

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 941**

51 Int. Cl.:

B01F 13/00 (2006.01)

B01F 13/08 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

B82Y 25/00 (2011.01)

H01F 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2007 E 07825834 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2015 EP 2038051**

54 Título: **Un dispositivo para manipular y mezclar partículas magnéticas en un medio líquido y su utilización**

30 Prioridad:

21.06.2006 WO PCT/IB2006/052005

09.11.2006 WO PCT/IB2006/054182

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

30.09.2015

73 Titular/es:

SPINOMIX S.A. (100.0%)

PSE-C, ECUBLENS

1015 LAUSANNE, CH

72 Inventor/es:

RIDA, AMAR

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 546 941 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Un dispositivo para manipular y mezclar partículas magnéticas en un medio líquido y su utilización

5 Sector de la invención

La presente invención se refiere a un dispositivo de manipulación y mezcla de partículas magnéticas dentro de una cámara de reacción que es una parte de una plataforma fluidica o microfluidica.

10 Descripción de la técnica relacionada

Hoy en día, la de partículas (perlas) magnéticas es una tecnología estándar en ensayos bioquímicos y diagnósticos. La tecnología de partículas magnéticas es, de hecho, una tecnología robusta que permite conseguir rendimientos elevados (sensibilidad y exactitud) y también abre la posibilidad de fácil automatización de los protocolos de ensayo. Para muchas aplicaciones, la superficie de las partículas magnéticas está recubierta con un ligando o receptor adecuado, tal como anticuerpos, lectinas, oligonucleótidos u otras moléculas biorreactivas, que pueden unirse selectivamente a una sustancia diana en una mezcla con otras sustancias. Los ejemplos de pequeñas partículas o perlas magnéticas se dan a conocer en la patente de Estados Unidos 4.230.685, la patente de Estados Unidos 4.554.088 y la patente de Estados Unidos 4.628.037.

Un elemento clave en la tecnología de bioseparación y manipulación de partículas magnéticas es una eficiente mezcla para mejorar la velocidad de reacción entre las sustancias diana y las superficies de las partículas. De hecho, en lo que respecta a cualquier ensayo basado en superficie, la reacción está fuertemente limitada por el proceso de difusión natural, es necesaria una fuerte dirección y mezcla para promover la reacción de unión por afinidad entre el ligando y la sustancia diana.

Un ejemplo típico de aparato de mezcla de partículas magnéticas en medio de ensayo se da a conocer en la patente de Estados Unidos 6.231.760 y está disponible comercialmente de Sigris Research Inc con el nombre de sistema MixSep™. En esta patente y sistema, el medio de ensayo con las partículas magnéticas en un recipiente adecuado se sitúa en un gradiente de campo magnético generado por un imán externo. El concepto de mezcla se basa en el movimiento de un imán con respecto a un recipiente estacionario o el movimiento del recipiente con respecto a un imán estacionario utilizando medios mecánicos, induciendo por lo tanto un "desplazamiento relativo" de la posición del gradiente magnético dentro del recipiente. Este desplazamiento del gradiente de campo magnético inducirá, a su vez, a las partículas magnéticas a moverse continuamente con el cambio de la posición del imán (gradiente de campo magnético), realizando de este modo la mezcla. Sin embargo, con este procedimiento, el gradiente de campo magnético atraerá y confinará a las partículas en una región de cavidad cercana a las paredes del recipiente (véase http://www.sigris.com/mixsep_technology.html). En dicha condición, el contacto entre las partículas y el medio de ensayo está limitado a dicho espacio de cavidad, lo que reduce la eficiencia de mezcla. Aunque el "movimiento mecánico" de los imanes se reivindica como un medio de mezcla, también se describe la posibilidad de producir movimiento angular de las partículas mediante accionamiento secuencial de electroimanes dispuestos alrededor del recipiente. Sin embargo, mientras que los electroimanes proporcionan un campo magnético mucho menor en comparación con imanes permanentes, tal como se ha descrito el acoplamiento magnético entre electroimanes adyacentes repele fuertemente el flujo magnético fuera del recipiente dando como resultado una reducción adicional de la intensidad del campo magnético y la intensificación del efecto de cavidad. En dicha condición, la agitación (movimiento) y la mezcla de las partículas estarán fuertemente alteradas causando que las partículas se muevan lentamente, en su mayoría, como agregados en la región cercana al borde de las paredes.

Dentro del mismo espíritu, en la patente de Estados Unidos 6.764.859 se da a conocer un procedimiento de mezcla de partículas magnéticas en un recipiente en base al movimiento "mecánico" relativo entre el recipiente y la geometría matricial intermedia del imán. En dicha configuración, los imanes adyacentes tienen polaridad opuesta, lo que induce un cambio de la polaridad del campo magnético durante el movimiento intermedio relativo entre el recipiente y dos imanes adyacentes. En dichas condiciones, de hecho, las partículas pueden moverse mientras se separan relativamente entre sí, lo que afectará potencialmente a la mezcla. Sin embargo, en este enfoque cuando se tiene en consideración la duración completa del proceso de manipulación de partículas, el tiempo durante el cual las partículas están relativamente separadas entre sí es relativamente corto. Como consecuencia, son necesarios varios ciclos de mezcla para garantizar una mezcla eficaz. Además, durante el proceso de mezcla, las partículas no son puestas en contacto de forma homogénea con el volumen de muestra en el tubo de ensayo, lo que limita, a su vez, fuertemente la eficiencia de mezcla. Este problema es más pronunciado dado que el volumen de muestra es grande.

En consecuencia, cuando estos enfoques de mezcla mecánica se comparan con la "agitación manual de un tubo de ensayo", el tiempo y el rendimiento de la reacción son sustancialmente similares si no más bajos, indicando que la difusión sigue siendo un importante factor limitante.

Otros aspectos para separación y resuspensión de partículas magnéticas se dan a conocer en la patente EP 0.504.192. Esta patente da a conocer la utilización de accionamiento secuencial de dos fuentes de campo magnético (electroimanes) dispuestas opuestas entre sí en las paredes de una cámara. El concepto de accionamiento

propuesto de dichos electroimanes se basa en suministro de energía (accionamiento) secuencial de los electroimanes mediante "binario" (es decir, encendido y apagado) o "analógico" en el que un primer electroimán recibe gradualmente suministro completo de energía, y a continuación su potencia se reduce, mientras que el siguiente electroimán recibe gradualmente suministro de energía, y así sucesivamente. A través de este accionamiento, las partículas serán movidas y arrastradas al volumen de la cámara de reacción y, de este modo, se resuspenderán. Mientras el concepto de utilizar (como mínimo) dos electroimanes con accionamiento "secuencial" es conceptualmente una manera evidente para resuspensión de partículas a partir de un agregado, durante su "movimiento" las partículas permanecen en su mayoría aglomeradas debido a su interacción dipolar en el campo magnético aplicado. La única manera, después de mover las partículas "superparamagnéticas" para ocupar el volumen de la cámara, de garantizar completamente resuspensión "homogénea" en la cámara es eliminar completamente el campo magnético externo y dejar la desagregación a agitadores Brownianos y térmicos. Adicionalmente, la solicitud da a conocer que suministrar y cortar la energía de forma alterna a los dos electroimanes a una velocidad suficientemente rápida mantiene a las partículas suspendidas en el centro de la cámara. Este proceso limita el movimiento de las partículas a una distancia relativamente pequeña, reduciendo significativamente la eficiencia de mezcla entre partículas y el medio líquido circundante.

En general, más allá de la limitada capacidad de mezcla de las tecnologías de partículas metálicas del estado de la técnica, basadas principalmente en el concepto de "llevar un imán a las inmediaciones de un tubo de ensayo", la integración y la automatización de procedimientos de ensayo con partículas magnéticas son muy complejas, necesitando sistemas robóticos voluminosos. Estas limitaciones se vuelven más críticas a medida que los procedimientos de ensayo se están volviendo cada vez más complejos.

La tecnología basada en microfluídica es percibida hoy en día como una tecnología emergente con un mayor potencial que puede causar la integración más fácil de complejos procedimientos de ensayo bioquímico en un sistema automatizado fácil de usar y miniaturizado. Combinar tecnología de partículas magnéticas con microfluídica será ciertamente de gran importancia, dado que el control preciso de diferentes reactivos (permitido por la microfluídica) y la manipulación de especies biológicas y sus reacciones (permitida por partículas magnéticas) estarán integrados conjuntamente dentro de un único sistema.

Un enfoque de mezcla de partículas magnéticas en un canal microfluídico se enseña en la publicación "magnetic force driven chaotic micro-mixer", de Suzuki, H, en las actas de The Fifteenth IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, 2002. El enfoque consta de la mezcla de flujos de partículas magnéticas inyectadas en suspensión en un canal microfluídico y donde la mezcla con el medio circundante está garantizada por un campo magnético generado por microelectroimanes embebidos a lo largo de la trayectoria de flujo. La combinación de la fuerza magnética inducida por los microelectroimanes sobre las partículas junto con la fuerza impulsora del flujo en el microcanal induce un régimen caótico y, de este modo, mezcla. Un concepto similar se ha dado a conocer recientemente en la solicitud de patente de Estados Unidos número 2006/140.051 donde el campo magnético es generado por electroimanes dispuestos en las paredes laterales en una dirección predeterminada con respecto a la dirección del flujo. Apagando/encendiendo los electroimanes en funcionamiento secuencial, puede crearse una fuerza magnética giratoria que causa la mezcla de las partículas portadas por el flujo. La principal limitación de este enfoque de "mezcla en flujo" es que el volumen del medio de ensayo que puede mezclarse con las partículas es muy pequeño y el tiempo de reacción muy corto, limitando considerablemente los casos de su aplicabilidad.

Para superar las limitaciones del "enfoque de mezcla en flujo", una solución consiste en retener las partículas en una ubicación dada de un canal o cámara fluidica utilizando un gradiente de campo magnético mientras el medio de ensayo es inyectado con un flujo a través de las partículas magnéticas retenidas. Este enfoque se ha dado a conocer en las solicitudes de patente de Estados Unidos números 2005/032.051 y 2004/166.547 donde las partículas retenidas en un microcanal de flujo se han utilizado como soporte sólido para procedimientos de inmunoensayo. A lo largo de las mismas líneas, un concepto de flujo continuo aplicado para un ensayo de hibridación y detección de ADN se describe en la publicación: "Dynamics DNA hybridization on a Chip Using Paramagnetic Beads", de Z. Hugh Fan & al., Analytical Chemistry, 71. Sin embargo, el enfoque de flujo continuo descrito de este modo padece una grave limitación física, dado que para ser manipuladas en un entorno con procesamiento fluido continuo, las partículas deben ser expuestas de forma continua a un campo magnético. En dichas condiciones, las partículas se pegarán entre sí y aglomerarán perdiendo de este modo su principal ventaja: la superficie de la partícula que está en contacto activo con el flujo de fluido se reducirá drásticamente, lo que comprometerá gravemente el rendimiento del ensayo.

Una solución al problema de aglomeración de partículas magnéticas en el enfoque de flujo continuo se ha dado a conocer en la solicitud de patente de Estados Unidos 2005/208.464. En este enfoque, las partículas son retenidas en una parte de un canal de flujo para formar un tipo de filtro que de forma sustancialmente homogénea cubre la sección transversal del canal de flujo. Para obtener este filtro, las partículas magnéticas se manipulan utilizando un campo variable en el tiempo (amplitud, frecuencia y polaridad) para controlar la aglomeración de partículas. La eficiencia de este enfoque para mezcla microfluídica de líquidos se ha demostrado en una publicación del mismo grupo de autores "Manipulation of Self-Assembled Structures of Magnetic Beads for Microfluidic Mixing and Assaying", de A. Rida & al. Analytical Chemistry, 76, 2004. Dicha publicación da a conocer un dispositivo según el

preámbulo de la reivindicación 1. Incluso demostrando un importante desarrollo en manipulación y mezcla de partículas magnéticas en un entorno microfluídico, el enfoque dado a conocer en la solicitud de patente de Estados Unidos 2005/208.464 padece sin embargo muchas restricciones limitantes prácticas. En primer lugar, dado que las partículas se mantienen estacionarias y fijadas en un estrecho segmento de la celda de flujo continuo, el contacto entre las partículas y la sustancia diana está limitado a esa región estrecha y durante un tiempo muy corto, que en la práctica hace dicho proceso difícil de establecer. En segundo lugar, este enfoque está específicamente adaptado para manipular y mezclar partículas magnéticas en condiciones de flujo continuo en entornos microfluídicos, que hacen que no esté completamente adaptado para diferentes condiciones de ensayo.

Los procedimientos y enfoques conocidos aplicables presentan desventajas, incluyendo el requisito de manipular y mezclar partículas magnéticas en diversos entornos con más enfoque en microfluídica, así como diversas restricciones del proceso, factores limitantes e ineficiencias.

Características de la invención

La presente invención da a conocer un dispositivo para manipular y mezclar de forma eficiente partículas magnéticas en entorno microfluídicos. "Mezclar", en el presente contexto, significa en particular poner en contacto de manera muy eficiente superficies de partículas grandes con el medio líquido circundante, de tal manera para alcanzar: (1) una unión eficaz de las partículas a cierta molécula o moléculas diana y (2) posibilidades adicionales de lavar, separar, eluir y detectar las dianas capturadas sobre las partículas a partir del medio líquido residual.

El mecanismo de mezcla propuesto proporciona un incremento considerable y perpetuo de la superficie activa de partículas por unidad de volumen que causa un contacto mejorado entre esta gran superficie de partículas y las sustancias diana. Además, el proceso de manipulación de partículas magnéticas propuesto garantiza ventajosamente una mezcla homogénea que cubre sustancialmente todo el volumen de reacción en una fracción de tiempo permitiendo de este modo que mucho más volumen de muestra se ponga eficaz y rápidamente en contacto con las superficies de las partículas. Además, durante su manipulación, las partículas están en movimiento efectivo perpetuo cubriendo todo el volumen de la cámara de reacción, lo cual es clave para mejorar la mezcla de partículas.

Además, la presente invención da a conocer un dispositivo que prácticamente permite la integración de complejos procedimientos de ensayo en un sistema compacto y fácil de usar que puede funcionar en condiciones de flujo continuo o, ventajosamente, de flujo no continuo.

La presente invención se refiere a un dispositivo para manipular y mezclar partículas magnéticas en un entorno microfluídico, conseguido según la reivindicación independiente 1, y una utilización de dicho dispositivo, según la reivindicación independiente 13.

En las reivindicaciones dependientes se exponen diferentes realizaciones.

Según una realización: un dispositivo para mezclar partículas magnéticas en un medio líquido circundante y separar partículas magnéticas de un medio líquido, que comprende:

(a) como mínimo, un par de polos magnéticos enfrentados entre sí a través de un entrehierro, divergiendo los polos enfrentados desde un extremo estrecho del entrehierro hasta un extremo grande del entrehierro, los polos con el entrehierro son, de otra manera, parte de un circuito electromagnético cerrado dispuesto para proporcionar un gradiente de campo magnético en dicha región de entrehierro;

(b) una cámara de reacción que es parte de una red microfluídica para contener dichas partículas magnéticas en suspensión y situada en el entrehierro de dichos polos de electroimanes, en la que la cámara de reacción tiene extremos de entrada/salida para introducir y extraer el medio líquido en la cámara de reacción, y desde la misma extendiéndose la cámara de reacción entre sus extremos a lo largo de dicho entrehierro, de modo que los extremos de la cámara de reacción están en correspondencia con los extremos estrecho y grande del entrehierro.

(c) en el que preferentemente cada uno de los polos magnéticos accionados con una secuencia de campos magnéticos que tienen una polaridad y una amplitud que varían en el tiempo para inducir variaciones en el tiempo de la posición de los máximos del gradiente de campo magnético a través de la cámara de reacción, haciendo de este modo que las partículas en utilización estén en movimiento traslacional y rotacional relativo como una niebla de partículas que cubre todo el volumen de la cámara de reacción.

Un elemento clave de este dispositivo es la variación de la geometría de la cámara de reacción expresada en el presente documento mediante un incremento transversal de las dimensiones del canal (partes convergentes) o una disminución de las dimensiones del canal (partes divergentes). Dicha variación de la geometría del canal inducirá una variación de la velocidad del flujo a través de la sección transversal de la cámara de reacción, que es un factor clave del mecanismo de mezcla dado a conocer. De hecho, al contrario que un canal con una geometría uniforme donde la corriente de flujo se desarrolla solamente en una dirección normal a la sección transversal del canal principal, variaciones de la geometría del microcanal inducirán gradientes de velocidad transversales que causan

una mezcla de flujo más eficaz.

Por consiguiente, la cámara de reacción de geometría variable se sitúa en un entrehierro de aire entre polos magnéticos que tienen formas que varían en la misma dirección que la geometría de la cámara de reacción. Las partes divergentes/convergentes de la cámara de reacción se sitúan en el entrehierro de aire de, como mínimo, un par de polos magnéticos enfrentados entre sí a través de un entrehierro y donde dichos polos magnéticos están dispuestos de forma codivergente/coconvergente con las partes divergentes/convergentes de la cámara de reacción. La disposición divergente/convergente de los polos magnéticos inducirá una variación del campo magnético a través de la región del entrehierro de aire delimitada por los polos magnéticos, creando de este modo un gradiente de campo magnético que cubre todo el volumen de la cámara de reacción situada en el entrehierro de aire de dicho polo. El gradiente de campo magnético generado de este modo sirve como una fuerza impulsora para manipulación y mezcla de partículas magnéticas en la cámara de reacción.

El efecto deseado obtenido mediante las geometrías de la cámara de reacción/los polos magnéticos descritas de este modo es que el perfil de variación del gradiente de campo magnético corresponde al mismo perfil de variación que para el gradiente de velocidad de flujo en la cámara de reacción. Dicha "covariación" de los gradientes de velocidad de flujo/campo magnético (fuerzas) permite: (1) retener y separar dichas partículas magnéticas en la cámara de reacción en condiciones de un flujo de fluido y (2) alcanzar de forma más homogénea las condiciones de mezcla (y, por lo tanto, una mezcla más controlada y eficiente) de las partículas magnéticas con el medio líquido circundante.

Otro aspecto clave se refiere al mecanismo de accionamiento de los polos magnéticos que comprende:

(1) aplicar desde los polos electromagnéticos secuencias de campo magnético que tienen una polaridad y una intensidad que varían en el tiempo; siendo dichas secuencias de campo magnético variables eficaces para romper o inhibir los agregados de partículas y para mantener a las partículas en suspensión como una niebla de partículas en movimiento dinámico relativo; y

(2) combinar los campos magnéticos de polos magnéticos diferentes en una secuencia para inducir el desplazamiento de la niebla de partículas a través de la cámara de reacción, con lo que la niebla de partículas ocupa sustancialmente todo el volumen de la cámara de reacción de forma cuasi-instantánea o durante un periodo de tiempo.

Se ha descubierto que este mecanismo de accionamiento de polos magnéticos causa variaciones continuas en el tiempo de la posición (desplazamiento) de los máximos del gradiente de campo magnético a través del volumen de la cámara de reacción, causando de este modo que las partículas estén en movimiento traslacional y rotacional relativo perpetuo que puede cubrir sustancialmente todo el volumen de la cámara de reacción.

Adicionalmente, el efecto deseado obtenido mediante el mecanismo de accionamiento es que, durante su movimiento, las partículas no se desplazan como un agregado compacto sino que, en su lugar, se mueven como una niebla de partículas que da como resultado una fuerte mejora del contacto entre las superficies de las partículas y el medio líquido circundante.

Adicionalmente, el efecto deseado obtenido mediante el mecanismo de accionamiento es que la mezcla de partículas cubrirá sustancialmente todo el volumen de la cámara de reacción y no estará limitada a un segmento estrecho como en los conceptos de la técnica anterior dados a conocer. Este proceso de manipulación de partículas magnéticas ventajosamente garantiza, por lo tanto, una mezcla homogénea que permite que mucho más volumen de líquido se ponga en contacto eficazmente con las superficies de las partículas.

Adicionalmente, el efecto deseado obtenido mediante el mecanismo de accionamiento es la posibilidad de seleccionar la secuencia del campo magnético para no solamente mezclar de forma homogénea las partículas sino también separar o confinar las partículas de modo que las partículas ocupen un subvolumen en el volumen de la cámara de reacción en los bordes externos de la cámara de reacción. Por ejemplo, se puede aplicar una primera secuencia del campo magnético para desplazar y, por lo tanto, mezclar de forma homogénea las partículas en sustancialmente todo el volumen de la cámara de reacción; y, a continuación, aplicar una segunda secuencia del campo magnético que selecciona específicamente la dirección del gradiente de campo magnético que hace que las partículas sean arrastradas a un subvolumen de la cámara de reacción determinado por la dirección del gradiente de campo magnético aplicado. Esta flexibilidad al controlar las partículas es ventajosamente importante, dado que permite manipular y controlar el estado de las partículas en correspondencia con el proceso de ensayo.

Otra característica es que, durante su movimiento perpetuo (movimiento), el tamaño de los agregados de partículas puede estar controlado principalmente por la "frecuencia" de las variaciones de la polaridad del campo magnético mientras que la homogeneidad de mezcla está controlada por la amplitud del campo magnético. Por consiguiente, la amplitud (gradiente) del campo magnético puede usarse como un parámetro de conmutación para, por ejemplo, mezclar de forma homogénea las partículas sobre sustancialmente todo el volumen de la cámara de reacción o arrastrarlas (separarlas) al borde externo de la cámara de reacción.

Adicionalmente, un efecto deseado obtenido mediante el dispositivo y el mecanismo de accionamiento, es la manipulación extremadamente rápida de las partículas. Por ejemplo, comenzando a partir de una configuración donde las partículas son separadas en primer lugar al borde externo de la cámara de reacción utilizando una primera secuencia de accionamiento específica, una fracción de tiempo (un segundo o menos) es suficiente para situar a las partículas en una configuración de mezcla homogénea utilizando una segunda secuencia de accionamiento. Las partículas pueden, seguidamente, ser arrastradas de nuevo en una fracción de tiempo al borde externo de la cámara de reacción aplicando la primera secuencia de accionamiento. Este rápido proceso de manipulación puede alcanzarse incluso en un complejo medio altamente viscoso como lisado de sangre.

Para alcanzar los efectos deseados, las partículas magnéticas en utilización son preferentemente inicialmente partículas magnéticas desimantadas que desarrollan una respuesta de histéresis ferromagnética específica a un campo magnético externo. Más específicamente, las partículas tienen un campo coercitivo entre 15,9 y 79,6 kA/m (200 y 1000 Oe).

Para alcanzar los efectos deseados, las secuencias de campo magnético con variación en el tiempo preferentemente tienen, forma sinusoidal, de diente de sierra, triangular asimétrica, o triangular simétrica, o cualquier combinación de estas formas.

Un chip microfluídico comprende:

(a) una cámara de reacción que es parte de una red fluidica, que tiene, como mínimo, una cavidad con partes divergentes-convergentes

(b) aberturas situadas a ambos lados de la cámara de reacción para recibir polos magnéticos que son parte de un circuito magnético externo, y en el que

(c) los polos magnéticos están dispuestos geométricamente de una manera que sean codivergentes/coconvergentes con partes divergentes-convergentes de la cámara de reacción.

Según los aspectos y efectos descritos anteriormente, se da a conocer un procedimiento de mezcla de partículas magnéticas en un entorno microfluídico con medio circundante en una cámara de reacción que es parte de una red microfluídica, en el que, como mínimo, un par de polos electromagnéticos se enfrentan entre sí a través de la cámara de reacción, comprendiendo el procedimiento:

(a) aplicar una secuencia de campos magnéticos que tienen polaridad e intensidad que varían en el tiempo desde cada uno de los polos electromagnéticos,

(b) combinar el campo magnético procedente de cada polo magnético para inducir variaciones continuas en el tiempo de la posición de los máximos del gradiente de campo magnético a través de todo el volumen de la cámara de reacción; y

(c) hacer que las partículas se distribuyan de forma homogénea y se muevan de forma dinámica como una niebla de partículas sobre una parte sustancial del volumen de la cámara de reacción.

En relación con un objetivo final, las partículas en utilización tienen un revestimiento superficial diseñado para permitir el reconocimiento por afinidad, como mínimo, con una molécula diana o reacción con el medio líquido circundante dentro de la cámara de reacción. Dichas moléculas o reactivos diana son portados por un flujo a la cámara de reacción. Cuando se combinan entre sí, todos los aspectos de la presente invención permiten el procesamiento con rendimiento mejorado de complejos procedimientos bioquímicos, de síntesis y análisis utilizando partículas magnéticas como soporte sólido. Los ejemplos típicos, aunque sin limitación, de dichos procedimientos son ensayo ligado a enzimas, extracciones de proteínas y ácidos nucleicos, o procedimientos de detección a base de metodologías de amplificación de señales enzimáticas, tales como quimioluminiscencia, NASBA, TMA o PCR.

Descripción breve de los dibujos

Los objetivos y características de la presente invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención, tanto en cuanto a su organización como a su manera de funcionamiento, junto con objetivos y ventajas adicionales, puede entenderse de la mejor manera mediante referencia a la siguiente descripción, tomada en relación con los dibujos adjuntos, en los que:

Las figuras 1 (a) y (b) son representaciones esquemáticas del concepto de enfoques de manipulación de partículas magnéticas de flujo continuo, tal como se describen en la técnica anterior.

La figura 2 (a) muestra una vista esquemática de una realización preferente que no forma parte de la presente invención, que incluye un par de polos magnéticos "divergentes" enfrentados entre sí a través de un entrehierro y

una cámara (canal) de reacción situada en este entrehierro. La figura 2 (b) es una vista de sección transversal de la figura 2 (a), que muestra en particular el circuito electromagnético que proporciona el campo magnético en la cámara de reacción.

5 La figura 3 (a) muestra una representación esquemática de una realización preferente de la presente invención que incluye en particular un par de polos magnéticos “divergentes” y una cámara de reacción que tiene una cavidad divergente dispuesta de forma codivergente con la geometría del entrehierro. La figura 3 (b) muestra el perfil de variación del campo magnético a lo largo del eje de dichos polos magnéticos.

10 Las figuras 4 (a) y (b) muestran el perfil y la variación de la velocidad de flujo inducidos por la geometría de la cámara de reacción divergente.

Las figuras 5 (a) y (b) son representaciones esquemáticas de manipulación y mezcla de partículas magnéticas, según una realización preferente de la presente invención que incluye en particular un cambio de la dirección de la polaridad de los polos magnéticos, cuyo campo magnético inducido presenta el efecto de mover axialmente las partículas.

15 La figura 6 muestra una vista esquemática de otra realización preferente más de la presente invención que incluye una configuración de cuadrupolo de polos magnéticos, que codivergen/coconvergen con la cavidad de la cámara de reacción.

20 Las figuras 7 (a) a (d) representan esquemáticamente, para la realización preferente de la figura 6, la posición y el movimiento relativo de las partículas a través del volumen de la cámara de reacción como consecuencia de las secuencias de accionamiento de los polos electromagnéticos utilizando un campo magnético que presenta una polaridad y una amplitud que pueden variar con el tiempo.

25 La figura 8 representa esquemáticamente el efecto deseado obtenido con la realización de cuadrupolo, según la presente invención, donde la mezcla y el movimiento de las partículas cubren de forma homogénea todo el volumen de la cámara de reacción.

30 Las figuras 9 (a) y (b) muestran una vista en perspectiva del circuito electromagnético según una realización preferente de la presente invención.

35 La figura 10 muestra un plano de un chip microfluídico, según una realización preferente de la presente invención.

Las figuras 11 (a) a (c) representan esquemáticamente un proceso de utilizar el dispositivo de mezcla de la presente invención para realizar un ensayo en general y un inmunoensayo en particular.

40 La figura 12 ilustra esquemáticamente otra realización de manipulación y mezcla de partículas magnéticas con el medio circundante en un modo de “inyección pulsada/mezcla”.

La figura 13 ilustra el diferente comportamiento de las partículas magnéticas en un “campo magnético giratorio”.

Descripción detallada de las realizaciones preferentes

45 El principal efecto alcanzable de la presente invención es un control eficaz de las partículas magnéticas que permite una mezcla mejorada y homogénea con el medio circundante. En particular, la mezcla de las partículas magnéticas se realiza en una cámara de reacción que es parte de una red microfluídica y en la que las partículas son manipuladas utilizando polos magnéticos externos con configuraciones y geometrías específicas. Por consiguiente, los diferentes reactivos se introducen en la cámara de reacción utilizando flujos de líquido y los polos magnéticos son accionados específicamente para controlar las partículas magnéticas en utilización dentro de la cámara de reacción.

50 En general, el entorno microfluídico de la presente invención se refiere a dispositivos diseñados habitualmente a una escala adecuada para analizar microvolúmenes preferentemente en el intervalo de 0,1 μ l a 500 μ l. Sin embargo, en una aplicación fundamental de la presente invención se utilizan grandes muestras para concentrar biomoléculas específicas en el dispositivo a un pequeño volumen para el posterior análisis. Los canales y pocillos de flujo a microescala tienen profundidades y anchuras preferentes del orden de 0,05 - 1 mm. La “cámara de reacción” que es parte de una red microfluídica, tal como se utiliza en el presente documento se refiere a cámaras con una cavidad que tienen un volumen en el intervalo de 0,1 μ l a 500 μ l y preferentemente en el intervalo de 10 μ l a 100 μ l. Sin embargo, para muchas aplicaciones, pueden utilizarse dimensiones más grandes a “mesoescala” en la escala de milímetros. Análogamente, las cámaras en los sustratos a menudo tendrán mayores dimensiones que los microcanales, en la escala de 1-10 mm de anchura y 1-5 mm de profundidad.

65 Para ilustrar la ventaja clave de la presente invención, la figura 1 muestra esquemáticamente el concepto de un enfoque de manipulación de partículas magnéticas de flujo continuo, tal como se describe en la técnica anterior. En

la técnica anterior de hecho, las partículas -3- se mantienen fijadas en una región estrecha de una celda de flujo continuo -2- delimitada por puntas de polos magnéticos -1- y -1'-. Las partículas pueden cubrir parcialmente la sección transversal de la celda de flujo continuo (figura 1 (a)) cuando se aplica un campo estático, tal como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos 2004/166.547, o cubrir de forma homogénea la sección transversal de la celda de flujo (figura 1 (b)) cuando se aplica un campo magnético con variación en el tiempo, tal como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos 2005/208.464. Las configuraciones de punta de polo utilizadas para generar un gradiente de campo magnético confinan a las partículas en un segmento estacionario fijo y estrecho de la celda de flujo continuo, lo que limita el contacto entre las partículas y las moléculas diana a esa región estrecha y durante un tiempo muy corto.

Para superar las limitaciones de la técnica anterior, se dan a conocer un dispositivo magnético y una geometría de polos magnéticos. Por consiguiente, tal como se muestra en la figura 2, un dispositivo para manipular y mezclar partículas magnéticas en un medio líquido circundante, comprende: (i) como mínimo, un par de polos magnéticos -1-, -1'- enfrentados entre sí a través de un entrehierro, divergiendo los polos enfrentados desde un extremo estrecho del entrehierro hasta un extremo grande del entrehierro. Los polos forman parte de un circuito electromagnético y están dispuestos para proporcionar un gradiente de campo magnético -5- en la región del entrehierro. En esta región del entrehierro está situada una cámara de reacción tubular -2- que es parte de una red fluidica y en la que las partículas magnéticas en utilización serán manipuladas. El circuito magnético está compuesto por un núcleo magnético -6- y bobinas -7- que, cuando se les suministra una corriente eléctrica, producen un campo magnético en la región del entrehierro a través de los polos magnéticos -1-, -1'-. Además, cada polo magnético -1- y -1'- es preferentemente accionable electromagnéticamente de forma independiente entre sí utilizando dos bobinas accionables de forma independiente -7-.

El efecto obtenido mediante la geometría del polo magnético descrita es que el gradiente de campo magnético no estará limitado a una región estrecha sino que cubrirá toda la región de espacio que se extiende a lo largo de la dirección axial X en el entrehierro de aire de dichos polos.

Para mejorar el efecto de mezcla, la cámara de reacción -2- situada en la región del entrehierro de aire tiene una forma de cavidad que varía en la misma dirección que la geometría de los polos magnéticos. Tal como se representa esquemáticamente en la figura 3(a), en lugar de tener un canal de flujo con una geometría uniforme (sección transversal uniforme) como en la figura 2(a), la cámara de reacción -2- tiene una geometría variable que es sustancialmente codivergente en el entrehierro divergente entre los polos. Con dicha variación de la geometría de la cámara de reacción, se inducirá un gradiente de velocidad transversal -8- que causará una mezcla de flujo más eficaz (véase la figura 4).

En funcionamiento, el campo magnético que varía en el espacio generado por los polos magnéticos -1-, -1'- proporciona un gradiente de campo magnético y, por lo tanto, una fuerza magnética -5- a lo largo de la dirección X que se utilizará para retener a las partículas magnéticas -9- durante el flujo de un fluido en la cámara de reacción -2- (véase la figura 5). Para ser capaz de retener a las partículas -9- en la cámara de reacción -2-, la fuerza magnética generada -5- que actúa sobre las partículas debe ser mayor que la fuerza de arrastre del flujo que tiende a llevarse lejos a las partículas. Además, dado que la fuerza magnética -5- y la fuerza de arrastre del flujo disminuyen de la misma manera a lo largo de la dirección X, será posible controlar la fuerza magnética generada -5- de modo que sea sustancialmente igual a la fuerza de arrastre del flujo. Cuando se introducen en la cámara de reacción -2- y se someten a un campo magnético estático -5-, las partículas magnéticas -9- tienden a formar cadenas magnéticas a lo largo de la línea de flujo del campo magnético. Debido al gradiente de campo magnético generado en la cámara de reacción -2-, las cadenas de partículas magnéticas coalescerán para formar una estructura similar a una cadena fuertemente agregada. Preferentemente, la cantidad de partículas magnéticas -9- utilizadas es tal que la estructura agregada magnética se ubica principalmente cerca de los polos magnéticos en la parte cónica de la cámara de reacción -2-, tal como se muestra en la parte izquierda de la figura 5 (a). Un campo magnético que varía en el tiempo como un campo magnético alterno se aplica, a continuación, para descomponer las estructuras similares a una cadena agregadas con el flujo de fluido a través de dichas estructuras de partículas magnéticas a un caudal predefinido (es decir ligeramente incrementado, según sea necesario). Se obtiene una estructura magnética poco agregada, tal como se ilustra en la parte derecha de la figura 5, y se controla ajustando la amplitud y la frecuencia del campo magnético, el gradiente de campo magnético proporcionado por la geometría de los polos y el caudal de fluido en la cámara de reacción -2-.

El efecto deseado obtenido mediante las geometrías de la cámara de reacción/los polos magnéticos descritas de este modo es que el perfil de variación del gradiente de campo magnético corresponde al mismo perfil de variación que para el gradiente de velocidad de flujo en la cámara de reacción (tal como se muestra en la figura 3(b) y la figura 4(b)). Dicha "covariación" de los gradientes de velocidad de flujo/campo magnético (fuerzas) permite alcanzar de forma más homogénea las condiciones de mezcla (y, por lo tanto, una mezcla más controlada y eficiente) de las partículas magnéticas con un flujo de líquido.

El parámetro geométrico del dispositivo de las figuras 2 a 5, según la presente invención, debe ajustarse de una manera que reduzca las pérdidas magnéticas y garantice un enfoque máximo del flujo magnético en la cámara de reacción -2-. Además, el ajuste de estas dimensiones debe realizarse de manera que el gradiente de campo

magnético generado cubra toda la cámara de reacción y minimice la existencia de zonas dentro de la cámara de reacción con un gradiente de campo magnético evanescente. En esta perspectiva, la proporción entre la profundidad -H- del extremo grande con respecto a la longitud -L- de la parte divergente de la cámara de reacción está entre 0,1 y 10 y preferentemente entre 0,1 y 1. Los valores típicos de la longitud -L- de la parte divergentes están entre 50 μm y 10 mm, preferentemente entre 100 μm y 5 mm. Las dimensiones del canal microfluídico conectado al extremo estrecho de la cámara de reacción están en el intervalo de 50 μm a 5 mm y preferentemente entre 100 μm y 1 mm.

Por consiguiente, un aspecto clave se refiere al mecanismo de accionamiento de los polos magnéticos que se basa en la aplicación en cada polo electromagnético de secuencias de campo magnético que tienen polaridad e intensidad que varían en el tiempo.

Un ejemplo típico de este aspecto de accionamiento se ilustra en la figura 5. Tal como se muestra esquemáticamente en la figura 5(a), un campo magnético "oscilante en paralelo" -4-, -4'- se aplica a los polos magnéticos:

$$\text{Polos 1 y 1': } B = B_0 \sin(2\pi f_1 t) \quad (1)$$

en dicha condición y debido al cambio perpetuo de la polaridad del campo, la aglomeración magnética (cadenas) se descompondrá en estructuras similares a cadenas de partículas más pequeñas con un tamaño que disminuye con la frecuencia del campo (f_1). En última instancia, las partículas se comportarán como una niebla de partículas en movimiento dinámico relativo. Otro importante fenómeno que caracteriza la utilización de un campo magnético "oscilante", es la generación de interacción dipolar negativa entre las partículas (debido al hecho de que las partículas no girarán a la misma velocidad) que contribuyen adicionalmente a la descomposición de la aglomeración de partículas. Por ejemplo, al contrario que el caso de un campo estático donde las partículas serán en su mayoría atraídas como una masa agregada hacia los polos magnéticos (tal como se muestra en la figura 1(a)), en un campo magnético oscilante las partículas (mientras giran) tienden a distribuirse de forma homogénea sobre la sección transversal de la cámara de reacción (tal como se muestra en la figura 5(a)). En otras palabras, en un campo magnético oscilante las partículas tenderán a ocupar un espacio más grande debido al desarrollo de fuerzas magnéticas repulsivas entre las partículas.

En resumen, la utilización de un campo magnético que tiene una polaridad y una amplitud que varían en el tiempo como accionamiento de base de los polos magnéticos permite una rotura o inhibición eficaz de agregados de partículas y tiende a mantener a las partículas en suspensión como una niebla de partículas en movimiento dinámico relativo.

Sin embargo, dado que la manipulación de partículas magnéticas necesita la utilización de un gradiente (fuerza) magnético -5-, las partículas serán atraídas al segmento estrecho de la cámara de reacción, que confinará y, por lo tanto, tenderá a aglomerar a las partículas. Esta aglomeración puede reducirse reduciendo la amplitud del campo aplicado (B_0) y de este modo el gradiente de fuerza magnética. Si, de hecho, se reduce la fuerza reduciendo la amplitud del campo aplicado (B_0), se observa que la estructura de partículas "giratorias" -9- se expandirá radicalmente a lo largo de la dirección X debido a las fuerzas magnéticas repelentes entre las partículas inducidas por su rotación relativa.

Para superar la aglomeración adicional inducida por el gradiente de campo magnético, tal como se muestra en la figura 5(b), la polaridad de la polaridad del campo magnético -4-, -4' generado a partir de cada uno de los polos magnéticos -1- y -1'- se cambia de paralela a opuesta (anti-paralela):

$$\begin{aligned} \text{Polo 1: } B &= B_0 \sin(2\pi f_1 t + \pi) \\ \text{Polo 1': } B &= B_0 \sin(2\pi f_1 t) \end{aligned} \quad (2)$$

para causar un cambio de la dirección de la fuerza magnética -5-, que moverá a las partículas -9- axialmente en la dirección X, siguiendo la dirección de la fuerza magnética -5-, desde el segmento estrecho al segmento grande de la cámara de reacción.

Por consiguiente, la "conmutación" continua entre los dos esquemas de accionamiento de los polos magnéticos definidos por las ecuaciones (1) y (2) causa variaciones continuas en el tiempo de la posición de los máximos del gradiente de campo magnético desde los segmentos estrecho a grande de la cámara de reacción. Estos cambios de máximos del gradiente de campo magnético causarán, a su vez, que las partículas estén en movimiento axial perpetuo entre los segmentos estrecho y grande de la cámara de reacción siguiendo las variaciones del gradiente de campo magnético -5-.

Por consiguiente, el mecanismo de accionamiento se basa en el descubrimiento de que, mediante la elección apropiada de la frecuencia de conmutación (f_2) entre el esquema de accionamiento de los polos magnéticos definido mediante la ecuación (1) y (2), se puede alcanzar un estado donde las partículas cubrirán de forma sustancialmente homogénea todo el volumen de reacción, tal como se muestra esquemáticamente en la figura 5(c).

El mecanismo de accionamiento descrito de este modo, causa que las partículas estén en movimiento traslacional y rotacional relativo perpetuo que puede cubrir sustancialmente todo el volumen de la cámara de reacción. Dicha dinámica de partículas es el factor clave en la mezcla de partículas dada a conocer, dado que la mezcla cubrirá sustancialmente todo el volumen de la cámara de reacción y no estará limitada a un segmento estrecho, tal como en los conceptos de la técnica anterior dados a conocer. Este proceso de manipulación de partículas magnéticas ventajosamente garantiza, por lo tanto, una mezcla homogénea permitiendo que mucho más volumen de líquido se ponga en contacto eficazmente con las superficies de las partículas.

Además, como cuando se compara con el concepto de resuspensión de partículas magnéticas de la técnica anterior de la patente EP 0.504.192, la utilización de suministro de energía (accionamiento) secuencial de los electroimanes mediante "binario" (es decir, encendido y apagado) o "analógico" con el dispositivo magnético dado a conocer de la figura 2, causa que las partículas se muevan muy lentamente mientras permanecen en su mayoría aglomeradas. Además, la alteración de la polaridad entre los dos estados de la figura 5(a) y 5(b) no resolverá sustancialmente este problema según lo sugerido por la patente de Estados Unidos 6.231.760. Dichas dificultades son una especificidad de la "microfluídica" donde el volumen de trabajo relativamente "pequeño" causa un fuerte acoplamiento magnético entre los imanes adyacentes.

Para resolver este problema, el descubrimiento clave es aplicar en cada polo electromagnético secuencias de campo magnético que tienen polaridad e intensidad que varían en el tiempo, cuyo papel es romper o controlar eficazmente los agregados de partículas y mantener las partículas en suspensión como una niebla de partículas en movimiento dinámico relativo; y a continuación combinar los campos magnéticos procedentes de polos magnéticos diferentes en una secuencia para inducir una mezcla homogénea de las partículas sobre sustancialmente todo el volumen de la cámara de reacción.

Por claridad, y al contrario de lo que podría esperarse a primera vista, las "flechas" que representan la polaridad de los polos magnéticos en las figuras 5(a) y 5(b) (y en todas las demás figuras), no son fijas. En la práctica, estas polaridades están cambiando continuamente de dirección en el tiempo. La dirección de las flechas "fija", representa "en su lugar", la polarización "relativa" de los electroimanes durante la manipulación de las partículas.

En otra realización y, tal como se muestra en la figura 6, se da a conocer un dispositivo para manipular y mezclar partículas magnéticas donde los polos magnéticos forman un cuadripolo que comprende (i) un primer par de polos magnéticos -1-, -1'- enfrentados entre sí formando un entrehierro divergente; y (ii) un segundo par de polos magnéticos -10-, -10'- enfrentados entre sí y que forman un entrehierro divergente, con los extremos grandes de los entrehierros divergentes de los primer y segundo pares de polos enfrentados entre sí; y (iii) una cámara de reacción -2- que es parte de una red fluidica, que tiene una cavidad con partes divergentes de la cámara de reacción que están dispuestas de forma codivergente en los entrehierros divergentes entre los polos.

Está claro que la configuración de cuadripolo es una versión más sofisticada de las realizaciones previas que permite efectos más mejorados. Más específicamente, el gradiente de campo magnético -5-, en lugar de ser sustancialmente axial (simetría axial) como en el caso de la configuración de dos polos descrita anteriormente, tiene una simetría sustancialmente "esférica". La posibilidad de tener un gradiente de campo magnético "multidireccional" inducido por más de un par de polos magnéticos, ofrece la posibilidad de mover la posición de los máximos del gradiente de campo magnético siguiendo configuraciones más "ricas", tal como se muestra en la figura 7 (a)-(d). En particular, mediante el accionamiento apropiado y secuencial del campo magnético -4- inducido desde cada polo magnético de la configuración multipolo (cuadripolo), se puede mover la posición de los máximos del gradiente de campo magnético a través del volumen de la cámara de reacción, de manera que la posición secuencial de estos máximos cubra todo el volumen de la cámara de reacción.

Las figuras 7(a)-(d) representan esquemáticamente el diferente accionamiento de los polos magnéticos -4- y las correspondientes configuraciones de partículas magnéticas, que corresponden, de hecho, a la posición de los máximos del gradiente de campo magnético. Un efecto obtenido mediante dicho proceso de manipulación magnética es que, moviendo secuencialmente las partículas, por ejemplo, siguiendo la configuración de las figuras 7(a)-(d), el movimiento de las partículas cubrirá sustancialmente todo el volumen de la cámara de reacción, tal como se muestra en la figura 8, garantizando de este modo una potente mezcla con el medio líquido circundante.

A partir de lo anterior, un primer elemento clave en el mecanismo de accionamiento es un accionamiento del campo magnético "de base" -4- de los polos magnéticos que es un campo magnético con una polaridad y una amplitud que varían con el tiempo. Un ejemplo típico de este campo de accionamiento es un campo magnético oscilante como el de la ecuación (1). En general, dicho campo de accionamiento magnético de base presenta una forma sustancialmente rectangular, sinusoidal, de diente de sierra, triangular asimétrica o triangular simétrica o cualquier combinación de dichas formas.

A partir de lo anterior, un segundo elemento clave en el mecanismo de accionamiento es que los polos magnéticos son accionados siguiendo cierta secuencia para inducir variaciones continuas en el tiempo de la posición de los máximos del gradiente de campo magnético a través de todo el volumen de la cámara de reacción, haciendo de este

modo que las partículas en utilización estén en movimiento dinámico relativo cubriendo todo el volumen de la cámara de reacción.

Por consiguiente, por "secuencias de campo que tienen polaridad e intensidad que varían en el tiempo" se entiende la composición del campo de accionamiento "de base" en cada polo magnético junto con su variación secuencial para inducir el movimiento de las partículas a través del volumen de la cámara de reacción. En la práctica de hecho, se pueden descomponer las secuencias de campo que accionan cada polo magnético en dos componentes principales: (1) un componente de campo de accionamiento de base que tiene una polaridad y una amplitud que varían con el tiempo y (2) una variación secuencial de este campo de accionamiento de base para inducir el desplazamiento de las partículas a través de la cámara de reacción y afectar, de este modo, a la mezcla de las partículas.

Por consiguiente, en la práctica el componente de campo de accionamiento de base tendrá el papel de romper los agregados de cadenas de partículas y, de este modo, garantizar que grandes superficies de las partículas estén en contacto con el medio líquido circundante mientras que la variación secuencial de este campo de accionamiento de base inducirá el movimiento continuo de la "niebla" de partículas sobre toda la cámara de reacción garantizando de este modo una exposición homogénea de las partículas "desagregadas" sobre sustancialmente todo el volumen de la cámara de reacción.

En consecuencia, un efecto deseado obtenido mediante el mecanismo de accionamiento es que, durante su movimiento, las partículas no se desplazan como un agregado compacto sino que se están moviendo en su lugar como una niebla de partículas dando como resultado una fuerte mejora del contacto entre las superficies de las partículas y el medio líquido circundante.

En el mecanismo de accionamiento descrito anteriormente, la variación en el tiempo del campo de accionamiento de base, así como el accionamiento secuencial de los polos magnéticos es una variación no periódica pero es preferentemente una variación periódica. En el caso periódico, las frecuencias del campo de base (f_1) y la secuencia de accionamiento (f_2) pueden ser, en la práctica, diferentes ($f_1 \neq f_2$). Para alcanzar los efectos de mezcla de partículas descritos anteriormente, la frecuencia de la secuencia de accionamiento (f_2) es menor que o, como máximo, igual a la frecuencia del campo de base (f_1). En general, para alcanzar los efectos de mezcla de partículas descritos anteriormente, la variación del campo en el tiempo del campo de base (es decir las variaciones en el tiempo de la amplitud y la polaridad en cada polo magnético) es, preferentemente, mayor o, como mínimo, igual al accionamiento en el tiempo secuencial de los polos magnéticos.

Las variaciones en el tiempo del campo magnético, definidas por las frecuencias f_1 y f_2 , son del orden de 0,1 Hz a 1000 Hz y preferentemente entre 1 Hz y 500 Hz, u otras escalas temporales que caracterizan variaciones no periódicas.

Un efecto ventajoso obtenido mediante el mecanismo de accionamiento es que las partículas presentarán un movimiento dinámico que sustancialmente cubre todo el volumen de reacción durante cierto periodo de tiempo. Las partículas cubrirán de forma homogénea, como mínimo, el 60% del volumen de la cámara de reacción y, preferentemente, entre el 80% y el 99% del volumen de la cámara de reacción. Esta cobertura homogénea se conseguirá en un periodo de tiempo que es determinado por el tiempo (o la frecuencia) de accionamiento de la secuencia de los polos magnéticos. En la práctica, la mezcla homogénea se consigue en un periodo de tiempo entre 10 s y 10 ns y preferentemente 1 s y 10 ms. En realizaciones preferentes y dependiendo de los parámetros del campo de accionamiento, la homogeneidad de mezcla cubrirá el 99% de la cámara de reacción a lo largo del tiempo.

Para alcanzar los efectos deseados, las partículas magnéticas en utilización son, preferentemente, inicialmente partículas magnéticas desimantadas que desarrollan una respuesta de histéresis ferromagnética específica a un campo magnético externo. Más específicamente, las partículas tienen un campo coercitivo entre 15,92 y 79,58 kAm (200 y 1000 Oe). Al contrario de lo que se ha descrito en la técnica anterior donde las partículas en utilización son preferentemente "superparamagnéticas", se ha descubierto que el hecho de que las partículas presenten una respuesta de histéresis (ferromagnética) específica es una condición clave para conseguir los efectos de mezcla. De hecho, tal como se ha descrito anteriormente, el mecanismo de accionamiento de partículas consta de la utilización preferentemente de un campo "oscilante" de alta frecuencia como componente de campo magnético de accionamiento "de base" en cada polo magnético para controlar y descomponer los agregados de partículas. A dichas elevadas frecuencias de variación ($f_1 > 1$ Hz), el hecho de que las partículas presenten una respuesta de histéresis les permite seguir dichas "rápidas" variaciones de campo girando físicamente con las oscilaciones de campo. Esta rotación de partículas en un campo magnético oscilante de alta frecuencia (campo que tiene una polaridad y una intensidad que varían en el tiempo) está en el origen del proceso de desagregación de las partículas.

Además, para alcanzar los efectos deseados, se ha descubierto que, preferentemente, las partículas en utilización son manipuladas con un campo magnético "oscilante" (campo que tiene una polaridad y una intensidad que varían en el tiempo) con una amplitud (intensidad de campo máxima) que es menor que el campo coercitivo de las partículas en utilización.

Por consiguiente, las partículas en utilización preferentemente se sintetizan con propiedades siguiendo el proceso dado a conocer en la solicitud de patente WO2006/056579, incorporada en el presente documento en su totalidad como referencia.

5 Se da a conocer un procedimiento de integración de todos los conceptos de manipulación y mezcla de partículas magnéticas en entorno microfluídico descritos anteriormente. El procedimiento consta de la utilización de una cámara de reacción que es parte de una red microfluídica, en el que: como mínimo, un par de polos electromagnéticos se enfrentan entre sí a través de la cámara de reacción, comprendiendo el procedimiento: **(a)** aplicar secuencias de campo magnético que tienen polaridad e intensidad que varían en el tiempo desde cada uno de los polos electromagnéticos, **(b)** combinar el campo magnético procedente de cada polo magnético para inducir variaciones continuas en el tiempo de la posición de los máximos del gradiente de campo magnético a través de todo el volumen de la cámara de reacción; y **(c)** hacer que las partículas estén en movimiento traslacional y rotacional relativo cubriendo todo el volumen de la cámara de reacción.

15 Para obtener el efecto deseado, los polos magnéticos están, preferentemente, acoplados magnéticamente entre sí mediante un circuito magnético "cerrado". Un ejemplo típico de dicho circuito magnético se ilustra en las vistas en perspectiva de la figura 9. De hecho, tal como se muestra en la figura 10(a), para la configuración de cuadripolo de la figura 6, cada polo magnético -1- -1'-, -10- --10'- está conectado a un electroimán formado por un núcleo magnético -6- con una bobina -7-. Además, cada núcleo magnético -6- está en contacto con una parte de núcleo magnético "de base" -6'- en forma de un "8". La forma de "8" del núcleo magnético de base -6'- garantiza que la configuración de cada par de polos magnéticos forme un circuito magnético cerrado garantizando de este modo una circulación más potente del flujo magnético durante el proceso de accionamiento como la descrita mediante la ecuación -1-. Además, el hecho de que cada par de polos magnéticos forme un circuito magnético "cerrado" es esencial para enfocar (concentrar) fuertemente el flujo magnético y el gradiente de flujo magnético en la cámara de reacción. Además, esta condición es particularmente preferente para garantizar el proceso y los efectos de la mezcla, tal como se ha descrito anteriormente.

La figura 9(b) muestra una forma más sofisticada de la configuración de cuadripolo y circuito magnético de la figura 9(a), con una matriz de configuraciones de cuadripolo para garantizar el accionamiento paralelo y manipular partículas magnéticas en cuatro cámaras de reacción adyacentes diferentes. El mismo diseño y construcción de una matriz de cuadripolo puede extenderse para manipular partículas magnéticas en un gran número de cámaras de reacción.

Otro aspecto se refiere a un chip microfluídico que integra los diferentes aspectos geométricos de la manipulación y mezcla de partículas magnéticas descritas anteriormente. Por consiguiente, un chip microfluídico comprende: **(a)** una cámara de reacción -2- que es parte de una red fluídica, que contiene las partículas en utilización en suspensión y que tiene, como mínimo, una cavidad con partes divergentes/convergentes, **(b)** canales de entrada -12- y de salida -13-, para suministrar líquidos al interior y desde la cámara de reacción y conectados respectivamente a los segmentos estrechos de las partes divergentes/convergentes, **(c)** una estructura de accesos -14- situada a ambos lados de la cámara de reacción -2- para recibir polos magnéticos que son parte de un circuito magnético externo y en el que los polos magnéticos están dispuestos geométricamente de una manera que sean codivergentes/coconvergentes con partes divergentes-convergentes de la cámara de reacción.

Además de la cámara de reacción, el chip microfluídico está configurado para incluir uno o más de diversos componentes que estarán presentes en cualquier dispositivo dado dependiendo de su utilización. Estos componentes incluyen, aunque sin limitación a los mismos, orificios de entrada de muestras; módulos de introducción o recogida de muestras; módulos de manipulación de células (por ejemplo, para lisis de células (incluyendo la lisis por microondas de células, tal como se describe en el presente documento), eliminación de células, concentración de células, separación o captura de células, crecimiento de células, etc.; módulos de separación, por ejemplo, para electroforesis, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico/afinidad (captura y liberación) etc.; módulos de reacción para reacciones químicas o biológicas o alteración de la muestra, incluyendo amplificación del analito diana (por ejemplo, cuando el analito diana es ácido nucleico, técnicas de amplificación son útiles.

55 Todas las realizaciones y aspectos descritos anteriormente tienen como principal objetivo mejorar la velocidad de reacción entre cualesquiera sustancias diana dentro de un medio líquido y las superficies de las partículas suspendidas en dicho líquido. Una mezcla eficaz, tendrá de hecho un fuerte impacto sobre el rendimiento de cualquier proceso bioquímico, tal como la extracción o (y) detección de biomoléculas, por ejemplo (aunque sin limitación a los mismos) ácidos nucleicos y proteínas. Además, un elemento clave del concepto de manipulación de partículas magnéticas dado a conocer es que el procedimiento de manipulación de partículas puede readaptarse o ajustarse en correspondencia con el proceso bioquímico en consideración.

Habitualmente la superficie de la partícula magnética está funcionalizada bioquímicamente mediante ligandos específicos para el sondeo y la manipulación de biomoléculas y sustancias químicas utilizando técnicas bien conocidas. Para esto, la superficie de las partículas magnéticas comprende, por ejemplo, un grupo funcional o un ligando que es capaz de unirse a una molécula diana o a una clase de moléculas diana. Potenciales grupos

funcionales comprenden, aunque sin limitación a los mismos, ácidos carboxílicos, ácidos hidroxámicos, compuestos no adhesivos, aminas, isocianatos y cianuros. Potenciales ligandos comprenden, aunque sin limitación a los mismos, proteínas, ADN, ARN, enzimas, materiales hidrófobos, material hidrófilo y anticuerpos. De forma más general, ejemplos de ligandos adecuados para utilización en la presente invención incluyen, aunque sin limitación a los mismos, moléculas y macromoléculas, tales como proteínas y fragmentos de proteínas, péptidos y polipéptidos, anticuerpos, receptores, aptámeros, enzimas, sustratos, análogos de sustrato, ribozimas, proteínas estructurales, ácido nucleicos, tales como ADN y ARN e híbridos de ADN/ARN, sacáridos, lípidos, diversas sustancias hidrófobas o hidrófilas, materiales lipófilos, quimioatrayentes, enzimas, hormonas, fibronectina y similares. Dichas moléculas y macromoléculas pueden ser de origen natural o sintéticas. El término ligando también puede incluir entidades más grandes, tales como células, tejidos, microorganismos enteros, virus, etc.

Utilizando las partículas funcionalizadas de este modo, el proceso de mezcla y separación presenta una particular utilidad en diversos procedimientos de laboratorio y clínicos que implican reacciones de unión por afinidad bioespecífica para separaciones. Dichas reacciones de unión por afinidad bioespecífica pueden emplearse para la determinación o el aislamiento de una amplia gama de sustancia diana en muestras biológicas. Los ejemplos de sustancias diana son, células, componentes de células, subpoblaciones de células (tanto eucariotas como procariotas), bacterias, virus, parásitos, antígenos, anticuerpos específicos, secuencias de ácido nucleico y similares.

Además, el proceso de mezcla y separación de la presente invención tiene una utilización particular en procedimientos de detección incluyendo, aunque sin limitación a los mismos, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR en tiempo real, reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), y amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA).

Un ejemplo de utilización de los dispositivos/procedimiento de manipulación y mezcla de partículas magnéticas dados a conocer se ilustra en la figura 11. Esta figura ilustra las diferentes etapas de un inmunoensayo en sándwich en el que: **(a)** En una primera etapa (figura 11 (a)) las partículas revestidas con sondas de captura específicas se mezclarán para cubrir de forma homogénea la cámara de reacción, tal como se ha descrito anteriormente en las figuras 7 y 8. En esta etapa, la muestra que contiene las biomoléculas diana es empujada con un flujo de líquido a través de la cámara de reacción. Para ese fin las geometrías de la cámara de reacción/la "covariación" del polo magnético garantizarán (tal como se muestra en la figura 3 y la figura 4) la homogeneidad de las condiciones de mezcla de las partículas magnéticas con el flujo de líquido. Todas estas condiciones cuando se ajustan ordenadamente permiten una potente eficiencia de captura de las dianas sobre las superficies de las partículas. **(b)** Después de una etapa de lavado, tal como se describe en la figura 11 (b), un volumen definido (sustancialmente igual al volumen de la cámara de reacción) de un reactivo que contiene sondas de detección se inyecta en la cámara de reacción. En este caso, las partículas pueden mezclarse de nuevo de forma homogénea con el medio circundante permitiendo la eficiente captura de la sonda de detección sobre las superficies de las partículas. **(c)** Después de una etapa de lavado, tal como se describe en la figura 11 (c) un volumen definido (sustancialmente igual al volumen de la cámara de reacción) de un sustrato de detección de reactivos se inyecta en la cámara de reacción. En este caso, las partículas pueden ponerse en contacto y mezclarse de forma homogénea con el medio circundante permitiendo la interacción eficiente entre el sustrato y las sondas de detección sobre las superficies de las partículas. Al contrario que pruebas de inmunoensayo clásicas donde la señal de detección es inducida principalmente por difusión, el proceso de mezcla de los inventores de la presente invención permite una potente interacción entre el sustrato de detección y las superficies de las partículas que cubren todo el volumen de la cámara de reacción. Una gran mejora de la señal de detección puede generarse, por lo tanto, de esta manera permitiendo la detección de una baja concentración de moléculas diana dentro de la muestra de partida (como sangre o plasma). Tal como se muestra en la figura 11(c), durante la detección, las partículas pueden ser arrastradas (separadas) a los bordes de la cámara de reacción siguiendo la secuencia de la figura 7(b).

En una realización diferente de la utilización de manipulación y mezcla de partículas magnéticas, en lugar de tener un flujo continuo para capturar dianas a partir de un gran volumen de muestra (tal como se describe, por ejemplo, en la primera etapa del ejemplo 11 (a) anterior), puede conseguirse una concentración diana de una manera más controlada en una condición estática (sin flujo). Esta realización, ilustrada esquemáticamente en la figura 11, se basa en la utilización del concepto de "inyección pulsada" (en lugar de flujo continuo) de la muestra en la cámara de reacción seguido por una mezcla homogénea de las partículas. Más específicamente, en una primera etapa (figura 11, parte superior) las partículas son atraídas a las paredes de la cámara de reacción (utilizando la secuencia de accionamiento de la figura 7(b)) y retenidas mientras un volumen definido de la muestra, que no superará el volumen de la cámara de reacción, es inyectado. En una segunda etapa (figura 11 parte inferior), las partículas revestidas con una sonda de captura específica se mezclarán para cubrir de forma homogénea la cámara de reacción, tal como se ha descrito anteriormente en la figura 8, pero sin ningún flujo. Después de la mezcla de un periodo de tiempo definido, las partículas serán atraídas de nuevo a las paredes de la cámara de reacción y el nuevo volumen de muestra será inyectado en la reacción y a continuación será mezclado. Este proceso se repetirá de manera secuencial hasta que todo el volumen de muestra se mezcle con las partículas magnéticas.

Una de las ventajas de dicho modo de "inyección pulsada/mezcla" es que se evitará tratar con las restricciones de manipulación de partículas magnéticas en una condición de flujo continuo que es en realidad muy difícil de

configurar. Además, al contrario que el caso de flujo continuo donde el tiempo de contacto sigue siendo relativamente extremadamente corto, el tiempo de mezcla puede estar más fácilmente controlado en un modo pulsado y adaptarse en correspondencia con las moléculas diana y la utilización final.

- 5 Los siguientes ejemplos describen además en detalle la manera y el proceso de utilización de la presente invención. Los ejemplos deben considerarse ilustrativos pero no limitantes de la presente invención. Todas las manipulaciones que se dan en los ejemplos son a temperatura ambiente a no ser que se indique lo contrario.

Ejemplo 1 de mecanismo de accionamiento

- 10 La secuencia de accionamientos de la figura 7, es una ilustración de cómo las partículas magnéticas, mientras los polos magnéticos son accionados utilizando un campo magnético con variación en el tiempo (amplitud y polaridad), se utiliza como secuencia de base, pueden moverse siguiendo la combinación del campo magnético procedente de cada polo magnético. Durante este movimiento, las partículas cubrirán sustancialmente todo el volumen de la
15 cámara de reacción como una niebla de partículas garantizando de este modo la mezcla. Aunque representadas como secuencias “discontinuas”, las secuencias de las partículas, tal como se muestra en la figura 7 pueden conseguirse con un “campo magnético giratorio” siguiendo las secuencias de accionamiento de los polos magnéticos:

$$\begin{aligned} \text{Polo 1 y 10': } B &= B_0 \sin(ft) \\ \text{Polo 1' y 10: } B &= B_0 \sin(ft + \pi/2) \end{aligned} \quad (3)$$

- 20 En la ecuación (3) el accionamiento de secuencia de base en cada polo magnético es un campo oscilante mientras que el proceso de accionamiento está garantizado por un desplazamiento de fase de $\pi/2$ entre los polos magnéticos acoplados de forma diagonal. En esta configuración los campos de accionamiento de base y de secuencia tienen la misma frecuencia f .

- 25 En el accionamiento según las secuencias de la ecuación (3), pueden distinguirse dos regímenes de partículas: un régimen de baja frecuencia y uno de alta frecuencia.

- 30 A baja frecuencia habitualmente para $f < 5$ Hz, las partículas girarán de forma relativamente “lenta” y las partículas se moverán a través del volumen de reacción produciendo habitualmente las secuencias, tal como se muestra esquemáticamente en la figura 7. La particularidad de este régimen es que durante su movimiento desde una configuración de los polos magnéticos a la otra (véase la figura 7), las partículas tendrán tiempo suficiente para “agregarse” en cadenas magnéticas más largas. Para frecuencias superiores a 1 Hz, las partículas mostrarán una
35 dinámica rápida y fuerte que cubre sustancialmente todo ($> 90\%$) el volumen de reacción. Sin embargo, en este régimen de un campo magnético giratorio las partículas aún se agregaban “relativamente”.

- Un estado de partículas más desagregado se obtendrá en última instancia a frecuencias más elevadas del campo giratorio $f > 5$ Hz. En este régimen, en su lugar, el comportamiento de las partículas es drásticamente diferente dado que la rápida rotación de las partículas magnéticas no proporcionará tiempo suficiente para la formación de las
40 cadenas, lo que hace que las cadenas de partículas se descompongan en estructuras similares a cadenas de partículas más pequeñas con un tamaño que disminuye con la frecuencia del campo. Como una diferencia con el régimen de baja frecuencia, la secuencia de la figura 7 (b) no se observará dado que las partículas no tendrán tiempo de extenderse a lo largo de la diagonal de la cámara de reacción. Lo que ocurre a alta frecuencia de hecho, es que las partículas serán atraídas y confinadas en las paredes de la cámara de reacción. La figura 13 (a) muestra un video del comportamiento de las partículas a altas frecuencias.

- Para superar este problema, un descubrimiento es reducir la amplitud mientras se incrementa la frecuencia del campo giratorio aplicado en combinación con la utilización de partículas ferromagnéticas. La reducción de la
50 amplitud del campo magnético de hecho permite expandir las partículas más sobre el volumen de la cámara de reacción debido a la reducción de las fuerzas del gradiente magnético y las fuerzas dipolares repelentes entre las partículas giratorias. Sin embargo, dado que la reducción de las fuerzas magnéticas ralentizará el movimiento de las partículas, se requiere un campo de mayor frecuencia para propulsar adicionalmente el movimiento de las partículas. A dichas elevadas frecuencias habitualmente entre superior a 20 Hz y preferentemente en el intervalo de 100 Hz a 500 Hz, la utilización de partículas ferromagnéticas es clave, dado que la “anisotropía magnética” de estas partículas
55 hace que se muevan y sigan las variaciones del campo. La figura 13 (b), muestra la cobertura homogénea de las partículas en la cámara de reacción obtenidas a frecuencias de rotación elevadas (alrededor de 300 Hz). Durante esta mezcla, las partículas se mueven con fuerza a través de la cámara de reacción permitiendo de este modo una mezcla potente y eficaz.

- 60 Es importante señalar aquí que los valores de frecuencias dados en este ejemplo son valores típicos justamente para indicación, obtenidos con partículas específicas utilizadas en experimentos (partículas MagNA Pure LC de Roche Diagnostics). La utilización de otros tipos de partículas afectará ciertamente a los límites de frecuencias de diferentes regímenes y comportamientos de partículas, tal como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 2 de mecanismo de accionamiento

La ecuación (4) describe otras secuencias de accionamiento para conseguir la mezcla.

$$\begin{aligned} \text{Polo 1 y 10': } B &= B_0 \sin(f_1 t) \sin(f_2 t) \\ \text{Polo 1' y 10: } B &= B_0 \sin(f_1 t) \sin(f_2 t + \pi/2) \end{aligned} \quad (4)$$

En esta secuencia, de hecho, el primer componente de oscilación ($\sin(f_1 t)$) no es nada más que el campo de accionamiento de base a una frecuencia f_1 de los polos magnéticos, mientras que el segundo término define la secuencia de accionamiento que mueve la "niebla" de partículas en forma de rotación con una frecuencia f_2 . La secuencia de la ecuación (4) permite en particular resolver la aglomeración de partículas descrita anteriormente (en el ejemplo 1) en un campo giratorio de baja frecuencia de la ecuación (3). Por ejemplo, haciendo girar a las partículas a una frecuencia $f_2 = 1$ Hz, las cadenas de partículas se descompondrán debido a las rápidas oscilaciones del campo de base $f_1 > 10$ Hz.

Ejemplo 3 de mecanismo de accionamiento

La ecuación (5) describe otra secuencia de accionamiento para conseguir la mezcla, donde la frecuencia del campo magnético giratorio de la ecuación (1) está "modulada".

$$f = f_0 + f_1 \sin(\Omega t) \quad (5)$$

El descubrimiento es que modular la frecuencia entre un régimen de baja frecuencia y el régimen de altas frecuencias garantiza de este modo una mezcla eficiente. Mediante la elección apropiada de la frecuencia de modulación (Ω), cuando puede equilibrar entre los dos regímenes: mezcla homogénea con aglomeraciones a frecuencias más bajas y la mezcla "no homogénea" con estructura de partículas de niebla a frecuencias más elevadas. Esta manera de "modular" la frecuencia del campo giratorio es particularmente importante para líquidos altamente viscosos donde la mezcla homogénea es difícil de conseguir incrementando solamente la frecuencia de oscilación, tal como se describe en el ejemplo 1.

Es obvio para los expertos en la materia que la modulación de la frecuencia puede realizarse mediante otras formas, como por ejemplo una señal "cuadrada" donde se conmuta entre un valor de frecuencia alto y un valor de frecuencia bajo. Cada valor puede mantenerse durante cierto tiempo que depende esencialmente de la viscosidad del líquido, para garantizar una mezcla homogénea.

Cabe hacer hincapié aquí de nuevo en que las partículas en utilización son preferentemente ferromagnéticas para permitir que las partículas se muevan y giren a alta frecuencia.

Ejemplo 4 de mecanismo de accionamiento

Aunque los ejemplos anteriores se basan en utilizar un "campo magnético giratorio", también puede utilizarse una secuencia lineal de accionamiento de la niebla de partículas para mezclar y alcanzar un estado homogéneo. Un ejemplo típico de ese modo de accionamiento lineal puede conseguirse moviendo en primer lugar las partículas al borde externo, tal como se muestra en la figura 7(b), utilizando la secuencia de accionamiento:

$$\begin{aligned} \text{Polo 1 y 1': } B &= B_0 \sin(\omega t) \\ \text{Polo 10 y 10': } B &= B_0 \sin(\omega t + \pi) \end{aligned} \quad (6)$$

En esta fase, las partículas pueden moverse hasta la esquina izquierda (parte estrecha) de la cámara de reacción mediante la secuencia:

$$\begin{aligned} \text{Polo 1 y 1': } B &= B_0 \sin(\omega t) \\ \text{Polo 10 y 10': } B &= B_0 \sin(\omega t + \pi/2) \end{aligned} \quad (7)$$

Por simetría un desplazamiento hacia la esquina derecha (parte estrecha) de la cámara de reacción puede conseguirse mediante la secuencia:

$$\begin{aligned} \text{Polo 1 y 1': } B &= B_0 \sin(\omega t + \pi/2) \\ \text{Polo 10 y 10': } B &= B_0 \sin(\omega t) \end{aligned} \quad (8)$$

Con un desplazamiento secuencial entre las tres configuraciones anteriores siguiendo las secuencias: (6) → (7) →

(6) → (8) a una velocidad determinada, se puede conseguir una mezcla homogénea a lo largo del tiempo.

En la práctica, se consiguen procesos de mezcla mejores no solamente a través de un modo giratorio o uno lineal, sino que habitualmente una mezcla de ambos modos es preferente.

En el presente documento en estos ejemplos, la elección de un campo “sinusoidal” como accionamiento de base es solamente para su formulación analítica práctica con una ecuación. “Secuencias de base” de accionamiento más complejas que tienen polaridad e intensidad que varían en el tiempo causarán los mismos efectos.

Ejemplo 5 de utilización del concepto y el dispositivo de mezcla

En este ejemplo, el dispositivo y procedimiento de partículas magnéticas dados a conocer se utilizan para extracción de ADN de cultivo de bacterias (E-coli) con un plásmido insertado. Para la extracción, se utiliza el kit MagNA Pure LC de Roche Diagnostics (Suiza). Una particularidad de este kit es que las partículas magnéticas presentan una respuesta ferromagnética con un campo coercitivo de aproximadamente 200 Oe.

Para la preparación de la muestra, 200 µl del cultivo de bacterias en PBS con una concentración de aproximadamente 2×10^8 células / ml se mezclan con: (a) 400 µl de tampón de unión de lisis, (b) 100 µl de isopropanol, y (c) 100 µl de Proteinasa-K. El volumen de extracción total es, por lo tanto, 800 µl.

Para el ensayo, se utiliza un chip microfluídico con la disposición de la figura 11. La cámara de reacción en este chip tiene las siguientes dimensiones: H = 0,25 mm, L = 0,5 mm y una profundidad de 1 mm. El volumen total de la cámara de reacción es, por lo tanto, de aproximadamente 25 µl. En esta cámara de reacción aproximadamente 50 µl de las partículas de vidrio del kit se separan y son retenidos en la cámara de reacción.

El procesamiento de las muestras y los reactivos a través del chip se realizan siguiendo el modo de “inyección por pulsos” descrito anteriormente y donde las partículas se mezclan de forma homogénea sobre la cámara de reacción durante un periodo de 2 s seguido por una separación e inyección de líquido de aproximadamente 1 s. Aproximadamente 3 segundos son necesarios para procesar 25 µl del volumen de muestra que es equivalente a un caudal de procesamiento de 0,5 ml/min.

La etapa de lavado se realiza utilizando los tres reactivos de lavado del kit con 300 µl de volumen de cada uno. El lavado se realiza combinando tanto el modo de flujo continuo como el modo de “inyección por pulsos”. Menos de 2 minutos son necesarios para realizar todas las etapas de lavado necesarias. Para la elución del ADN, un volumen del tampón de elución del kit sustancialmente igual al volumen de la cámara de reacción (~ 30 µl) y mezcla de forma homogénea durante aproximadamente 3 minutos.

Para determinar los beneficios de la mezcla homogénea, el rendimiento de extracción se compara con la extracción manual estándar (como referencia) y la mezcla no homogénea en un campo magnético giratorio de alta frecuencia, tal como se describe en el ejemplo 1 y se muestra en la figura 13 (a). Para el rendimiento de los experimentos de extracción de ADN, se utilizó la absorbancia óptica, con los siguientes resultados:

	Cantidad total de ADN (µg)	Pureza (DO 260/280)
Extracción manual	6	1,7
Mezcla homogénea	5,5	1,9
Mezcla no homogénea	1,2	1,6

A partir de estos resultados, puede verse el fuerte impacto del efecto de mezcla de partículas magnéticas propuesto en la mejora de la unión por afinidad entre las partículas y la molécula diana (ADN) en la muestra. De hecho, mientras que la extracción manual requiere aproximadamente 20 minutos para realizarla, aproximadamente 8 minutos son necesarios para extracción completa utilizando el procedimiento y el dispositivo de mezcla homogénea dados a conocer. Además, en la extracción manual, se utilizan aproximadamente 100 µl de suspensión de partículas mientras que solamente se utilizan 50 µl en la mezcla homogénea microfluídica. Tomando en consideración la cantidad relativamente grande de ADN que puede purificarse (hasta 10 µg) en un pequeño volumen de la cámara de reacción (25 µl) con la mezcla homogénea dada a conocer, tal como se da a conocer en el presente documento, es una clara expresión de la gran superficie disponible de partículas durante la mezcla demostrando la desagregación y la mezcla de partículas eficaz durante el ensayo. Otra demostración de la mezcla homogénea de partículas es el bajo rendimiento obtenido mediante mezcla no homogénea.

Ejemplo 6 de utilización del concepto y el dispositivo de mezcla

En este ejemplo el dispositivo y procedimiento de partículas magnéticas dados a conocer se utilizan para extracción de ADN de sangre completa humana. Para la extracción, se utiliza el kit MagNA Pure LC II de Roche Diagnostics

(Suiza) con el mismo proceso y protocolo que en el ejemplo 4.

Los resultados de la extracción muestran un rendimiento de entre 4-5 µg de ADN con un valor de DO entre > 1,7. Este ejemplo, demuestra la eficiente extracción de ADN del procedimiento de mezcla dado a conocer a partir de una muestra compleja como sangre completa.

Los expertos en la materia apreciarán que pueden configurarse diversas adaptaciones y modificaciones de las realizaciones preferentes que se acaban de describir sin alejarse del alcance de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones. Por lo tanto, debe entenderse que, dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, la presente invención, tal como se define en el dispositivo, puede ponerse en práctica de otra manera a como se describe específicamente en el presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo para mezclar partículas magnéticas en un medio líquido circundante y separar partículas magnéticas de un medio líquido, que comprende:
 - 5 (a) como mínimo, un par de polos electromagnéticos (1, 1') enfrentados entre sí a través de un entrehierro, divergiendo los polos enfrentados (1, 1') de forma continua desde un extremo estrecho del espacio hasta un extremo grande del espacio, los polos (1, 1') con el entrehierro son parte de un circuito electromagnético dispuesto para proporcionar un gradiente de campo magnético (5) en dicha región de entrehierro;
 - 10 (b) una red microfluídica y una cámara de reacción (2) que es una parte de la red microfluídica para contener dichas partículas magnéticas en suspensión, estando la cámara de reacción (2) situada en el entrehierro de dichos polos electromagnéticos, en el que la cámara de reacción (2) tiene extremos de entrada/salida para introducir y extraer el medio líquido en la cámara de reacción y de la misma, extendiéndose la cámara de reacción entre sus extremos a lo largo de dicho entrehierro, de modo que los extremos de la cámara de reacción estén en correspondencia con los extremos estrecho y grande del entrehierro,
 - 15 **caracterizado porque** dicha cámara de reacción (2) es una cavidad que tiene, como mínimo, una parte divergente dispuesta de forma codivergente en el entrehierro divergente entre los polos, en el que los extremos estrecho y grande de la cámara de reacción están conectados respectivamente a una entrada y una salida para suministrar líquidos al interior y desde la cámara de reacción (2).
- 20 2. Dispositivo, según la reivindicación 1, en el que durante la utilización del dispositivo, cada uno de los polos magnéticos (1, 1') es accionado con secuencias de campo magnético que tienen una polaridad y una amplitud que varían en el tiempo para inducir variaciones en el tiempo de la posición de los máximos del gradiente de campo magnético a través de la cámara de reacción, haciendo de este modo que las partículas en utilización estén en movimiento traslacional y rotacional relativo como una niebla de partículas que cubre sustancialmente todo el

25 volumen de la cámara de reacción.
3. Dispositivo, según la reivindicación 1 ó 2, en el que la proporción de la profundidad (H) del extremo grande con respecto a la longitud (L) de la parte divergente de la cámara de reacción (2) está entre 0,1 y 1.
- 30 4. Dispositivo, según la reivindicación 2, en el que la secuencia magnética que varía en el tiempo tiene sustancialmente una forma rectangular, sinusoidal, de diente de sierra, triangular asimétrica o triangular simétrica; o cualquier combinación de dichas formas.
5. Dispositivo, según la reivindicación 4, en el que la frecuencia de pulsación u oscilación del campo magnético está

35 entre 0,1 y 1000 ciclos por segundo y preferentemente entre 1 y 500 ciclos por segundo.
6. Dispositivo, según la reivindicación 1, en el que las partículas en utilización son partículas magnéticas desimantadas que desarrollan una respuesta de histéresis ferromagnética específica a un campo magnético externo.
- 40 7. Dispositivo, según la reivindicación 6, en el que las partículas tienen un campo coercitivo entre 3,98 y 795,9 kA/m (50 y 10.000 Oe), y preferentemente entre 15,9 y 79,6 kA/m (200 y 1000 Oe).
8. Dispositivo, según la reivindicación 6, en el que las partículas tienen un revestimiento superficial diseñado para unirse selectivamente a la partícula, como mínimo, con una molécula diana portada a la cámara de reacción por un

45 flujo de fluido.
9. Dispositivo, según la reivindicación 8, en el que el fluido fluye a través de la cámara de reacción (2) como un flujo oscilante o un flujo pulsado.
- 50 10. Dispositivo para mezclar partículas magnéticas en un medio líquido circundante y separar partículas magnéticas de un medio líquido, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende:
 - (a) una configuración de cuadripolo de polos magnéticos (1, 1'; 10, 10') que comprende (i) el, como mínimo, un par de polos magnéticos como un primer par de polos magnéticos (1, 1') enfrentados entre sí formando un entrehierro divergente; y (ii) un segundo par de polos magnéticos (10, 10') enfrentados entre sí formando un entrehierro

55 divergente, con los extremos grandes de los entrehierros divergentes de los primer y segundo pares de polos enfrentados entre sí; y
 - (b) la cámara de reacción (2) que es parte de una red fluídica, que tiene una cavidad con partes divergentes con los extremos grandes de las partes divergentes enfrentados entre sí; en el que
 - (c) las partes divergentes de la cámara de reacción (2) están dispuestas de forma codivergente en los entrehierros divergentes entre los polos (1, 1'; 10, 10').
60
11. Dispositivo, según cualquier reivindicación anterior en forma de un chip microfluídico que comprende:
 - (a) la cámara de reacción (2) para contener las partículas en suspensión, que es parte de una red microfluídica, teniendo la cámara de reacción, como mínimo, una cavidad con partes divergentes-convergentes;
 - 65 (b) aberturas situadas a ambos lados de la cámara de reacción (2) para recibir polos magnéticos que son parte de un circuito magnético externo, y que cuando están recibidos en las aberturas están dispuestos geométricamente de

una manera que sean codivergentes/coconvergentes con partes divergentes-convergentes de la cámara de reacción;

(c) canales microfluídicos en el chip que proporcionan entradas-salidas en los extremos opuestos de la cámara de reacción.

- 5
12. Dispositivo, según la reivindicación 11, en el que el volumen de la cámara de reacción (2) está entre 0,1 μ l y 500 μ l y preferentemente en el intervalo de 10 μ l a 100 μ l.
- 10
13. Utilización de dispositivos, según cualquier reivindicación anterior, para manipular y mezclar partículas magnéticas, en ciencias de la vida o para ensayos bioquímicos.

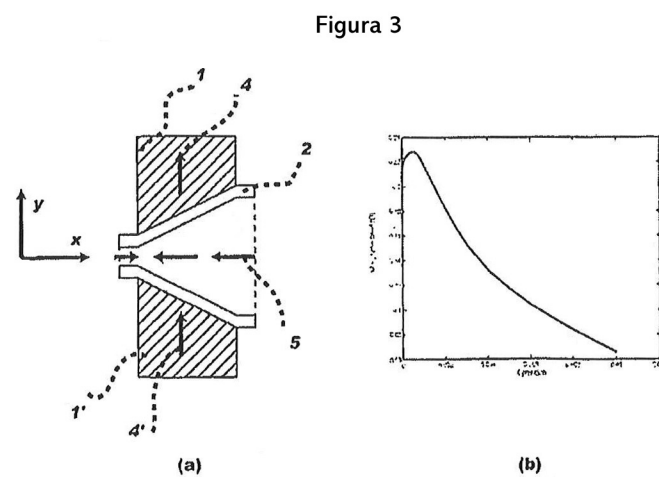
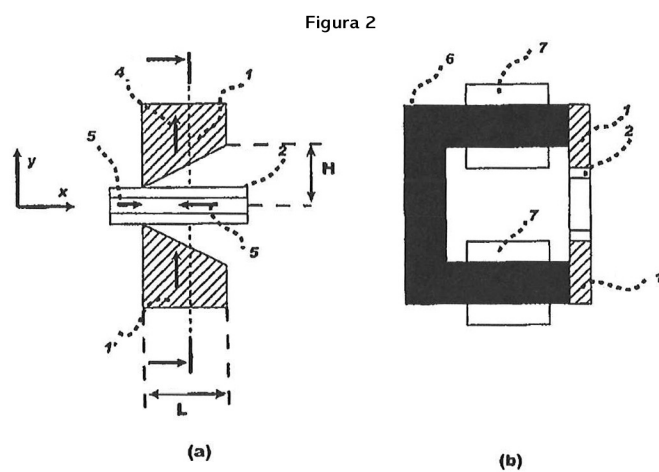
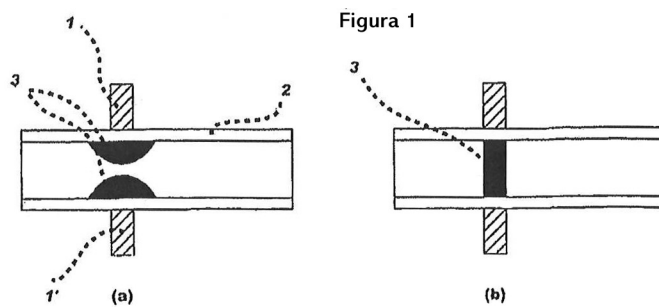


Figura 4

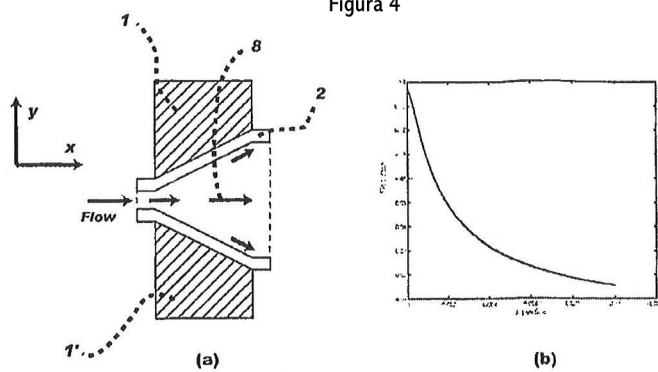
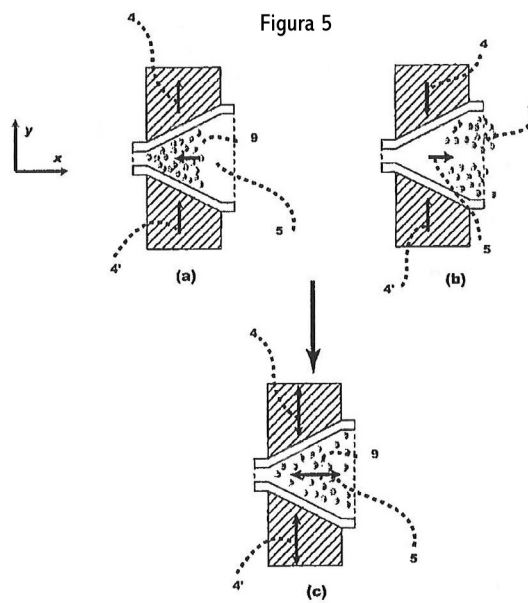


Figura 5



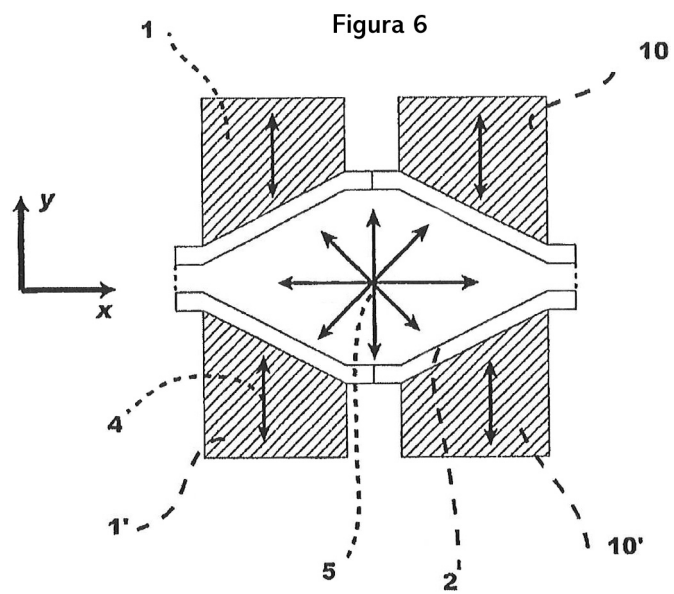


Figura 7

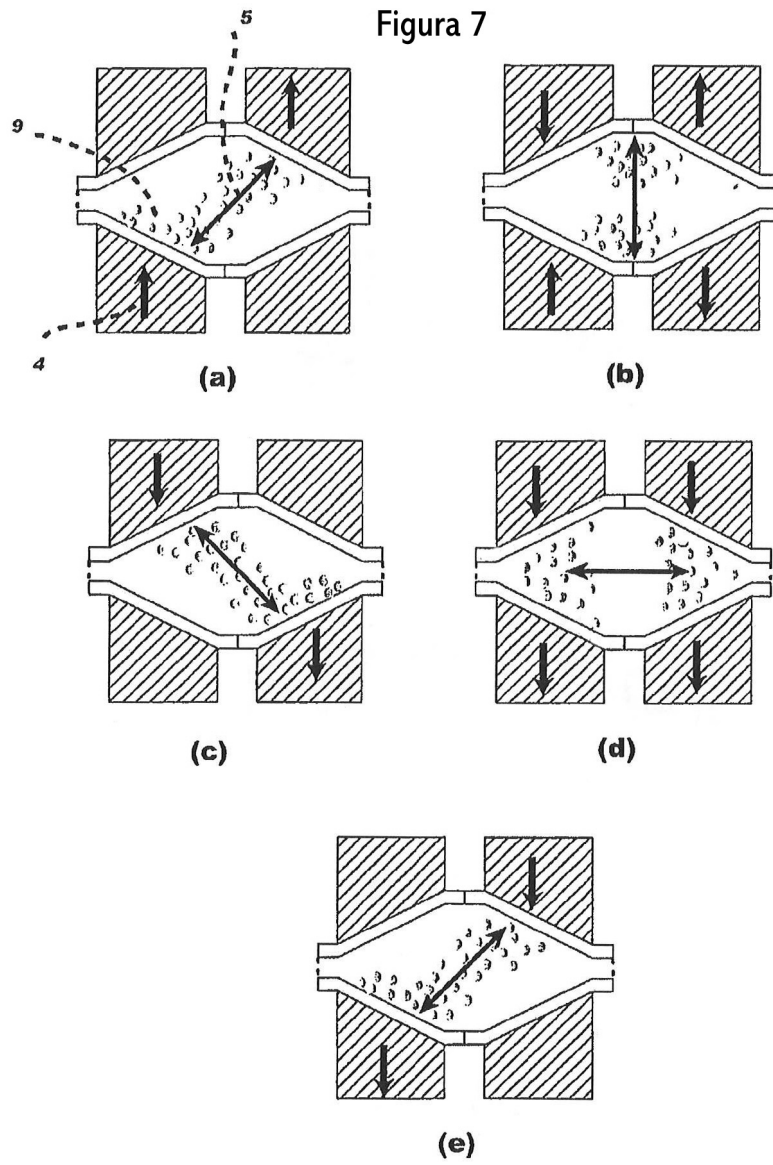


Figura 8

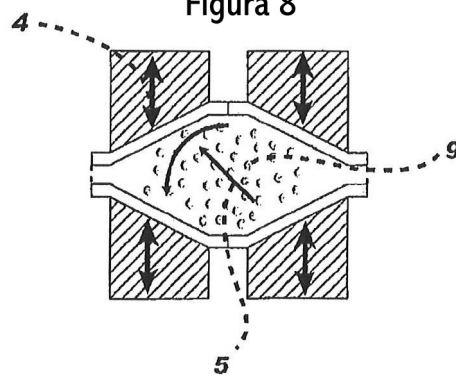


Figura 9

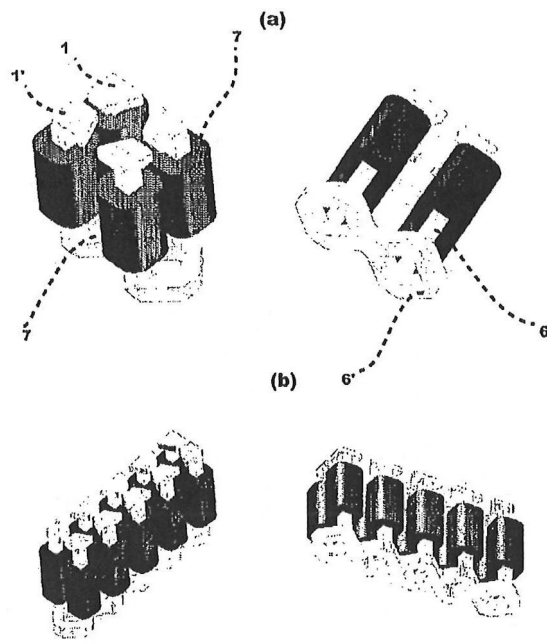


Figura 10

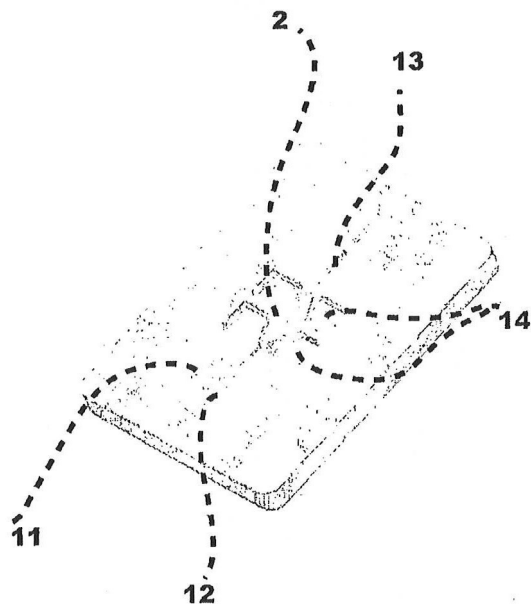


Figura 11

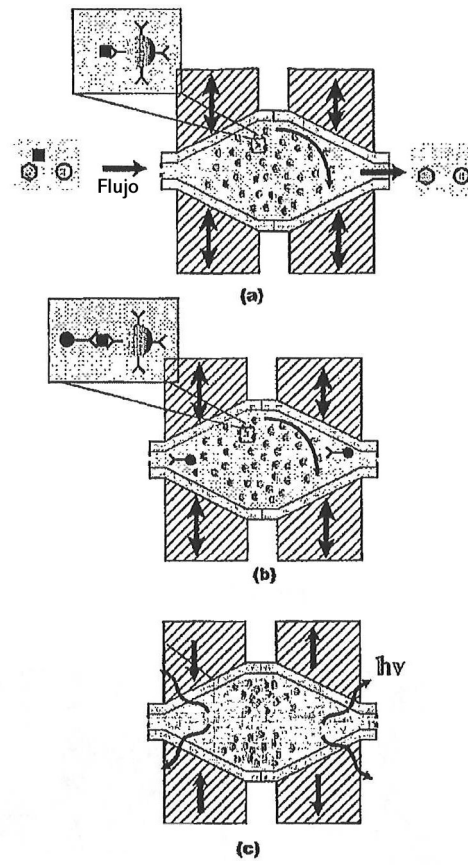


Figura 12

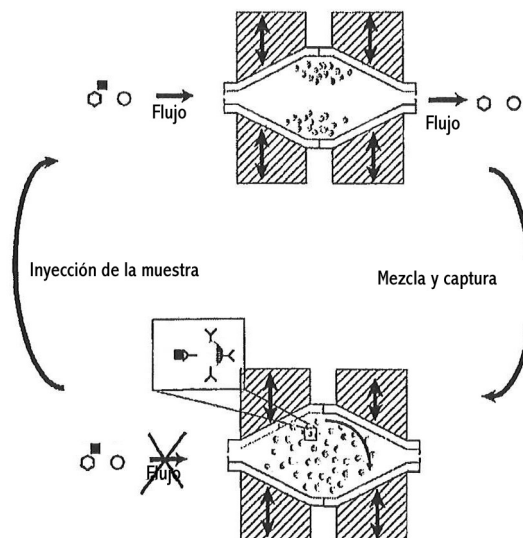
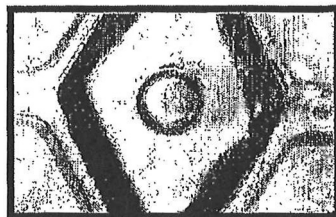
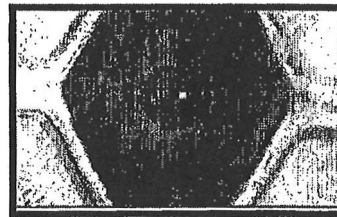


Figura 13



(a)



(b)