(19) Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11) **EP 2 198 964 B1**

(12) **EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT**

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des Hinweises auf die Patenterteilung:
02.01.2013 Patentblatt 2013/01

(51) Int Cl.:
F26B 5/06 *(2006.01)*

(21) Anmeldenummer: **08019462.4**

(22) Anmeldetag: **06.11.2008**

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

Method of providing a dry reagent in a micro-fluid system

Procédé destiné à la préparation d'un réactif séché dans un système microfluidique

(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

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
23.06.2010 Patentblatt 2010/25

(73) Patentinhaber:
- **F. Hoffmann-La Roche AG**
  4070 Basel (CH)
- **Roche Diagnostics GmbH**
  68305 Mannheim (DE)

Benannte Vertragsstaaten:
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.**
Boehmert & Boehmert
Pettenkoferstrasse 20-22
80336 München (DE)

(56) Entgegenhaltungen:
WO-A-03/035909
US-A1- 2004 209 353
US-A1- 2007 054 270
US-A1- 2007 280 857

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents im Europäischen Patentblatt kann jedermann nach Maßgabe der Ausführungsordnung beim Europäischen Patentamt gegen dieses Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist. (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

EP 2 198 964 B1

Beschreibung

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Bereitstellen eines getrockneten Reagenz in einem mikrofluidischen 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 Testsysteme 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 trockner "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.

[0006] Das Dokument WO 03/035909 A2 betrifft diagnostische Verfahren in einer Vorrichtung, bei der in einem Substrat mehrere so genannte Assaystationen gebildet sind. In die Assaystationen werden Reagenzien eingebracht, die anschließend an einer Reaktion teilnehmen. In einer Ausführungsform ist vorgesehen, DNA / RNA-Probenmaterial in wenigstens eine Assaystation einzubringen und dort zu lyophilisieren. Anschließend nehmen die Reagenzien an einer PCR- oder einer RT-PCR-Reaktion teil.

Zusammenfassung der Erfindung

[0007] Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zum Bereitstellen eines getrockneten Reagenz in einem mikrofluidischen System sowie ein mikrofluidisches System bereitzustellen, bei dem 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.

[0008] Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren nach dem unabhängigen Anspruch 1 gelöst.

[0009] 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. Vor dem Einbringen des fließfähigen Trägermediums wird die mikrofluidische Struktur thermisch behandelt. Auf diese Weise wird die Einlagerung des oder der Reagenzien in der mikrofluidischen Struktur gezielt beeinflusst.

[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 durchzuftren. 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 Verteilung im konkreten Anwendungsfall gewünscht ist. Die mikrofluidische Struktur kann hierbei abschnittsweise in dem mikrofluidischen System oder dieses im Wesentlichen ganz erfassend gebildet sein. 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.

[0011] 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.

[0012] Bei einer zweckmäßigen Ausgestaltung der Erfindung kann vorgesehen sein, dass beim Einbringen des fließfähigen Trägermediums die mikrofluidische Struktur thermisch behandelt wird.

[0013] 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.

[0014] 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.

[0015] Eine zweckmäßige Ausführung der Erfindung kann vorsehen, dass das Reagenz in der mikrofluidischen Struktur mit einer im Wesentlichen homogenen Verteilung eingelagert wird.

[0016] 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.

[0017] Bei einer vorteilhafte Ausgestaltung der Erfindung kann vorgesehen sein, dass ein mikrofluidisches System, ausgewählt aus der folgenden Gruppe von Systemen, 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 Analysesysteme offenbart, die mit Trockenreagenzien beladen sind und im Wesentlichen scheibenförmig sind.

Beschreibung bevorzugter Ausführungsbeispiele der Erfindung

[0018] Die Erfindung wird im Folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

[0019] 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.

[0020] 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.

[0021] 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,
   - Einbringen eines ein Reagenz enthaltenen, fließfähigen Trägermediums in der mikrofluidischen Struktur und
   - Trocknen des Reagenz in der mikrofluidischen Struktur mittels Lyophilisieren,

   dadurch gekennzeichnet, dass vor dem Einbringen des fließfähigen Trägermediums die mikrofluidische Struktur thermisch behandelt wird, derart, dass die thermische Behandlung die Einlagerung des Reagenz in der mikrofluidischen Struktur gezielt beeinflusst.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** beim Einbringen des fließfähigen Trägermediums die mikrofluidische Struktur thermisch behandelt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** die mikrofluidische Struktur bei der thermischen Behandlung gekühlt wird.

4. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die mikrofluidische Struktur bei der thermischen Behandlung beheizt wird.

5. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Reagenz in der mikrofluidischen Struktur mit einer im Wesentlichen homogenen Verteilung eingelagert wird.

6. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** das fließfähige Trägermedium ein oder mehrere Tenside und / oder einen oder mehrere Füllstoffe enthält.

7. 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.

Claims

1. A method for providing a dried reagent in a microfluidic system, the method comprising the following steps:

   - providing a microfluidic system having a microfluidic structure,
   - introduction of a flowable carrier medium containing a reagent in the microfluidic structure, and
   - drying the reagent in the microfluidic structure by lyophilization,

   characterized in that the microfluidic structure is thermally treated before the introduction of the flowable carrier medium such that the thermal treatment purposefully influences the insertion of the reagent in the microfluidic structure.

2. The method according to Claim 1, **characterized in that** the microfluidic structure is thermally treated during the introduction of the flowable carrier medium.

3. The method according to Claim 1 or 2, **characterized in that** the microfluidic structure is cooled during the thermal treatment.

4. The method according to at least one of the preceding claims, **characterized in that** the microfluidic structure is heated during the thermal treatment.

5. The method according to at least one of the preceding claims, **characterized in that** the reagent is inserted in the microfluidic structure with an essentially homogeneous distribution.

6. The method according to at least one of the preceding claims, **characterized in that** the flowable carrier medium contains one or several surfactants and/or one or several filling materials.

7. The method according to at least one of the preceding claims, **characterized in that** a microfluidic system selected from the following group of systems is provided: microfluidic testing element and microfluidic chip.

Revendications

1. Procédé de fourniture d'un réactif séché dans un système microfluidique, le procédé comprenant les étapes suivantes consistant à :

   - fournir un système microfluidique présentant une structure microfluidique ;
   - introduire dans la structure microfluidique un milieu de support coulant, contenant un réactif ; et
   - sécher le réactif dans la structure microfluidique par lyophilisation ;

caractérisé en ce qu'avant l'introduction du milieu de support coulant, la structure microfluidique reçoit un traitement thermique de telle sorte que le traitement thermique affecte de manière ciblée l'incorporation du réactif dans la structure microfluidique.

2. Procédé selon la revendication 1, **caractérisé en ce que** lors de l'introduction du milieu de support coulant, la structure microfluidique reçoit un traitement thermique.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, **caractérisé en ce que** la structure microfluidique est refroidie lors du traitement thermique.

4. Procédé selon au moins l'une des revendications précédentes, **caractérisé en ce que** la structure microfluidique est chauffée lors du traitement thermique.

5. Procédé selon au moins l'une des revendications précédentes, **caractérisé en ce que** le réactif est incorporé dans la structure microfluidique avec une répartition substantiellement homogène.

6. Procédé selon au moins l'une des revendications précédentes, **caractérisé en ce que** le milieu de support coulant contient un ou plusieurs agents tensioactifs et/ou une ou plusieurs charges.

7. Procédé selon au moins l'une des revendications précédentes, **caractérisé en ce qu'**un système microfluidique est sélectionné dans le groupe de systèmes suivant : élément d'essai microfluidique ou puce microfluidique.

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]**
- WO 03035909 A2 **[0006]**
- EP 1916524 A1 **[0017]**