



(11) **EP 2 198 964 A1**

(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:
23.06.2010 Patentblatt 2010/25

(51) Int Cl.:
B01L 3/00 (2006.01) F26B 5/06 (2006.01)

(21) Anmeldenummer: **08019462.4**

(22) Anmeldetag: **06.11.2008**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR
HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT
RO SE SI SK TR**
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL BA MK RS

(71) Anmelder:
• **F. Hoffmann-La Roche AG**
4070 Basel (CH)
• **Roche Diagnostics GmbH**
68305 Mannheim (DE)

(72) Erfinder:
• **Winckler-Desprez, Valerie, Dr.**
68526 Ladenburg (DE)
• **Augstein, Manfred**
68305 Mannheim (DE)
• **Roedl, Romi**
67112 Mutterstadt (DE)
• **Wuerl, Susanne**
68167 Mannheim (DE)

(74) Vertreter: **Bittner, Thomas L.**
Forrester & Boehmert
Pettenkoferstrasse 20-22
80336 München (DE)

(54) **Verfahren zum Bereitstellen eines getrockneten Reagenz in einem mikrofluidischen System und mikrofluidisches System**

(57) Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Bereitstellen eines getrockneten Reagenz in einem mikrofluidischen System, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst: Bereitstellen eines mikrofluidischen Systems, welches eine mikrofluidische Struktur

aufweist, Einbringen eines ein Reagenz enthaltenen, fließfähigen Trägermediums in der mikrofluidischen Struktur und Trocknen des Reagenz in der mikrofluidischen Struktur mittels Lyophilisieren.

EP 2 198 964 A1

Beschreibung

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Bereitstellen eines getrockneten Reagenz in einem mikrofluidischen System sowie ein mikrofluidisches System.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Mikrofluidische Systeme weisen wenigstens abschnittsweise eine mikrofluidische Struktur auf, in der ein oder mehrere Mikrokammern und / oder Mikrokanäle gebildet sind. Beispielsweise werden solche mikrofluidischen Systeme als mikrofluidische Testelemente oder Test-Systeme zur Verfügung gestellt, mit denen ein oder mehrere Analyte analysiert werden können, zum Beispiel in einer Probe einer Körperflüssigkeit. Für diesen Anwendungszweck werden dann in der mikrofluidischen Struktur ein oder mehrere Reagenzien bereitgestellt, insbesondere für eine Nachweisreaktion mit dem zu analysierenden Analyten. Das eine oder die mehreren Reagenzien sind in den Mikrokanälen und / oder den Mikrokammern der mikrofluidischen Struktur angeordnet, so dass sie beim Auftragen der zu untersuchenden Probe auf das mikrofluidische Testelement mit der Probenflüssigkeit in Kontakt kommen, worauf üblicherweise eine Nachweisreaktion stattfindet.

[0003] In dem Dokument WO 93/04195 wurde vorgeschlagen, Kugeln mit einem Reagenz für eine Analyse einer biologischen Probe herzustellen, indem eine wässrige Lösung des Reagenz hergestellt, Tropfen der wässrigen Lösung zum Gefrieren in eine Kälteflüssigkeit gegeben und die gefrorenen Tropfen lyophilisiert werden.

[0004] Beim Lyophilisieren handelt es sich um eine Gefriertrocknung, die zu einem Flüssigkeitsentzug aus dem tiefgefrorenen Material im Vakuum führt. Bei diesem Ausfrieren des Lösungsmittels, bei dem es sich meistens um Wasser handelt, verdampft das Lösungsmittel im gefrorenen Zustand (Sublimationstrocknung). Auf diese Weise ist eine schonende Trocknung und Konservierung eines oder mehrerer Reagenzien möglich. Das Endprodukt einer Lyophilisierung ist eine gefrorene Masse (Lyophilisat), die auch als ein poröser, stabiler und trockener "Lyo-Kuchen" bezeichnet werden kann.

[0005] In dem Dokument US 2007/0259348 A1 wurde vorgeschlagen, lyophilisierte Pellets herzustellen, die für eine Nutzung in einem mikrofluidischen System geeignet sind. Die lyophilisierten Pellets können verschiedene biologische Reagenzien oder Mikropartikel enthalten. Die Pellets werden hergestellt, indem Tropfen einer Reagenzlösung auf eine gekühlte Platte gegeben und dort gefroren werden, woraufhin eine Vakuumbehandlung erfolgt.

Zusammenfassung der Erfindung

[0006] Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zum Bereitstellen eines getrockneten Reagenz in einem mikrofluidischen System sowie ein mikrofluidisches System bereitzustellen, bei denen auf flexible und an eine jeweilige Anwendung anpassbare Art und Weise wenigstens ein getrocknetes Reagenz in das mikrofluidische System zum Verbleib hierin eingebracht werden kann.

[0007] Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren nach dem unabhängigen Anspruch 1 sowie ein mikrofluidisches System nach dem unabhängigen Anspruch 9 gelöst.

[0008] Ein Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zum Bereitstellen eines getrockneten Reagenz in einem mikrofluidischen System, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst: Bereitstellen eines mikrofluidischen Systems, welches eine mikrofluidische Struktur aufweist, Einbringen eines ein Reagenz enthaltenden, fließfähigen Trägermediums in der mikrofluidischen Struktur und Trocknen des Reagenz in der mikrofluidischen Struktur mittels Lyophilisieren.

[0009] Weiterhin wird ein mikrofluidisches System bereitgestellt, bei dem in einer mikrofluidischen Struktur ein mittels Lyophilisierung getrocknetes Reagenz angeordnet ist.

[0010] Mit der Erfindung wird die Möglichkeit geschaffen, zunächst das in der mikrofluidischen Struktur einzulagernde Reagenz in gelöster oder suspendierter Form in die mikrofluidische Struktur einzubringen, um anschließend eine Trocknung mittels Lyophilisierung durchzuführen. Im Gegensatz zu den im Stand der Technik vorgesehenen Pellets lässt sich das Reagenz mittels des fließfähigen Trägermediums, beispielsweise in Form einer Lösung oder einer Suspension, einfacher in die Abschnitte der mikrofluidischen Struktur einbringen. Es ist nicht notwendig, die Abschnitte der mikrofluidischen Struktur in geometrischer Hinsicht für das Einbringen von Pellets oder Partikeln zu optimieren. Vielmehr fließt das Trägermedium, bei dem es sich zum Beispiel um Wasser handeln kann, mit dem Reagenz in die Abschnitte der mikrofluidischen Struktur in dem mikrofluidischen System. Darüber hinaus wird eine möglichst homogene Verteilung des Reagenz in der mikrofluidischen Struktur oder in Abschnitten hiervon erleichtert, soweit eine solche homogene Erteilung im konkreten Anwendungsfall gewünscht ist. Die mikrofluidische Struktur kann hierbei abschnittsweise in dem mikrofluidischen System oder dieses im Wesentlichen ganz erfassend gebildet sein.

[0011] Unabhängig von der konkreten Verteilung des getrockneten Reagenz in der mikrofluidischen Struktur besteht der Vorteil darin, dass sich das getrocknete Reagenz schnell und vollständig löst in einer Flüssigkeit. Zum Beispiel in einer wässrigen Lösung, die bei der Nutzung des mikrofluidischen Systems in die mikrofluidische Struktur eingebracht wird. Dies ist zum Beispiel bei kinetischen Messungen von besonderem Vorteil.

[0012] Mit Hilfe des Verfahrens können ein oder mehrere Reagenzien in die mikrofluidische Struktur eingelagert werden. Die Einlagerung mehrerer Reagenzien kann beispielsweise auch mittels mehrfacher Anwendung der Schritte zum Einbringen des Trägermediums

und anschließender Lyophilisierung erfolgen. Eine solche Mehrfachanwendung kann aber auch im Zusammenhang mit dem Einbringen nur eines Reagenz in der mikrofluidischen Struktur vorgesehen sein.

[0013] Eine bevorzugte Weiterbildung der Erfindung sieht vor, dass vor dem Einbringen des fließfähigen Trägermediums die mikrofluidische Struktur thermisch behandelt wird. Auf diese Weise kann die Einlagerung des oder der Reagenzien in der mikrofluidischen Struktur gezielt beeinflusst werden.

[0014] Bei einer zweckmäßigen Ausgestaltung der Erfindung kann vorgesehen sein, dass beim Einbringen des fließfähigen Trägermediums die mikrofluidische Struktur thermisch behandelt wird.

[0015] Eine vorteilhafte Ausführungsform der Erfindung sieht vor, dass die mikrofluidische Struktur bei der thermischen Behandlung gekühlt wird. Das Kühlen der mikrofluidischen Struktur ist eine Form der thermischen Behandlung, bei der zum Beispiel die mikrofluidische Struktur oder Teile hiervon oder das gesamte mikrofluidische System gekühlt werden. Die Kühlung kann soweit erfolgen, dass das fließfähige Trägermedium nach dem Auftragen beim Kontakt mit der Oberfläche der mikrofluidischen Struktur gleich oder in zeitlicher Nähe hierzu gefriert. Auf diese Weise ist eine gezielte Beeinflussung der Verteilung des fließfähigen Trägermediums innerhalb der mikrofluidischen Struktur ermöglicht. Eine Kühlung ist zum Beispiel dann von Vorteil, wenn das fließfähige Trägermedium ein Tensid enthält, dessen Verteilung in der mikrofluidischen Struktur so gezielt beeinflussbar ist.

[0016] Bevorzugt sieht eine Fortbildung der Erfindung vor, dass die mikrofluidische Struktur bei der thermischen Behandlung beheizt wird. Das Beheizen ist eine weitere Form der thermischen Behandlung des mikrofluidischen Systems oder von Teilen hiervon, insbesondere der mikro-, fluidischen Struktur. Diese Art der thermischen Behandlung kann ebenfalls dazu genutzt werden, die räumliche Verteilung der Reagenzsuspension oder -lösung innerhalb der mikrofluidischen Struktur zu kontrollieren und zu regeln. Beispielsweise ist ein Beheizen von Vorteil, wenn das fließfähige Trägermedium Tenside enthält, deren Verteilung in mikrofluidischen Strukturen sonst schwierig zu steuern ist.

[0017] Eine zweckmäßige Ausführung der Erfindung kann vorsehen, dass das Reagenz in der mikrofluidischen Struktur mit einer im Wesentlichen homogenen Verteilung eingelagert wird.

[0018] In einer Ausgestaltung der Erfindung ist vorgesehen, dass das fließfähige Trägermedium ein oder mehrere Tenside und / oder einen oder mehrere Füllstoffe enthält. Diese bilden nach dem Trocknen eine Art chemisches Gitter für das oder die Reagenzien in der mikrofluidischen Struktur, wodurch zum Beispiel eine homogene und schnelle Auflösung der Reagenzien unterstützt wird.

[0019] Bei einer vorteilhafte Ausgestaltung der Erfindung kann vorgesehen sein, dass ein mikrofluidisches System, ausgewählt aus der folgenden Gruppe von Sy-

stemen, bereitgestellt wird: mikrofluidisches Testelement und mikrofluidischer Chip. Bevorzugt werden in einer Ausführung Testelemente eingesetzt, wie sie als solche in dem Dokument EP 1 916 524 A1 beschrieben sind. Es sind dort Analysensysteme offenbart, die mit Trockenreagenzien beladen sind und im Wesentlichen scheibenförmig sind.

Beschreibung bevorzugter Ausführungsbeispiele der Erfindung

[0020] Die Erfindung wird im Folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

[0021] Um ein mikrofluidischen System, welches wenigstens abschnittsweise mit einer mikrofluidischen Struktur in Form von Mikrokanälen und / oder Mikroräumen versehen ist, bereitzustellen, wird zunächst eine Reagenzlösung oder -suspension hergestellt, in welcher ein oder mehrere Reagenzien in gelöster oder suspendierter Form vorliegen. Sodann wird das mikrofluidische System bereitgestellt, beispielsweise in Form eines mikrofluidischen Testelementes oder eines mikrofluidischen Chips. Anschließend wird die Reagenzlösung oder -suspension aufgetragen, zum Beispiel werden etwa 10 Mikroliter aufgegeben. Dieses erfolgt wiederum bei Atmosphärendruck. Die aufgetragene Flüssigkeit dringt wenigstens teilweise in die mikrofluidische Struktur des mikrofluidischen Systems ein. Hierbei kann das mikrofluidische System vorgekühlt werden, zum Beispiel mittels Auflegen auf eine gekühlte Ablagefläche, die ihrerseits beispielsweise bei etwa -50°C vorgekühlt wurde.

[0022] Es schließt sich ein Einfrieren bei etwa -70°C und Atmosphärendruck an, zum Beispiel für eine Dauer von drei bis vier Stunden. Bei einer anschließenden Trocknung im Vakuum über mehrere Stunden, beispielsweise etwa 14 Stunden, wird die Umgebungstemperatur erhöht, vorzugsweise in Schritte von etwa 0,1°C / Minute, bis eine Temperatur von etwa 25°C erreicht wird, die dann konstant gehalten wird. Dieser Verfahrensschritt wird bei einem Umgebungsdruck von etwa 0,4mbar ausgeführt. Das beschriebene Verfahren kann beispielsweise mit einem Cholesterol-Reagenz durchgeführt werden, welches eine oberflächenaktive Substanz enthält.

[0023] Mit Hilfe des beschriebenen Verfahrens ist es möglich, ein oder mehrere Reagenzien in getrockneter Form innerhalb der mikrofluidischen Struktur des mikrofluidischen Systems mit einer gewünschten Verteilung bereitzustellen, zum Beispiel einer im Wesentlichen homogenen Verteilung. Das Aufgeben der Reagenzlösung oder -suspension ermöglicht ein leichtes Eindringen des oder der Reagenzien in die Mikrostruktur. Anschließend wird dann die Trocknung mittels Lyophilisierung durchgeführt.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Bereitstellen eines getrockneten

Reagenz in einem mikrofluidischen System, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- Bereitstellen eines mikrofluidischen Systems, welches eine mikrofluidische Struktur aufweist, 5
 - Einbringen eines ein Reagenz enthaltenen, fließfähigen Trägermediums in der mikrofluidischen Struktur und
 - Trocknen des Reagenz in der mikrofluidischen Struktur mittels Lyophilisieren. 10
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** vor dem Einbringen des fließfähigen Trägermediums die mikrofluidische Struktur thermisch behandelt wird. 15
 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** beim Einbringen des fließfähigen Trägermediums die mikrofluidische Struktur thermisch behandelt wird. 20
 4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** die mikrofluidische Struktur bei der thermischen Behandlung gekühlt wird. 25
 5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 2 bis 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** die mikrofluidischen Struktur bei der thermischen Behandlung beheizt wird. 30
 6. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Reagenz in der mikrofluidischen Struktur mit einer im Wesentlichen homogenen Verteilung eingelagert wird. 35
 7. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** das fließfähige Trägermedium ein oder mehrere Tenside und / oder einen oder mehrere Füllstoffe enthält. 40
 8. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** ein mikrofluidisches System ausgewählt aus der folgenden Gruppe von Systemen bereitgestellt wird: mikrofluidisches Testelement und mikrofluidischer Chip. 45
 9. Mikrofluidisches System, bereitgestellt gemäß eines Verfahrens nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, bei dem in einer mikrofluidischen Struktur ein mittels Lyophilisierung getrocknetes Reagenz angeordnet ist. 50

55



EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 08 01 9462

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (IPC)
X	WO 03/035909 A (NTU VENTURES PTE LTD [SG]; DEFENCE SCIENCE & TECH ORG [SG]; YAP PENG H) 1. Mai 2003 (2003-05-01) * Absatz [0194]; Abbildung 1 *	1-9	INV. B01L3/00 F26B5/06
A	US 2007/280857 A1 (SONG MAENGSEOK [US] ET AL) 6. Dezember 2007 (2007-12-06) * das ganze Dokument *	1-9	
A	US 2004/209353 A1 (CHIEN DAVID [US] ET AL) 21. Oktober 2004 (2004-10-21) * das ganze Dokument *	1-9	
A	US 2007/054270 A1 (INGANAS MATS [SE] ET AL) 8. März 2007 (2007-03-08) * das ganze Dokument *	1-9	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (IPC)
			B01L F26B
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort München		Abschlußdatum der Recherche 20. März 2009	Prüfer Skowronski, Maik
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

 2
EPO FORM 1503 03-82 (P04C03)

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
 ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 08 01 9462

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

20-03-2009

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 03035909 A	01-05-2003	AU 2002339833 A1	06-05-2003
		EP 1461454 A2	29-09-2004
		US 2003138819 A1	24-07-2003
US 2007280857 A1	06-12-2007	EP 2035542 A2	18-03-2009
		WO 2007143540 A2	13-12-2007
US 2004209353 A1	21-10-2004	KEINE	
US 2007054270 A1	08-03-2007	KEINE	

EPO FORM P0461

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

IN DER BESCHREIBUNG AUFGEFÜHRTE DOKUMENTE

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde ausschließlich zur Information des Lesers aufgenommen und ist nicht Bestandteil des europäischen Patentdokumentes. Sie wurde mit größter Sorgfalt zusammengestellt; das EPA übernimmt jedoch keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

In der Beschreibung aufgeführte Patentdokumente

- WO 9304195 A [0003]
- US 20070259348 A1 [0005]
- EP 1916524 A1 [0019]