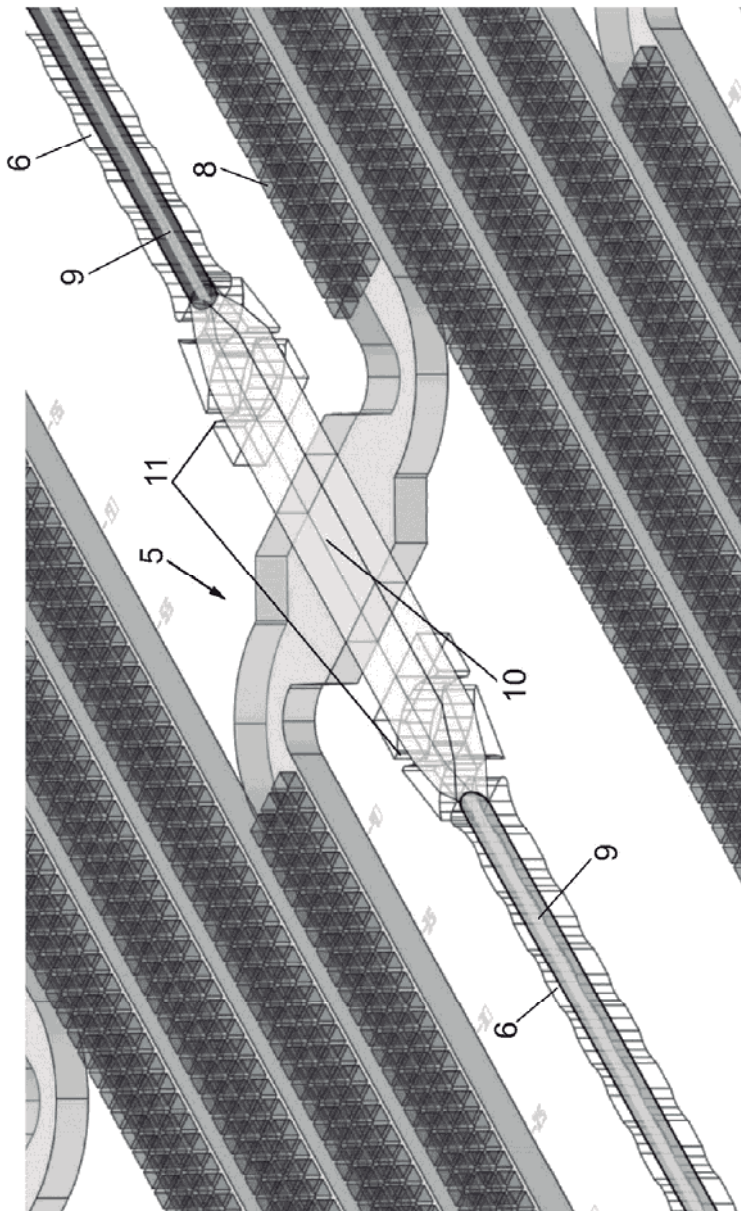


FIG. 2

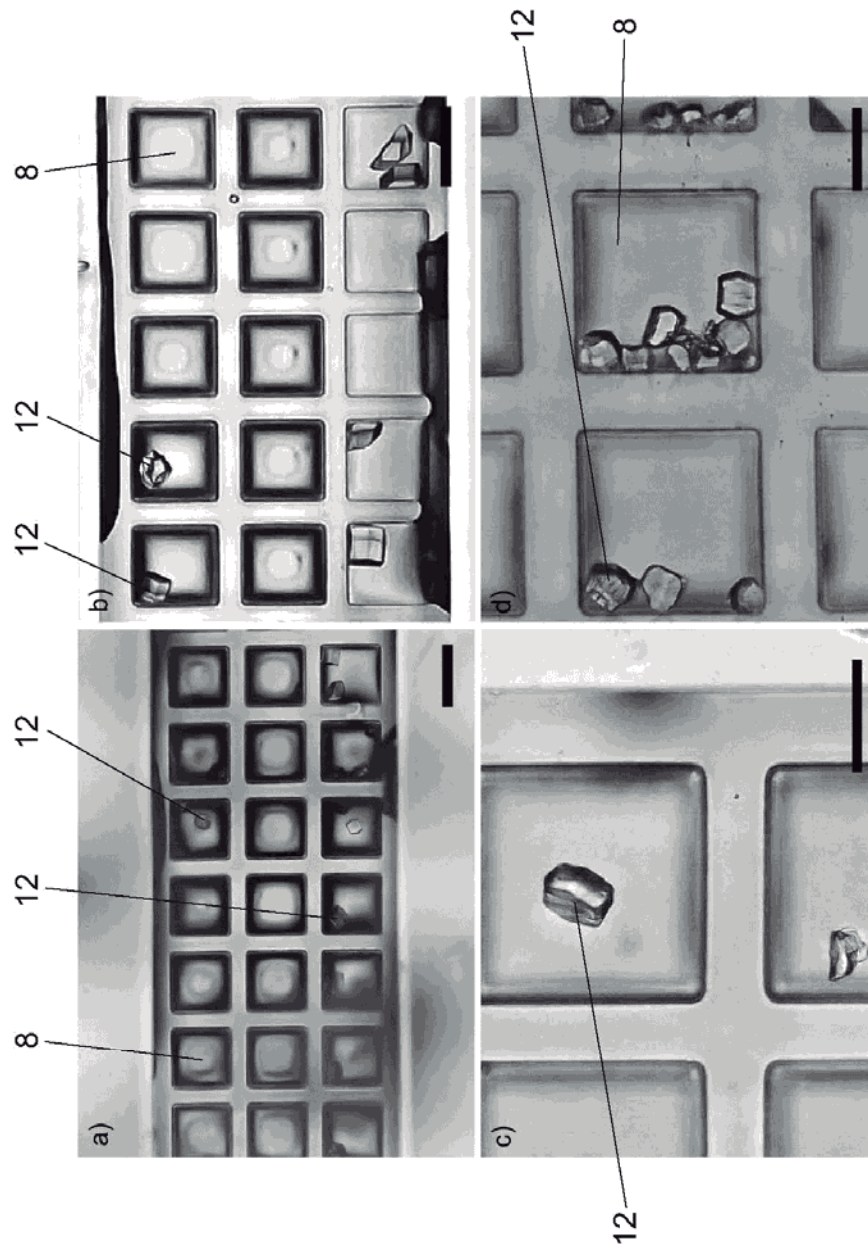


FIG. 3



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- (21) N.º solicitud: 201430058
(22) Fecha de presentación de la solicitud: 22.01.2014
(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) Int. Cl.: **G01N21/01** (2006.01)
C12M1/34 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	RODRÍGUEZ-RUIZ, I et al. Analysis of the Structural Integrity of SU-8-Based Optofluidic Systems for Small-Molecule Crystallization Studies. Analytical Chemistry. 2013, vol. 85, páginas 9678-9685 y material suplementario, especialmente resumen; página 9680; figura s1.	1-10
A	ARAYANARAKOOL, R et al. Single-enzyme analysis in a droplet-based micro- and nanofluidic system. Lab Chip. 2013, vol. 13, páginas 1955-1962, especialmente resumen, páginas 1955-1957.	1-10
A	US 2006094119 A1 (ISMAGILOV RUSTEM F et al.) 04.05.2006, todo el documento	1-10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
28.04.2015

Examinador
J. Collado Martínez

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N, C12M

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXPUS, NPL, IEEE, BIOSIS, MEDLINE, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.04.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-10	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-10	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	RODRÍGUEZ-RUIZ, I et al. Analytical Chemistry. 2013, vol. 85, páginas 9678-9685 y material suplementario	2013
D02	ARAYANARAKOOL, R et al. Lab Chip. 2013, vol. 13, páginas 1955-1962	2013
D03	US 2006094119 A1 (ISMAGILOV RUSTEM F et al.)	2006

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud tiene por objeto un sistema optofluídico que comprende un reactor microfluídico funcionalizado enzimáticamente con cristales entrecruzados de enzima en zonas de almacenamiento individual de gotas y que incorpora además zonas de interrogación para detección óptica.

El documento D01 divulga un sistema optofluídico para la cristalización de moléculas pequeñas que incluye canales de interrogación con detectores ópticos (ver resumen; página 9680; figura s1).

El documento D02 se refiere a un sistema microfluídico para reacciones enzimáticas en el que la enzima se encuentra encapsulada y la detección se lleva a cabo midiendo la fluorescencia del producto de la reacción (ver resumen, páginas 1955-1957).

El documento D03 tiene por objeto un reactor microfluídico aplicable a la cristalización de enzimas y a reacciones biocatalíticas (ver todo el documento).

NOVEDAD (art. 6.1 de la LP 11/1986)

Reivindicaciones 1-10

En relación con el objeto de la reivindicación independiente 1, D01 nos muestra un sistema optofluídico para cristalización de moléculas pequeñas consistente en un reactor que presenta un único punto para la entrada de solvente, y en su caso del fluido de transporte para generación de microgotas, así como una zona de detección con tres pares de canales contiguos de interrogación óptica dotados de elementos para confinar y propagar la luz dentro del sistema. El sistema optofluídico de D01 no incluye una zona de almacenamiento de gotas en el reactor. Por su parte, D02 tiene por objeto un reactor microfluídico para reacciones biocatalíticas con microgotas de enzima en el que se distingue una primera entrada para la alimentación de una disolución reactante, una segunda entrada para la alimentación de un fluido de transporte, una zona de mezcla y canales de unión entre cada entrada de alimentación y la zona de mezcla. El sistema de D02 no incluye tampoco una zona de atrapamiento de gotas en el reactor. Por otra parte, en D02 se emplea la detección de la fluorescencia emitida por las microgotas para medir la evolución de la actividad cinética de la enzima en el tiempo, pero el sistema no dispone de sensores de UV-visible. En cuanto a D03, este documento divulga un sistema microfluídico que posee microcanales en distintas configuraciones por los que circulan la disolución reactante y el fluido de transporte. D03 menciona además la posibilidad de incorporar un dispositivo de detección mediante espectroscopía UV-visible, si bien no indica de forma expresa que dicho sistema comprenda al menos un par de canales de interrogación óptica. Por último, D03 no hace referencia tampoco a la existencia de una zona de almacenamiento de gotas en el reactor.

De lo anterior se desprende que ninguno de los documentos del estado de la técnica considerados, D01, D02, D03, divulga de forma idéntica o implícita un sistema optofluídico con todas las características definidas en la reivindicación independiente 1. Por lo tanto, dicha reivindicación 1 y sus reivindicaciones dependientes 2-8, así como las reivindicaciones independientes 9-10, de uso del sistema optofluídico de la invención, cumplen con el requisito de novedad establecido en el art. 6.1 de la LP 11/1986.

ACTIVIDAD INVENTIVA (art. 8.1 de la LP 11/1986)

Reivindicaciones 1-10

Como ya se ha indicado, ninguno de los sistemas microfluídicos del estado de la técnica considerado posee todas las características del sistema optofluídico objeto de la reivindicación independiente 1. La existencia en el chip de la invención de un reactor de flujo microfluídico con una zona de almacenamiento para el atrapamiento individual de gotas aporta la ventaja técnica de poder realizar en un mismo sistema la cristalización y entrecruzamiento de las enzimas y posteriormente las reacciones enzimáticas catalizadas por los cristales entrecruzados de enzima. Por otra parte, la existencia de canales de interrogación óptica en compartimentos para la detección continua por espectroscopía UV-visible del avance de la reacción permite optimizar el rendimiento del reactor regulando los flujos de entrada. Tomando en cuenta estos elementos, se considera que para un experto en la materia enfrentado al problema de desarrollar un solo sistema microfluídico en el que poder llevar a cabo la obtención de cristales entrecruzados de enzima y posteriormente la reacción biocatalítica con un flujo continuo y optimizando el rendimiento, no resultaría obvio llegar al sistema optofluídico de la reivindicación 1 a partir de las enseñanzas de los documentos D01, D02 y D03, tomados estos por separado o de forma combinada.

En base a lo anterior, el sistema optofluídico de la reivindicación independiente 1 y, por lo tanto, el de las reivindicaciones dependientes 2-8 y el uso de dicho sistema, objeto de las reivindicaciones independientes de uso 9-10, satisfacen el requisito de actividad inventiva del art. 8.1 de la LP 11/1986.