

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 559**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/00** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

**G01N 35/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.11.2010 PCT/US2010/057860**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2011 WO11063408**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2010 E 10832371 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2504701**

54 Título: **Método y aparato para realizar ensayos**

30 Prioridad:

**23.11.2009 US 263572 P**

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

**12.01.2018**

73 Titular/es:

**CYVEK, INC. (100.0%)  
2 Barnes Industrial Road South  
Wallingford, CT 06492, US**

72 Inventor/es:

**PUTNAM, MARTIN ANDREW y  
KERSEY, ALAN, D.**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 649 559 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**

Método y aparato para realizar ensayos

**5 Antecedentes de la invención**

## 1. Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a un método y a un aparato para realizar ensayos; y más particularmente se refiere a un método y a un aparato para realizar ensayos químicos, biológicos o bioquímicos usando tecnología microfluídica.

## 2. Breve descripción de la técnica relacionada

15 Uno de los factores principales que afectan a la calidad de los datos de un sistema multiplexado es la reactividad cruzada biológica, que se provoca cuando se mezclan múltiples analitos y un cóctel de detección de múltiples reactivos en un único recipiente de reacción. Por ejemplo, en un ensayo de proteínas, el mezclado de analitos (proteínas) y el cóctel de detección (anticuerpos marcados) puede dar como resultado reacciones cruzadas secundarias no intencionadas o interferencia que distorsionan las mediciones y comprometen gravemente la calidad de los datos. Esta reactividad cruzada biológica puede mitigarse intentando diseñar el ensayo con componentes que no reaccionan negativamente; sin embargo, este se vuelve cada vez menos práctico y más difícil (debido al alto número de variables introducidas) a medida que aumenta el nivel de múltiplex. Además, incluso para conjuntos de anticuerpos en el ensayo con componentes que no reaccionan negativamente, el resultado multiplexado es todavía normalmente [inferior al óptimo] en relación con el rendimiento de uno cualquiera de los componentes individuales, debido a la aplicación de un tampón de ensayo común por todos los anticuerpos, que normalmente no es el tampón óptimo con respecto al pH, la salinidad, etc. para cada uno de los anticuerpos.

El documento WO2009/012340 se refiere a dispositivos, a métodos y a sistemas para detectar una molécula diana en un componente fluídico de una muestra fluídica.

30

**Sumario de la invención**

La presente invención proporciona un método nuevo y único según la reivindicación 17 y un aparato según la reivindicación 1 para realizar un ensayo químico, bioquímico o biológico en una muestra, incluyendo un ensayo biológico, por ejemplo, en una muestra de un paciente, tal como suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, orina, sangre, etc.

35

Según algunas realizaciones de la presente invención, el aparato puede adoptar la forma de un dispositivo o aparato de ensayo que comprende: un cartucho o dispositivo de ensayo microfluídico que contiene al menos un pocillo de entrada de muestra configurado para recibir una muestra; y una subunidad microfluídica asociada con el cartucho de ensayo microfluídico y que comprende canales microfluídicos, microválvulas y al menos un canal de aislamiento independiente y aislado fluídicamente, y al menos un elemento hueco, incluyendo por ejemplo al menos un cilindro, tubo o partícula de vidrio hueco. El al menos un elemento hueco puede estar funcionalizado con un resto o moléculas de captura para formar al menos un recipiente de reacción. Los canales microfluídicos y las microválvulas pueden estar configurados para responder a señalización que contiene información sobre la realización del ensayo y para recibir de manera controlable la muestra y al menos un reactivo en el al menos un recipiente de reacción, y para proporcionar desde el al menos un recipiente de reacción luz que contiene información sobre el ensayo realizado en la muestra dentro del al menos un recipiente de reacción como resultado de dicho al menos un reactivo.

40

45

50 A modo de ejemplo, los canales microfluídicos y las microválvulas también pueden estar configurados para responder a la señalización que contiene información sobre la realización del ensayo y para introducir en el al menos un recipiente de reacción alguna combinación de las siguientes:

50

reactivos de ensayo, incluyendo una pluralidad de reactivos, tales como anticuerpos marcados,

55

reactivos, incluyendo un sustrato enzimático, para producir una señal luminosa emitida, e

introducir una disolución de lavado para eliminar cualquier proteína o anticuerpo unido de manera inespecífica y/o hidratar reactivos secos con un tampón;

60

pudiendo estar configurado el al menos un recipiente de reacción para permitir que tengan lugar reacciones químicas para realizar el ensayo, y para proporcionar luz emitida que contiene información sobre el ensayo realizado que debe interrogarse, basándose al menos parcialmente en la señalización recibida.

65 Según algunas realizaciones, la presente invención puede comprender una o más de las siguientes características: la subunidad microfluídica puede estar configurada para contener a bordo los reactivos de ensayo, incluyendo la

pluralidad de reactivos, tales como anticuerpos marcados, para contener a bordo los reactivos tales como un sustrato enzimático para producir la señal luminosa emitida, y/o a bordo la disolución de lavado para eliminar cualquier proteína o anticuerpo unido de manera inespecífica. Estas subunidades microfluídicas también pueden estar configuradas de modo que los reactivos a bordo, tales como los definidos anteriormente, estén contenidos en una forma deshidratada, y se rehidraten mediante señales de control al sistema microfluídico que introduce fluidos tampón en dichos reactivos deshidratados. También se conciben realizaciones en las que los reactivos de ensayo, el sustrato enzimático o la disolución de lavado no están contenidos a bordo, sino que en su lugar forman parte de otro dispositivo, aparato o equipo y se proporcionan al dispositivo de ensayo o aparato. El aparato puede estar configurado con al menos un receptáculo de residuos a bordo común o receptáculos de residuos a bordo individuales que están configurados para capturar la disolución de lavado, junto con proteínas o anticuerpos unidos de manera inespecífica. El cartucho de ensayo microfluídico puede estar configurado para ser desechable. El aparato puede comprender un sistema de detección configurado para responder a la señal luminosa emitida proporcionada desde al menos un recipiente de reacción, y proporcionar una señal que contiene información sobre el ensayo realizado en relación con el al menos un recipiente de reacción. El aparato puede comprender un controlador configurado para ejecutar un código de programa informático y para proporcionar la señalización a los canales microfluídicos y las microválvulas con el fin de realizar el ensayo. Cada una de las series de canales microfluídicos puede estar configurada para corresponderse con uno respectivo del al menos un pocillo de entrada de muestra. También se conciben realizaciones para algunos ensayos, en las que el lavado es opcional, y sólo se introducen los reactivos de ensayo y el sustrato enzimático, pero no el lavado. El al menos un recipiente de reacción puede estar contenido en un canal que puede estar configurado para llevar a cabo ensayos independientes, pudiendo entenderse que el canal es independiente y está aislado fluidicamente de otros canales para eliminar sustancialmente la reactividad cruzada entre los ensayos realizados en los respectivos canales. El al menos un recipiente de reacción contenido en cada canal de aislamiento puede estar funcionalizado con el mismo resto de captura o las mismas moléculas de captura; o el al menos un recipiente de reacción contenido en cada canal de aislamiento puede estar cada uno funcionalizado con un resto de captura diferente o moléculas de captura diferentes; o alguna combinación de los mismos. El al menos un elemento hueco puede estar configurado como panal de abeja con múltiples cavidades o cámaras axiales. El al menos un reactivo puede comprender una pluralidad de reactivos.

Según algunas realizaciones de la presente invención, el aparato puede adoptar la forma de un controlador que puede estar configurado para controlar el rendimiento de un ensayo mediante un dispositivo de ensayo que comprende un cartucho de ensayo microfluídico que contiene al menos un pocillo de entrada de muestra configurado para recibir una muestra; y una subunidad microfluídica asociada con el cartucho de ensayo microfluídico y que comprende canales microfluídicos, microválvulas y al menos un elemento hueco, estando funcionalizado el al menos un elemento hueco con un resto o moléculas de captura para formar al menos un recipiente de reacción.

En esta realización, el controlador puede comprender:

al menos un procesador y al menos un dispositivo de memoria, que incluye un código de programa informático; el al menos un dispositivo de memoria y el código de programa informático pueden estar configurados, con el al menos un procesador, para provocar que el controlador proporcione al menos señalización que contiene información sobre la realización del ensayo biológico a los canales microfluídicos y las microválvulas, estando configurados los canales microfluídicos y las microválvulas para responder a la señalización, para dirigir la muestra desde el al menos un pocillo de entrada de muestra al al menos un recipiente de reacción, y para introducir en el al menos un recipiente de reacción al menos un reactivo, para proporcionar desde el al menos un recipiente de reacción luz que contiene información sobre el ensayo realizado en la muestra dentro del al menos un recipiente de reacción como resultado del al menos un reactivo.

Según algunas realizaciones, la presente invención también puede adoptar la forma de un método para realizar el proceso de ensayo usando una técnica de separación nueva y única consistente con lo expuesto anteriormente. El método puede implementarse proporcionando los medios expuestos anteriormente para separar automáticamente componentes en los que pueden producirse reacciones cruzadas negativas, y empleando el cartucho o dispositivo de ensayo microfluídico que automatizará algunas de las etapas manuales asociadas normalmente con estos tipos de pruebas. La técnica de separación expuesta en el presente documento para realizar el proceso de ensayo minimizará sustancialmente la necesidad de diseño en torno a la reactividad cruzada. A modo de ejemplo, el método puede comprender alguna combinación de las siguientes:

funcionalizar al menos un elemento hueco reticulando químicamente o adhiriendo pasivamente un anticuerpo de captura específico para un analito diana de interés sobre la superficie del elemento hueco;

introducir un volumen preciso de una muestra, que pueden contener una muestra de un paciente, incluyendo suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, orina, sangre, etc., haciendo fluir la muestra al interior de un canal que contiene al menos un recipiente de reacción, incluyendo mediante presión o bien positiva o bien negativa, tiempo durante el cual el analito diana de interés se retiene gracias a la unión específica al anticuerpo de captura recubierto sobre la superficie del al menos un recipiente de reacción,

enjuagar el o recipiente de reacción con una disolución tampón para eliminar mediante lavado los analitos diana no unidos (por ejemplo, proteína);

5 o bien hacer fluir un segundo anticuerpo, denominado anticuerpo de detección basándose al menos parcialmente en el hecho de que el anticuerpo de detección está acoplado a una etiqueta (conjugado) fluorescente que puede emitir una señal luminosa, tras lo cual el anticuerpo de detección se une al analito diana retenido sobre la superficie del al menos un recipiente de reacción por medio del anticuerpo de captura, o bien alternativamente hacer fluir un segundo anticuerpo sin un conjugado fluorescente, enjuagar el recipiente de reacción con un tampón para eliminar mediante lavado el anticuerpo de detección no unido, y entonces añadir un conjugado fluorescente en una etapa posterior;

10 enjuagar el recipiente de reacción con una disolución tampón para eliminar cualquier conjunto fluorescente no unido,

15 irradiar una etiqueta química fluorescente con una longitud de onda de excitación apropiada sobre el recipiente de reacción;

20 detectar una cantidad de luz fluorescente emitida por el anticuerpo de detección marcado como resultado de la irradiación; y

25 cuantificar una cantidad del analito diana capturado por la cantidad de luz fluorescente emitida por el anticuerpo de detección marcado como resultado de la irradiación de la etiqueta química fluorescente con la longitud de onda de excitación apropiada sobre el recipiente de reacción, siendo la cantidad de analito en la superficie de recipiente de reacción proporcional a la cantidad de luz emitida por el anticuerpo de detección marcado de manera fluorescente, y por tanto es directamente proporcional a la cantidad de analito dentro de la muestra del paciente.

30 Según algunas realizaciones, la presente invención también puede adoptar la forma de un aparato consistente con lo descrito anteriormente, pero en el que los canales microfluídicos están configurados para responder a un impulso de control que contiene información sobre la realización del ensayo y para recibir la muestra y al menos un reactivo en el recipiente de reacción. A modo de ejemplo, el impulso de control puede adoptar la forma de al menos una señal de control que provoca que conductos de control neumático abran o cierren microválvulas dispuestas en relación con el microcanal que provoca que la muestra y el al menos un reactivo fluyan al interior del al menos un recipiente de reacción con el fin de realizar el ensayo; o alternativamente que provoca que un dispositivo dispuesto en relación con el microcanal proporcione presión positiva o negativa en el microcanal que provoca que la muestra y el al menos un reactivo fluyan al interior del al menos un recipiente de reacción con el fin de realizar el ensayo.

35 También se conciben realizaciones dentro del espíritu de la presente invención en las que, en lugar de usar al menos un elemento hueco que tiene un resto o moléculas de captura, pueden usarse micropartículas codificadas o no codificadas que tienen una superficie externa funcionalizada, por ejemplo mediante recubrimiento, con el resto o las moléculas de captura, consistente con lo dado a conocer en el documento con número de serie 12/945.549, presentado el 12 de noviembre de 2010, que se incorpora por la presente mediante referencia en su totalidad.

#### Ventajas

45 La presente invención emplea un recipiente de reacción novedoso que, por sí mismo, posibilita una fabricación de muy bajo coste, un tiempo de reacción rápido, un volumen de muestra bajo, una alta sensibilidad y un gran intervalo dinámico. El recipiente de reacción hueco novedoso puede adoptar la forma del al menos un elemento hueco que se ha funcionalizado con el resto de captura o las moléculas de captura.

50 Las ventajas de las realizaciones de la presente invención incluyen minimizar sustancialmente la necesidad de diseño en torno a la reactividad cruzada proporcionando un medio para separar automáticamente componentes en los que se producen reacciones cruzadas negativas. Adicionalmente, este dispositivo de ensayo mejorará la facilidad de uso empleando un cartucho de ensayo microfluídico desechable que automatizará algunas de las etapas manuales asociadas normalmente con estos tipos de pruebas. Este dispositivo de ensayo optimizará las condiciones de tamponamiento para producir ensayos optimizados independientemente. Las condiciones de tamponamiento optimizadas pueden incluir la optimización en relación con el pH, la salinidad o ambos. Este dispositivo de ensayo también permitirá diluir independientemente las muestras con disolución tampón con respecto a cada canal.

60 El propósito de la presente invención es suministrar un aparato o un método que proporcione ensayos de múltiples muestras, múltiplex, con calidad de los datos que esté mejorado significativamente con respecto a los métodos actuales, mientras que al mismo tiempo proporcionar una mayor facilidad de uso.

#### Breve descripción de los dibujos

65 Los dibujos, que no están dibujados necesariamente a escala, incluyen las siguientes Figuras:

La Figura 1 incluye lo siguiente: la Figuras 1(a) que muestra un cartucho o dispositivo de ensayo microfluídico según algunas realizaciones de la presente invención; la Figura 1 (b) que muestra una subunidad microfluídica correspondiente a al menos un pocillo de entrada de muestra del cartucho microfluídico mostrado en la Figura 1(a) según algunas realizaciones de la presente invención; y la Figura 1 (c) que muestra un diagrama de flujo que tiene etapas para realizar un ensayo biológico, por ejemplo, usando la combinación del cartucho o dispositivo de ensayo microfluídico mostrado en la Figura 1 (a) y la subunidad microfluídica mostrada en la Figura 1 (c).

La Figura 2 es un diagrama que muestra un detalle de un canal de aislamiento con un recipiente de reacción incrustado que forma parte de la subunidad microfluídica mostrada en la Figura 1 (b) según algunas realizaciones de la presente invención.

La Figura 3 muestra la geometría de canal de un canal de aislamiento que puede formar parte de la subunidad microfluídica mostrada en la Figura 1(b) según algunas realizaciones de la presente invención, incluyendo la Figura 3a que muestra una fotografía ampliada de ejemplos de canales cuadrados, un canal llenado parcialmente y un canal neumático; la Figura 3b que muestra un ejemplo de un canal que no tiene ningún relleno; la Figura 3c que muestra un ejemplo de un canal que tiene un relleno del 20%; la Figura 3d que muestra un ejemplo de un canal que tiene un relleno del 60%; la Figura 3e(1) que muestra un diagrama de un elemento hueco encajado dentro de las paredes del canal de aislamiento mirando desde arriba; la Figura 3e(2) que muestra un diagrama del elemento hueco encajado dentro de las paredes del canal de aislamiento mostrado en la Figura 3e(1) mirando desde el extremo a lo largo del eje longitudinal del elemento hueco; la Figura 3f(1) que muestra un diagrama de un elemento hueco encajado dentro de las paredes del canal de aislamiento con material de relleno mirando desde arriba; la Figura 3f(2) que muestra un diagrama del elemento hueco encajado dentro de paredes del canal de aislamiento con relleno mostrado en la Figura 3f(1) mirando desde el extremo a lo largo del eje longitudinal del elemento hueco; y la Figura 3g es una matriz de selección de epoxi que muestra filas de epoxi en relación con columnas de parámetros, incluyendo la indicación del tipo, la viscosidad, disponible, fluorescencia, método de curado, comentario y aceptable.

La Figura 4 muestra una fotografía ampliada de un ejemplo de una bomba accionada neumáticamente que tiene válvulas, un pistón, un canal fluido y conductos neumáticos según algunas realizaciones de la presente invención.

La Figura 5 muestra un ejemplo de la operación de bombeo en relación con válvulas y un pistón dispuesto entre un depósito de entrada y un destino según algunas realizaciones de la presente invención.

La Figura 6a(1) muestra un ejemplo de una arquitectura cuádruplex con control de bombeo independiente y depósitos de residuos individuales según algunas realizaciones de la presente invención; la Figura 6a(2) muestra un ejemplo de estados normalmente cerrados (NC, *normally closed*) (accionados a vacío) para bombeo de tampón (1 ciclo completo) para la arquitectura cuádruple mostrada en la Figura 6a(1) según algunas realizaciones de la presente invención; la Figura 6b muestra un ejemplo de una arquitectura cuádruplex con control de bombeo independiente y un depósito de residuos común según algunas realizaciones de la presente invención; la Figura 6c muestra un ejemplo de una arquitectura cuádruplex con un control de bombeo común, un depósito de residuos común y un canal de derivación según algunas realizaciones de la presente invención; y la Figura 6d muestra un ejemplo de una arquitectura cuádruplex con un control de bombeo común, un depósito de residuos común, un canal de derivación y un canal de rehidratación de anticuerpo según algunas realizaciones de la presente invención.

La Figura 7 incluye lo siguiente: la Figuras 7a es una fotografía de un chip microfluídico según algunas realizaciones de la presente invención; la Figura 7b muestra una vista ampliada y aumentada de tres recipientes de reacción incrustados en un canal de aislamiento del chip microfluídico mostrado en la Figura 7a según algunas realizaciones de la presente invención; la Figura 7c(1) es un gráfico de cuentas por segundo frente al tiempo de una evolución de la señal en tiempo real debido a la unión de un Ab secundario (IL6) a un antígeno capturado dentro de tres recipientes de reacción incrustados; la Figura 7c(2) muestra imágenes de fluorescencia de tres recipientes de reacción incrustados tras 15 minutos; y la Figura 7d muestra un gráfico de la intensidad de fluorescencia media por segundo frente a IL6 en picogramos/mililitro en relación con las curvas de dosis-respuesta para un ensayo de intercalación de IL6 realizado en recipientes de reacción en modo discontinuo.

La Figura 8 incluye lo siguiente: la Figuras 8a que es una vista de un elemento hueco que tiene una configuración de panal de abeja de forma hexagonal con múltiples cavidades o cámaras de reacción según algunas realizaciones de la presente invención, y la Figura 8b es una vista de un elemento hueco que tiene una configuración de panal de abeja con forma circular con múltiples cavidades o cámaras de reacción según algunas realizaciones de la presente invención.

## Descripción detallada de la invención

### Figura 1

En la Figura 1, la presente invención adopta la forma de un aparato indicado generalmente como 50 mostrado en la Figura 1 que puede incluir un cartucho o dispositivo de ensayo microfluídico (1) que contendrá al menos un pocillo de entrada de muestra (2), tal como se muestra en la Figura 1 (a). Cada pocillo de entrada de muestra (2)

alimentará, por ejemplo basándose al menos parcialmente en alguna lógica de control, a una respectiva subunidad microfluídica (3) incrustada dentro del cartucho o dispositivo de ensayo microfluídico (1), tal como se muestra en las Figuras 1 y 1(b). En la Figura 1(a), el cartucho o dispositivo de ensayo microfluídico (1) se muestra a modo de ejemplo como que tiene una pluralidad de pocillos de entrada de muestra (2) en forma de una matriz de 4 por 6, en total 24 pocillos de entrada de muestra. No se pretende que el alcance de la invención esté limitado al número de pocillos de entrada de muestra (2), y se pretende que incluya cualquier número de pocillos de entrada de muestra (2) que oscile entre 1 pocillo de entrada de muestra (2) y N pocillos de entrada de muestra (2). El cartucho o dispositivo de ensayo microfluídico (1) y/o la subunidad microfluídica (3) puede estar construido y/o hecho de un material para que sea desechable o reutilizable, y no se pretende que el alcance de la invención esté limitado al tipo o la clase de material usado para construir o hacer el cartucho o dispositivo de ensayo microfluídico (1) y/o la subunidad microfluídica (3) ya sea conocido actualmente o desarrollado posteriormente en el futuro.

La subunidad microfluídica (3) contiene una serie de canales microfluídicos y microválvulas (4) que dirigen una muestra, incluyendo una muestra de un paciente, tal como suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, orina, sangre, etc., desde el al menos un pocillo de entrada de muestra (2) a canales independientes y aislados fluidicamente (5) que contienen uno o más recipientes de reacción (19), que se han funcionalizado con un resto de captura o moléculas de captura tales como anticuerpos, antígenos u oligómeros, tal como se muestra en la Figura 1(b). En la Figura 1b, cada canal de aislamiento (5) se muestra teniendo cuatro recipientes de reacción (19) para un total combinado de 16 recipientes de reacción es los canales C1, C2, C3, C4, aunque no se pretende que el alcance de la invención esté limitado a ningún número particular de recipientes de reacción (19) en cada canal de aislamiento (5), consistente con lo descrito en el presente documento. Reactivos de ensayo (7) que incluyen los reactivos R1, R2, R3, R4, tal como anticuerpos marcados, se introducirán en los canales de aislamiento independientes (5) por medio de los canales microfluídicos (8) y las microválvulas (4). Adicionalmente, los canales microfluídicos (8) y las microválvulas (9) se proporcionan para introducir reactivos tales como un sustrato enzimático (10) para producir una señal luminosa emitida y una disolución de lavado (11) para eliminar cualquier proteína o anticuerpo unido de manera inespecífica. La disolución de lavado (11), junto con proteínas o anticuerpos unidos de manera inespecífica, se captura en un receptáculo de residuos a bordo (12). Las reacciones químicas que tienen lugar en los recipientes de reacción (19) se interrogan mediante un sistema de detección (13). (Se observa que la adición del sustrato enzimático (10) forma parte de una técnica de realización del ensayo biológico, que puede contrastarse con una técnica alternativa descrita a continuación en relación con la Figura 6. Véanse también las realizaciones alternativas descritas en relación con la Figura 1(c).)

La Figura 2 muestra más detalladamente tal como se indica generalmente mediante (6) el canal de aislamiento (5) y el recipiente de reacción (19) incrustado en el mismo que se ha diseñado de modo que puede tolerar una gran región o zona confocal (18), y en consecuencia puede no requerir una óptica de alta resolución para evitar fluorescencia de fondo. Además, el canal de aislamiento y el recipiente de reacción se han diseñado para posibilitar una fabricación de muy bajo coste, y pueden incluir aprovechar la fibra óptica y la tecnología de plástico moldeado por inyección existente. Este bajo coste se consigue proporcionando al mismo tiempo calidades ópticas muy buenas, una sensibilidad aumentada, un tiempo de reacción reducido, un gran intervalo dinámico y requisitos de volúmenes de muestra bajos.

Las reacciones biológicas tienen lugar dentro de al menos un elemento hueco (14) que se ha funcionalizado con un resto o moléculas de captura (15), para formar el recipiente de reacción (19). A modo de ejemplo, el al menos un elemento hueco (14) puede configurarse o fabricarse estirando un tubo de vidrio con un diámetro exterior y un diámetro interior, y cortándolo o rebanándolo, por ejemplo, con una sierra rebanadora. El al menos un elemento hueco (14) también puede configurarse o fabricarse exponiendo mediante grabado el núcleo de varillas o fibras ópticas de sílice fundida de AN alta disponibles comercialmente, que proporcionan una calidad óptica extremadamente alta a un coste muy bajo. La presente invención se describe a modo de ejemplo estando el al menos un elemento hueco (14) hecho de vidrio; sin embargo, el alcance de la invención pretende incluir la preparación del al menos un elemento hueco (14) a partir de otros tipos o clases de material ya sea conocido actualmente o desarrollado posteriormente en el futuro, incluyendo otros tipos o clases de materiales distintos del vidrio. El al menos un elemento hueco (14) puede estar suspendido en un alojamiento (16) con una cantidad significativa de espacio de aire (17) rodeando el diámetro exterior del al menos un elemento hueco (14). Este espacio de aire (17) proporciona la gran zona confocal (18) proporcionando un área que está libre de cualquier fluorescencia de fondo introducida. El al menos un elemento hueco (14) puede instalarse con un encaje a presión o por fricción en y estar recibido por las paredes del alojamiento (16), lo que se describe más detalladamente a continuación, que dirigirán la muestra a través del diámetro interior del al menos un elemento hueco (14), e impedirán que la muestra entre en el espacio de aire (17) que rodea el al menos un elemento hueco (14). El al menos un elemento hueco (14) puede configurarse o diseñarse con una cavidad o cámara que tiene un diámetro interior muy pequeño (por ejemplo, un diámetro interior (DI) de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ ) y una relación de aspecto de longitud con respecto a DI de, por ejemplo, aproximadamente 20:1 (aproximadamente 200  $\mu\text{m}$  L). Esta configuración proporciona el recipiente de reacción (19) con una relación de área superficial con respecto a volumen muy alta, que a su vez lleva a una cinética de reacción rápida. Además, el efecto de que la muestra se fuerce a través de un recipiente de reacción de volumen muy pequeño aumenta la probabilidad de un acontecimiento de unión, porque una mayor proporción de la muestra entra en contacto con la superficie funcionalizada del elemento hueco, aumentando de ese modo la sensibilidad. En la Figura 2 se entiende que el detalle del canal de aislamiento y

el recipiente de reacción adopta la forma de al menos un elemento hueco (14) que está funcionalizado con el resto o las moléculas de captura (15), y está dispuesto en y acoplado con el alojamiento (16) en un canal de aislamiento (5) tal como se muestra.

5 Tal como se muestra en la Figura 2, la luz  $L_{\text{entrada}}$  procedente de una fuente luminosa (20) puede pasarse a través de un divisor de haz dicróico (22), una lente (24) y el espacio de aire (17) hasta la gran región o zona confocal (18); y la luz  $L_{\text{salida}}$  puede pasarse de vuelta a través del espacio de aire (17), la lente (24), el divisor de haz dicróico (22), una lente (26) hasta el detector (13).

10 En una realización alternativa de esta invención, una pluralidad de elementos huecos (14) de diámetros interiores decrecientes pueden funcionalizarse y ponerse en línea para abordar densidades de analito variables, impedir la sobresaturación y ampliar el intervalo dinámico de las capacidades de análisis de los sistemas. Alternativamente, una pluralidad de elementos huecos del mismo diámetro que se han funcionalizado con diferentes densidades de carga del resto o las moléculas de captura pueden ponerse en línea para abordar densidades de analito variables, impedir la sobresaturación y ampliar el intervalo dinámico. También está previsto que puedan emplearse combinaciones de la configuración anterior para conseguir resultados optimizados.

20 No se pretende que el alcance de la invención esté limitado a ningún tipo o clase particular de muestra que forma parte del proceso de ensayo, y se pretende que incluya muestras de sustancia tanto conocidas actualmente como desarrolladas posteriormente en el futuro.

El al menos un pocillo de entrada de muestra (2)

25 En la Figura 1, cada uno del al menos un pocillo de entrada de muestra (2) del cartucho o dispositivo desechable de ensayo microfluídico (1) corresponde a una respectiva subunidad microfluídica (3) incrustada dentro del cartucho desechable de ensayo microfluídico (1). Sin embargo, se pretende que el alcance de la invención incluya también realizaciones en las que múltiples pocillos de entrada de muestra (2) del cartucho o dispositivo desechable de ensayo microfluídico (1) están configurados para corresponderse con una respectiva subunidad microfluídica (3) por medio de, por ejemplo, un dispositivo colector (no mostrado).

30 Los reactivos de ensayo y el canal

35 En la Figura 1, cada reactivo de ensayo R1, R2, R3, R4 puede corresponderse con, alimentarse a y asignarse a un respectivo canal de aislamiento C1, C2, C3, C4. Sin embargo, también se pretende que el alcance de la invención incluya realizaciones en las que cada reactivo de ensayo R1, R2, R3, R4 alimenta múltiples canales C1, C2, C3, C4.

El sistema de detección (13)

40 En la Figura 1, cada una de las subunidades microfluídicas (3) incrustadas dentro del cartucho desechable de ensayo microfluídico (1) tiene un respectivo sistema de detección (13). Sin embargo, también se pretende que el alcance de la invención incluya realizaciones en las que múltiples subunidades microfluídicas (3) están configuradas para corresponderse con un respectivo sistema de detección (13). A modo de ejemplo, una primera columna o grupo de cuatro subunidades microfluídicas (3) puede corresponderse con un primer sistema de detección (13); una segunda columna o grupo de cuatro subunidades microfluídicas (3) puede corresponderse con un segundo sistema de detección (13);...; y una sexta columna o grupo de cuatro subunidades microfluídicas (3) puede corresponderse con un sexto sistema de detección (13). Alternativamente, a modo de ejemplo, una primera fila o grupo de seis subunidades microfluídicas (3) puede corresponderse con un primer sistema de detección (13); una segunda fila o grupo de seis subunidades microfluídicas (3) puede corresponderse con un segundo sistema de detección (13);...; y una cuarta fila o grupo de seis subunidades microfluídicas (3) puede corresponderse con un cuarto sistema de detección (13). También se pretende que el alcance de la invención incluya realizaciones en las que N subunidades microfluídicas (3), siendo N, por ejemplo, igual a 24 de manera correspondiente a lo mostrado en la Figura 1, están configuradas para corresponderse con un único sistema de detección (13). También se pretende que el alcance de la invención incluya realizaciones en las que el sistema de detección (13) está a bordo y forma parte de la subunidad microfluídica (3), así como realizaciones en las que el sistema de detección (13) no está a bordo, sino que forma parte de otro dispositivo, aparato o equipo ya sea conocido actualmente o desarrollado posteriormente en el futuro.

El controlador (140)

60 El aparato también puede incluir un controlador (140) para implementar la funcionalidad asociada con el ensayo realizado por la subunidad microfluídica (3) incrustada dentro del cartucho o dispositivo desechable de ensayo microfluídico (1). El controlador (140) puede estar configurado para ejecutar un código de programa informático y para proporcionar la señalización a lo largo de trayectos de señal, por ejemplo,  $S_0, S_1, S_2, S_3, S_4, S_5, S_6, \dots, S_{10}$  a cada canal microfluídico (8) y/o microválvulas (4, 9) con el fin de realizar el ensayo. En funcionamiento, el controlador (140) puede estar configurado para ejecutar el código de programa informático y para intercambiar señalización a lo largo del trayecto de señal  $S_7$  con el sistema de detección (13), incluyendo recibir una señal de sistema de detección que contiene información sobre las reacciones que tienen lugar en los recipientes de reacción

(19) que se interrogan mediante el sistema de detección (13). El controlador (140) también puede estar configurado para recibir una(s) señal(es) de entrada a lo largo del trayecto de señal  $S_{\text{entrada}}$ , y para proporcionar una(s) señal(es) de salida a lo largo del trayecto de señal  $S_{\text{salida}}$ . A modo de ejemplo, la señal de salida a lo largo del trayecto de señal  $S_{\text{salida}}$  puede contener o bien la señal de sistema de detección sin procesar que contiene información sobre las reacciones que tienen lugar en los recipientes de reacción (19) que se interrogan mediante el sistema de detección (13), o una señal de sistema de detección procesada que contiene información sobre las reacciones que tienen lugar en los recipientes de reacción (19) que se interrogan mediante el sistema de detección (13). A modo de ejemplo, la señal de entrada a lo largo del trayecto de señal  $S_{\text{entrada}}$  puede contener información para controlar o modificar la funcionalidad del controlador (140), incluyendo una señal que solicita la provisión de la señal de salida a lo largo del trayecto de señal  $S_{\text{salida}}$ . No se pretende que el alcance de la invención esté limitado al tipo o la clase de información que está proporcionándose a o recibándose mediante el controlador (140) por medio de la señal de entrada a lo largo del trayecto de señal  $S_{\text{entrada}}$  o el tipo o la clase de información que está proporcionándose desde el controlador (140) por medio de la señal de salida a lo largo del trayecto de señal  $S_{\text{salida}}$  ya sea conocido actualmente o desarrollado posteriormente en el futuro. Adicionalmente, a modo de ejemplo, el controlador (140) puede implementarse usando hardware, software, firmware o una combinación de los mismos. En una implementación de software típica, el controlador (140) incluirá una o más arquitecturas basadas en microprocesador que tienen un procesador o microprocesador, una memoria tal como una memoria de acceso aleatorio (RAM) y/o una memoria de solo lectura (ROM), dispositivos de entrada/salida y buses de control, datos y direccionamiento que los conectan. Un experto en la técnica podrá programar un microcontrolador o implementación basada en microprocesador de este tipo con el código de programa informático para realizar la funcionalidad descrita en el presente documento sin experimentación excesiva. No se pretende que el alcance de la invención esté limitado a ninguna implementación de arquitectura basada en microprocesador particular usando tecnología ya sea conocida actualmente o desarrollada posteriormente en el futuro.

Se conciben realizaciones en las que el controlador (140) o bien está a bordo y forma parte del aparato (50), o bien no está a bordo sino que forma parte de otro aparato, dispositivo, sistema o equipo que actúa conjuntamente con el aparato (50) en relación con la implementación del proceso de ensayo con la tecnología microfluidica dada a conocer en el presente documento.

En la Figura 1(a), la subunidad microfluidica (3) se muestra, a modo de ejemplo, con microválvulas (4, 9) dispuestas en relación con el sustrato (10), el lavado (11) y los reactivos de ensayo (7) para controlar la introducción de los reactivos de ensayo en los canales de aislamiento (5) en respuesta a la señalización a lo largo de trayectos de señalización  $S_0, S_1, S_2, S_3, S_4, S_5, S_6, \dots, S_{10}$  usando las etapas 3-8 descritas a continuación y expuestas en el diagrama de flujo mostrado en la Figura 1 (c). También se conciben realizaciones en las que las microválvulas (4) proporcionan información de vuelta al controlador (140) por medio de una señalización correspondiente a lo largo de trayectos de señalización  $S_0, S_1, S_2, S_3, S_4, S_5, S_6, \dots, S_{10}$ , para controlar la introducción de los reactivos de ensayo (7), el sustrato (10) y el lavado (11). También se conciben realizaciones en las que otras microválvulas se disponen en otros puntos en relación con cada canal microfluidico (8), por ejemplo tal como las microválvulas (4a) en la Figura 1(b) dispuestas en relación con la superficie de contacto entre cada canal microfluidico (8) y el al menos un pocillo de entrada de muestra (2) para controlar la provisión de la muestra al interior del canal microfluidico (8) con señalización a lo largo del trayecto de señal  $S_0$ . También se conciben realizaciones en las que otras microválvulas se disponen en relación con los canales de aislamiento (5), incluyendo en cada uno o ambos extremos, para controlar el paso de la disolución, los reactivos o el tampón a través de los canales de aislamiento (5). No se pretende que el alcance de la invención esté limitado al número, la posición o las disposiciones de las microválvulas, como (4) o (4a) o (9).

A modo de ejemplo, las microválvulas (4, 4a, 9), los canales de aislamiento (5), el sistema de detección (13), junto con otros componentes o dispositivos mostrados y descritos en el presente documento en relación con la Figura 1, o bien se conocen en la técnica o bien pueden implementarse para realizar la funcionalidad deseada sin experimentación excesiva por parte de un experto en la técnica; y no se pretende que el alcance de la invención esté limitado a ningún tipo o clase particular de la misma ya sea conocido actualmente o desarrollado posteriormente en el futuro. Además, basándose en la divulgación en el presente documento, un experto en la técnica podrá implementar el aparato 50 mostrado en la Figura 1, incluyendo el cartucho de ensayo microfluidico (1) mostrado en la Figura 1(a) y la subunidad microfluidica (3) incrustada en el mismo mostrada en la Figura 1(b), para realizar la funcionalidad deseada sin experimentación excesiva.

La presente invención se describe usando microválvulas configuradas para controlar el flujo de uno o más de la muestra, los reactivos de ensayo (7), el sustrato (10) y el lavado (13) al interior del al menos un canal de aislamiento (5) independiente y aislado fluidicamente. Sin embargo, se pretende que el alcance de la invención incluya usar otros tipos o clase de técnicas ya sean conocidas actualmente o desarrolladas posteriormente en el futuro para controlar el flujo de uno o más de la muestra, los reactivos de ensayo (7), el sustrato (10) y el lavado (13) al interior del al menos un canal de aislamiento (5) independiente y aislado fluidicamente, por ejemplo, tal como usando una configuración para proporcionar una presión positiva para empujar y provocar el flujo de uno o más de la muestra, los reactivos de ensayo (7), el sustrato (10) y el lavado (13) al interior del al menos un canal de aislamiento (5) independiente y aislado fluidicamente, o tal como usando una configuración para proporcionar una presión negativa (por ejemplo un vacío) para tirar (o extraer) y provocar el flujo de uno o más de la muestra, los reactivos de ensayo

(7), el sustrato (10) y el lavado (13) al interior del al menos un canal de aislamiento (5) independiente y aislado fluidicamente (5), o tal como usando alguna combinación de empujar y/o tirar para provocar el flujo de uno o más de la muestra, los reactivos de ensayo (7), el sustrato (10) y el lavado (13) al interior del al menos un canal de aislamiento (5) independiente y aislado fluidicamente. La configuración para proporcionar una presión positiva puede estar configurada en el extremo superior (tal como se muestra en la Figura 1(b)) del al menos un canal de aislamiento (5) independiente y aislado fluidicamente en relación con los reactivos de ensayo (7) y los canales C1, C2, C3, C4, mientras que la configuración para proporcionar una presión negativa puede estar configurada en el extremo inferior (tal como se muestra en la Figura 1 (b)) del al menos un canal de aislamiento (5) independiente y aislado fluidicamente en relación con los residuos (12) y los canales C1, C2, C3, C4.

Proceso de inmunoensayo para ELISA intercalados

A modo de ejemplo, el proceso de llevar a cabo un inmunoensayo en un cartucho según la presente invención usando un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) intercalado puede implicar alguna combinación de las siguientes:

Etapa 1: Un anticuerpo de captura específico para el analito diana de interés se reticula químicamente sobre la superficie del elemento hueco (14) en la Figura 2 para formar el recipiente de reacción (19)).

Etapa 2: El recipiente de reacción (19), una vez colocado en el canal de aislamiento (5), está entonces listo para recibir la muestra del paciente (suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, orina, sangre, etc.).

Etapa 3: Un volumen preciso de la muestra del paciente se introduce entonces haciendo fluir el material al interior del recipiente de reacción (19), por ejemplo mediante presión o bien positiva o bien negativa, tiempo durante el cual el analito diana de interés se retiene gracias a la unión específica al anticuerpo de captura recubierto sobre la superficie interna del recipiente de reacción (19).

Etapa 4: El recipiente de reacción (19) se enjuaga entonces con un tampón para eliminar mediante lavado la proteína no unida.

Etapa 5: El segundo anticuerpo, denominado anticuerpo de detección dado que está acoplado a una etiqueta fluorescente capaz de emitir una señal luminosa, se hace fluir entonces al interior del recipiente de reacción (19) tras lo cual se une al analito diana retenido sobre la superficie interna por medio del anticuerpo de captura.

Etapa 5a: Una realización alternativa de este proceso puede ser usar un segundo anticuerpo sin un conjugado fluorescente, y entonces añadir el conjugado fluorescente en una etapa posterior. Obsérvese que esto también puede incluir una etapa de enjuagado adicional antes de añadir el conjugado fluorescente.

Etapa 6: El recipiente de reacción (19) se enjuaga entonces de nuevo con un tampón para eliminar la proteína no unida, y el exceso de etiqueta fluorescente.

Etapa 7: La cantidad del analito diana capturado se cuantifica entonces mediante la cantidad de luz fluorescente emitida por el anticuerpo de detección como resultado de la irradiación de la etiqueta química fluorescente con la longitud de onda de excitación apropiada sobre el recipiente de reacción (19).

Etapa 8: La cantidad de analito dentro del recipiente de reacción (19) es proporcional a la cantidad de luz emitida por la etiqueta fluorescente del anticuerpo de detección, y por tanto es directamente proporcional a la cantidad de analito dentro de la muestra del paciente.

El controlador (140) mostrado en la Figura 1(b) puede implementarse y configurarse para proporcionar la señalización para realizar el ensayo biológico usando, por ejemplo, las etapas 3-8 expuestas anteriormente.

El alcance de la invención se describe a modo de ejemplo usando la técnica de ensayo biológico ELISA intercalado. Sin embargo, no se pretende que el alcance de la invención esté limitado a usar la técnica de ensayo biológico ELISA intercalado, por ejemplo, también se conciben realizaciones que usan otros tipos o clase de técnicas de ensayo biológico ya sea conocidas actualmente o desarrolladas posteriormente en el futuro, incluyendo un ELISA "indirecto", un ELISA competitivo, un ELISA inverso, así como otras técnicas distintas de ELISA.

Figura 3: Geometría de canal

A modo de ejemplo, la Figura 3 muestra la geometría de canal de un canal de aislamiento (5) que puede formar parte de la subunidad microfluidica (3) mostrada en la Figura 1 (b) según algunas realizaciones de la presente invención.

La Figura 3a muestra ejemplos de un canal cuadrado, un canal llenado parcialmente y un canal neumático.

En algunas realizaciones, el canal puede llenarse parcialmente con un cordón de sección triangular de polidimetilsiloxano (PDMS) para formar una superficie de conformación para un sello de membrana, configurada para acoplarse a una superficie externa del elemento hueco (14). Véase la Figura 3c. A modo de ejemplo, el llenado parcial de un canal con PDMS puede usarse para acoplarse a la superficie exterior del elemento hueco para reducir el volumen libre en torno al cilindro.

- Si no se usa relleno (canal cuadrado), entonces el canal no puede cerrarse mediante la membrana, que puede adoptar la forma de una capa muy delgada de PDMS. Véase la Figura 3b, en la que la presión del aire, por ejemplo del control neumático de una microválvula, puede empujar parcialmente la membrana hacia abajo al interior del canal, pero todavía puede dar como resultado un trayecto de fuga fluido, tal como se muestra.

- Alternativamente, el uso de un mayor grado de relleno reduce la tensión sobre la membrana, reduce la presión del aire requerida, pero crea una oclusión de canal.

El PDMS es un material que pertenece a un grupo de compuesto de organosilicio polimérico que se denominan comúnmente siliconas. El material de PDMS no fluoresce, lo que es importante en el procesamiento de la señal luminosa recibida de vuelta desde el recipiente de reacción (19).

Las Figuras 3e(1) y 3e(2) muestran el elemento hueco (14) encajado dentro de las paredes W1, W2 del alojamiento (16) que forma parte del canal de aislamiento (5). Véanse la Figura 1b y la Figura 3b. El elemento hueco (14) se retiene en el canal mediante encaje por fricción con las paredes W1, W2. Existe un espacio libre entre el exterior del elemento hueco (14) y las paredes de canal W1, W2.

Las Figuras 3f(1) y 3f(2) muestran el elemento hueco (14) encajado dentro de las paredes W1, W2 del alojamiento (16) que forma parte del canal de aislamiento (5) con el relleno. Véase la Figura 1b y las Figuras 3b y 3c. El elemento hueco (14) se retiene en el canal (5) mediante un material de relleno que puede adoptar la forma de un material de tipo epoxi, caucho de silicona, etc., colocado en el suelo del canal antes de la inserción del encaje de elemento hueco (14). Alternativamente, el canal de aislamiento (5) puede llenarse completamente alrededor del encaje de elemento hueco (14) para bloquear completamente el flujo alrededor de la partícula.

En la Figura 3g, una matriz de selección de epoxi muestra filas de epoxi en relación con columnas de parámetros, que incluyen indicación de tipo, viscosidad, disponible, fluorescencia de fondo, método de curado, comentario y aceptable. El material de PDMS incluye los materiales Sylgard 184, Sylgard 186 y Nusil enumerados.

Figura 4: Bomba activada neumáticamente

La Figura 4 muestra, a modo de ejemplo, un prototipo de una bomba accionada neumáticamente que tiene válvulas, un pistón, un canal fluido y conductos neumáticos según algunas realizaciones de la presente invención. En la Figura 4, el desplazamiento de pistón para este prototipo es de aproximadamente 200 nL (nanolitros), que puede ser más lejos que lo que es probable que se requiera.

Figura 5: Operación de bombeo

La Figura 5 muestra un ejemplo de la operación de bombeo en relación con válvulas y un pistón dispuesto entre un depósito de entrada y un destino según algunas realizaciones de la presente invención. En la Figura 5, la operación de bombeo incluye un bombeo que se lleva a cabo combinando 2 válvulas accionadas neumáticamente V1, V2 con al menos un pistón accionado neumáticamente ubicado entre las dos válvulas V1, V2. El propósito del pistón es simplemente desplazar fluido, o bien tirando de él desde un depósito o bien empujándolo en la dirección del flujo. Las válvulas V1, V2, que respaldan el pistón, garantizan un flujo unidireccional. La operación completa se lleva a cabo accionando los 3 componentes en una secuencia particular. Por ejemplo, para mover fluido desde el depósito de entrada hasta el destino, tal como se muestra en la Figura 5, una secuencia de válvula puede implicar lo siguiente: cerrar la válvula V1, comprimir el pistón, cerrar la válvula V2, abrir la válvula V1, descomprimir el pistón, cerrar la válvula V1, abrir la válvula V2 y comprimir el pistón. En una red mayor de canales y válvulas, el flujo puede generarse combinando cualquier conjunto de 2 válvulas y un pistón. En otras palabras, las válvulas pueden usarse doblemente como válvulas de apertura y cierre simple o pueden incorporarse en una bomba como se describe en este caso.

Figura 6: Diversas arquitecturas cuádruplex

A modo de ejemplo, las Figuras 6a(1), 6b, 6c y 6d muestran diversas arquitecturas cuádruplex para realizar un ensayo según algunas realizaciones de la presente invención. Por ejemplo, la Figura 6a(1) muestra una arquitectura cuádruplex con control de bombeo independiente y depósitos de residuos individuales, y la Figura 6a(2) muestra los estados NC (accionados por vacío) para el bombeo de tampón (1 ciclo completo) para la arquitectura cuádruplex mostrada en la Figura 6a(1), según algunas realizaciones de la presente invención. En la red fluidica mostrada en la Figura 6a(1), hay varios canales fluidicos C1, C2, C3, C4 con válvulas accionadas neumáticamente V ubicadas en

diversas ubicaciones a lo largo de los canales. Las válvulas V conectadas entre sí se accionan simultáneamente. El conjunto de válvula 3 son pistones y el conjunto de válvula 4 son las válvulas de salida y se usan para todas las operaciones de bombeo independientemente de la fuente de fluido. Dependiendo de qué fluido se esté bombeando (muestra, tampón o Ab de detección) la válvula particular usada en combinación para proporcionar bombeo puede ser 1, 8 ó 7 respectivamente. La Figura 6a(2) mostrada en el diagrama de estados para una secuencia completa requerida para bombear el tampón desde la fuente a través de los canales principales y fuera de sus respectivos depósitos de residuos.

A modo de ejemplo, la Figura 6b muestra una arquitectura cuádruplex con control de bombeo independiente similar al cuádruplex en la Figura 6a(1), pero con un depósito de residuos común W que alimenta desde los canales de aislamiento (5).

A modo de ejemplo, la Figura 6c muestra un ejemplo de una arquitectura cuádruplex con un control de bombeo común y un depósito de residuos común similar al cuádruplex en la Figura 6b, pero con un canal de derivación que alimenta desde el microcanal hasta el depósitos de residuos comunes.

A modo de ejemplo, la Figura 6d muestra un ejemplo de una arquitectura cuádruplex con un control de bombeo común, un depósito de residuos común y un canal de derivación similar al cuádruplex en la Figura 6c, pero con un canal de rehidratación de anticuerpo.

Método para realizar un ensayo usando una técnica de separación

La presente invención también puede adoptar la forma de un método para realizar el proceso de ensayo usando una técnica de separación nueva y única consistente con lo expuesto anteriormente. El método puede implementarse proporcionando los medios expuestos anteriormente para separar automáticamente componentes en los que se producen reacciones cruzadas negativas, y empleando el cartucho desechable de ensayo microfluídico que automatizará algunas de las etapas manuales asociadas normalmente con estos tipos de pruebas. La técnica de separación expuesta en el presente documento para realizar el proceso de ensayo eliminará la necesidad de diseño en torno a la reactividad cruzada.

A modo de ejemplo, el método para realizar un ensayo puede implementarse usando la tecnología microfluídica en la Figura 1 tal como sigue:

proporcionar un cartucho de ensayo microfluídico (1) que contiene al menos un pocillo de entrada de muestra (2) configurado para recibir una muestra; y una subunidad microfluídica (3) asociada con el cartucho de ensayo microfluídico (1) y configurada para recibir de manera controlable la muestra desde el cartucho de ensayo microfluídico (1); comprendiendo la subunidad microfluídica (3) canales microfluídicos (8), microválvulas (4, 4a, 9) y al menos un canal de aislamiento independiente y aislado fluidicamente (5), y al menos un recipiente de reacción (19), comprendiendo el recipiente de reacción (19) al menos un elemento hueco (14) que se ha funcionalizado con un resto de captura o moléculas de captura (15);

responder a señalización que contiene información sobre la realización del ensayo con los canales microfluídicos (8) y microválvulas (4, 9), y recibir de manera controlable la muestra y el al menos un reactivo en el al menos un recipiente de reacción (19), para proporcionar luz que contiene información sobre el ensayo realizado en la muestra dentro del al menos un elemento hueco (14) como resultado del al menos un reactivo.

El método también puede comprender responder a la señalización que contiene información sobre la realización del ensayo con los canales microfluídicos (8) y las microválvulas (4, 9) e introducir en el recipiente de reacción (19) lo siguiente:

reactivos de ensayo (7), incluyendo una pluralidad de reactivos (R1, R2, R3, R4), tal como anticuerpos marcados,

reactivos, incluyendo un sustrato enzimático (10), para producir una señal emitida, y

una disolución de lavado (11) para eliminar cualquier proteína o anticuerpo unido de manera inespecífica; y

permitir con el al menos un recipiente de reacción (19) que tengan lugar reacciones químicas para realizar el ensayo, y proporcionar la luz emitida que contiene información sobre el ensayo realizado que debe interrogarse, por ejemplo mediante el sistema de detección (13).

Adicionalmente, a modo de ejemplo, el método para realizar un ensayo también puede implementarse usando la tecnología microfluídica en la Figura 2.

Además, a modo de ejemplo, el método para realizar un ensayo biológico también puede implementarse usando las etapas expuestas anteriormente, incluyendo las expuestas en relación con la Figura 1(c).

El ensayo

Pueden realizarse muchos tipos y clases diferentes de ensayos usando la presente invención, incluyendo un ensayo químico o un ensayo biológico.

5 Por ejemplo puede realizarse un ensayo biológico singular y multiplexado usando al menos un cilindro, tubo o partícula de vidrio hueco funcionalizado (14) en un canal de aislamiento diferente (5), usando múltiples cilindros, tubo o partículas de vidrio huecos funcionalizados (14) en el mismo canal de aislamiento (5), o usando múltiples cilindros, tubo o partículas de vidrio huecos funcionalizados (14) en múltiples canales de aislamiento (5).

10 Adicionalmente puede realizarse un ensayo multiplexado biológico usando múltiples recipientes de reacción, cada uno con diferentes concentraciones de moléculas de captura, todos ubicados en un único canal de aislamiento. Por ejemplo, un primer canal de aislamiento C1 puede incluir tres recipientes de reacción, uno con una baja concentración de moléculas de captura inmovilizadas sobre el mismo, un segundo recipiente de reacción con una alta concentración de moléculas de captura inmovilizadas sobre el mismo, y un tercer recipiente de reacción con una concentración incluso mayor de moléculas de captura inmovilizadas sobre el mismo. Un segundo canal de aislamiento podrá incluir recipientes de reacción con el mismo intervalo de concentraciones de captura o un intervalo completamente diferente de concentraciones de captura o un conjunto de recipientes de reacción todos con la misma concentración de reacción. Adicionalmente puede realizarse un ensayo multiplexado biológico usando múltiples recipientes de reacción, cada uno con diferentes diámetros interiores, todos ubicados en el mismo canal de aislamiento. Por ejemplo, un primer canal de aislamiento C1 puede incluir tres recipientes de reacción, uno con un diámetro interior y área superficial pequeños, un segundo recipiente de reacción con un diámetro interior y un área superficial grandes, y un tercer recipiente de reacción con un diámetro interior y un área superficial incluso mayores, para introducir diferentes cinéticas de reacción. Un segundo canal de aislamiento C2 podrá contener el mismo conjunto de recipientes de reacción con el mismo intervalo de diámetros interiores o contener un conjunto completamente diferente de recipientes de reacción con un intervalo diferente de diámetros interiores o todos con los mismos diámetros.

20 Todavía adicionalmente puede realizarse un ensayo multiplexado biológico usando controles positivos y negativos. Por ejemplo, un primer canal de aislamiento C1 puede incluir usar un control positivo, y un control negativo mientras que un segundo canal de aislamiento C2 también puede incluir usar un control positivo y negativo que no debe reaccionar. Además, ensayos biológicos con controles +/- pueden incluir usar cilindros, tubos o partículas de vidrio huecos funcionalizados (14) que tienen diferentes anticuerpos, en los que el control + alcanza su máximo y el control - no reacciona, pero puede usarse, por ejemplo, para obtener información sobre fluorescencias de fondo.

30 Todavía adicionalmente puede realizarse un ensayo multiplexado biológico usando diferentes canales que tienen diferentes números de analitos, por ejemplo, un primer canal de aislamiento C1 pueden incluir un primer número de analitos (por ejemplo 1), un segundo canal de aislamiento C2 puede incluir un segundo número de analitos (por ejemplo 3) y un tercer canal de aislamiento C3 puede incluir un tercer número de analitos,..., un Nésimo canal de aislamiento tiene un número Nésimo de analitos.

35 Todavía adicionalmente puede realizarse un ensayo multiplexado biológico usando diferentes canales de aislamiento que tiene diferentes ensayos biológicos. Por ejemplo, un primer canal de aislamiento C1 puede incluir un primer ensayo biológico A, un segundo canal de aislamiento C2 puede incluir un segundo ensayo biológico B y un tercer canal de aislamiento C3 puede incluir un tercer ensayo biológico A+B, de modo que los canales pueden mirarse individual y conjuntamente, ensayo biológico de canal B y ensayo biológico de canal A + B que pueden usarse para proporcionar información adicional sobre el ensayo biológico de canal A.

40 En resumen, la presente invención proporciona la posibilidad de un intervalo amplio de conceptos múltiples híbridos (o convencionales), incluyendo (1) múltiples recipientes de reacción en el mismo canal de aislamiento, funcionalizado con diferentes densidades de carga para ampliar el intervalo dinámico; (2) múltiples recipientes de reacción con diferentes diámetros interiores, en el mismo canal de aislamiento, para introducir diferentes cinéticas de reacción; (3) múltiples recipientes de reacción que tienen recipientes de reacción de control positivo y negativa en el mismo canal de aislamiento; (4) múltiples recipientes de reacción con diferentes restos de captura en el mismo canal de aislamiento, para el propósito de proporcionar una reacción multiplexada (convencional); y (5) múltiples recipientes de reacción para llevar a cabo reacciones monoplex y múltiple de modo que los resultados pueden compararse.

45 También se pretende que el alcance de la invención incluya otros tipos o clases de ensayos, incluyendo un ensayo químico o un ensayo biológico, ya sea conocido actualmente o desarrollado posteriormente en el futuro.

Figura 7

65 En las Figuras 7a y 7b, un chip microfluídico que consiste en canales fluidicos, incluyendo aislamiento con tres recipientes de reacción incrustados, conductos de control neumático y orificios de entrada/salida, en el que los tres recipientes de reacción están incrustados en el canal de aislamiento. A modo de ejemplo, los recipientes de reacción

tienen una longitud de aproximadamente 500 micras, tienen un diámetro exterior (DE) = aproximadamente 150  $\mu\text{m}$ , y tienen un diámetro interior (DI) = aproximadamente 30  $\mu\text{m}$ .

5 Las Figuras 7c(1) y 7c(2) muestran la evolución de señal en tiempo real debido a la unión de Ac secundario (IL6) a antígeno capturado previamente dentro de 3 recipientes de reacción incrustados, e imágenes de fluorescencia de tres recipientes de reacción incrustados tomadas 15 minutos tras hacer fluir Ab de detección a través del canal de aislamiento y el recipiente de reacción incrustado.

10 La Figura 7d muestra curvas de dosis-respuesta para un ensayo de intercalación de IL6 realizado en los recipientes de reacción en modo discontinuo. Cada punto de datos representa un subconjunto de recipientes de reacción, tomados del mismo lote original de recipientes de reacción, pero mezclados con diferentes concentraciones de antígeno IL6 que oscilan entre 0  $\text{pg/ml}$  y 100.000  $\text{pg/ml}$ . Se muestra claramente la respuesta al cambio de concentración de antígeno. Este proceso de modo discontinuo se usará tanto para caracterizar un conjunto particular de recipientes de reacción como para verificar la calidad del lote en el componente muy barato.

15 Las ventajas de recipientes de reacción incrustados incluyen las siguientes:

20 (1) Los recipientes de reacción se preparan rebanando hilos largos de tubos de vidrio huecos con la dimensiones externa e interna preferida para dar secciones cortas de aproximadamente 100-500  $\mu\text{m}$  de longitud.

(2) Dado que el material de partida de vidrio está hecho con un proceso de fabricación de fibras ópticas, que se ha optimizado sumamente a lo largo de las últimas 2 décadas, y se rebana con máquinas de corte con diamante de precisión, el control de dimensión de los recipientes de reacción es bastante excelente.

25 (3) Dado que el interior del recipiente de reacción se funcionaliza en un proceso discontinuo, lo que significa que hasta miles de recipientes de una vez se recubren con la misma disolución de Ab, puede conseguirse un control estadístico estrecho del resto de unión activo.

30 (4) Lotes grandes de recipientes de reacción significa que el control de calidad estricto y la caracterización del elemento activo del ensayo biológico pueden realizarse a un coste muy bajo y con una alta significancia estadística.

(5) El interior de los recipientes de reacción está protegido por la superficie externa, lo que posibilita técnicas simples y robustas para recoger y colocar los recipientes de reacción en los canales de aislamiento sin riesgo de dañar la superficie frágil.

35 Figura 8

40 La Figura 8 muestra que el elemento hueco puede estar configurado como panal de abeja con múltiples cavidades o cámaras axiales que proporciona, cuando está funcionalizado, una razón de superficie con respecto a volumen altamente aumentada en comparación con un recipiente de reacción que tiene una única cavidad o cámara axial que proporciona el beneficio de cinéticas de reacción superiores y que también proporciona una interrogación de señal aumentada para el mismo volumen efectivo.

45 La tecnología microfluídica

50 A modo de ejemplo, el término "microfluídica" se entiende generalmente que significa o trata sobre el comportamiento, control preciso y manipulación de fluidos que están restringidos geoméricamente a una escala pequeña, normalmente submilimétrica. En la presente solicitud, la tecnología microfluídica descrita en el presente documento pretende incluir la tecnología dimensionada en un intervalo de aproximadamente 20 micras a aproximadamente 1000 micras, aunque no se pretende que el alcance de la invención esté limitado a ningún intervalo particular.

## REIVINDICACIONES

- 1.- Un aparato para realizar un ensayo, incluyendo un ensayo químico, biológico o bioquímico, en una muestra que comprende:
- 5 un cartucho o dispositivo de ensayo microfluídico (1) que contiene al menos un pocillo de entrada de muestra (2) configurado para recibir una muestra; y
- 10 una subunidad microfluídica (3) asociada con el cartucho o dispositivo de ensayo microfluídico (1) que comprende canales microfluídicos (5; C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>), microválvulas (4, 4a, 9) y al menos una región de superficie, estando funcionalizada la al menos una región de superficie con un resto o moléculas de captura (15) para formar al menos una región de reacción;
- 15 estando los canales microfluídicos (5; C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>) y las microválvulas (4, 4a, 9) configurados para responder a señalización que contiene información sobre la realización del ensayo y para recibir de manera controlable la muestra y al menos un reactivo en la al menos una región de reacción, caracterizado porque: la región de reacción incluye al menos un elemento hueco (14), estando funcionalizado el al menos un elemento hueco (14) en su superficie interna con un resto o moléculas de captura (15) para formar al menos un recipiente de reacción (19), estando configurado el aparato para proporcionar desde el al menos un recipiente de reacción (19) luz que contiene información sobre el ensayo realizado en la muestra dentro del al menos un recipiente de reacción (19) como resultado de dicho al menos un reactivo;
- 20 en el que el cartucho o dispositivo de ensayo microfluídico (1) contiene el al menos un elemento hueco (14) dentro de uno de los canales (5; C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>), en el que existe un espacio libre entre un exterior del elemento hueco (14) y las paredes de canal; y
- 25 en el que el canal (5; C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>) tiene un pistón (P) entre dos microválvulas (V) formando una bomba.
- 2.- El aparato según la reivindicación 1, en el que el elemento hueco (14) es un cilindro, tubo o partícula hueca.
- 30 3.- El aparato según la reivindicación 1 ó 2, en el que el elemento hueco (14) que forma el recipiente de reacción (19) tiene un diámetro más pequeño que los canales microfluídicos (5; C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>).
- 35 4.- El aparato según la reivindicación 1, en el que el elemento hueco (14) que forma el recipiente de reacción (19) puede prepararse estirando un tubo de vidrio y cortando o rebanando dicho tubo de vidrio.
- 40 5.- El aparato según la reivindicación 1, en el que el elemento hueco (14) que forma el recipiente de reacción (19) tiene una longitud de 100 a 500 pm y en el que el elemento hueco (14) que forma el recipiente de reacción (19) tiene un diámetro más pequeño que los canales microfluídicos (5; C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>).
- 6.- El aparato según la reivindicación 1, en el que una pluralidad de los elementos huecos (14) que forman los recipientes de reacción (19) se colocan en el mismo canal microfluídico (5; C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>).
- 45 7.- El aparato según la reivindicación 1, en el que múltiples cilindros o tubos de vidrio huecos funcionalizados (14) están en el mismo canal (5; C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>) o en cada uno de múltiples canales de aislamiento.
- 8.- El aparato según la reivindicación 1, en el que al menos un cilindro o tubo de vidrio hueco funcionalizado (14) está en diferentes canales (5; C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>).
- 50 9.- El aparato según la reivindicación 1, en el que el aparato se construye para realizar un ensayo multiplexado usando diferentes canales (5; C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>) que tienen diferentes ensayos biológicos.
- 10.- El aparato según la reivindicación 1, en el que el aparato se produce mediante un método que incluye funcionalizar el interior del recipiente de reacción (19) en un proceso discontinuo en el que muchos recipientes se recubren de una vez con la misma disolución.
- 55 11.- Un aparato según la reivindicación 1, en el que los canales microfluídicos (5; C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>) y las microválvulas (4, 4a, 9) están configurados para responder a la señalización que contiene información sobre la realización del ensayo y para introducir en el al menos un recipiente de reacción (19) uno o más de los siguientes:
- 60 reactivos de ensayo (7), incluyendo una pluralidad de reactivos de ensayo (R1, R2, R3, R4), que incluyen anticuerpos marcados, y
- 65 reactivos, incluyendo un sustrato enzimático (10), para producir una señal emitida, y

estando configurado el al menos un recipiente de reacción (19) para permitir que tengan lugar reacciones para realizar el ensayo.

5 12.- El aparato según la reivindicación 1, en el que el pistón (P) y las microválvulas (V) están asociados con conductos de control neumático.

10 13.- El aparato según la reivindicación 1, en el que al menos un elemento hueco funcionalizado (14) está en diferentes canales (5; C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>) y en el que, respecto a cada uno de los diferentes canales (5; C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>) el cartucho o dispositivo de ensayo microfluídico (1) contiene el al menos un elemento hueco (14) dentro de un canal (5; C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>) que tiene un pistón microfluídico (P) asociado con microválvulas (V) formando una bomba.

14.- El aparato según la reivindicación 13, en el que cada uno del pistón (P) y las válvulas (V) está asociado con conductos de control neumático.

15 15.- El aparato según la reivindicación 12 o la reivindicación 14, en el que los conductos de control están dispuestos para provocar que los pistones y las válvulas asociadas se hagan funcionar bajo un control de bombeo común.

20 16.- El aparato según la reivindicación 1, en el que el al menos un elemento hueco (14) está configurado como panel de abeja con múltiples cavidades o cámaras axiales.

17.- Un método para realizar un ensayo, incluyendo un ensayo químico o biológico, en una muestra que comprende:

25 proporcionar un cartucho o dispositivo de ensayo microfluídico (1) que contiene al menos un pocillo de entrada de muestra (2) configurado para recibir una muestra; y

una subunidad microfluídica (3) asociada con el cartucho o dispositivo de ensayo microfluídico (1) y configurada para recibir de manera controlable dicha muestra desde dicho cartucho de ensayo microfluídico (1);

30 la subunidad microfluídica (3) que comprende una pluralidad de canales microfluídicos (5; C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>), microválvulas (4, 4a, 9) y al menos una región de superficie, estando funcionalizada la al menos una región de superficie con un resto de captura o moléculas de captura para formar al menos una región de reacción independiente y aislada fluidicamente;

35 responder a señalización que contiene información sobre la realización del ensayo con los canales microfluídicos (5; C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>) y las microválvulas (4, 4a, 9), y recibir de manera controlable la muestra y el al menos un reactivo en la al menos una región de reacción, caracterizado porque:

40 la región de reacción incluye al menos un elemento hueco (14), estando funcionalizado el al menos un elemento hueco en su superficie interna con un resto o moléculas de captura (15) para formar al menos un recipiente de reacción (19), estando configurado el aparato para proporcionar desde el al menos un recipiente de reacción (19) luz que contiene información sobre el ensayo realizado en la muestra dentro del al menos un recipiente de reacción (19) como resultado de dicho al menos un reactivo; y

45 en el que el cartucho o dispositivo de ensayo microfluídico (1) contiene el al menos un elemento hueco (14) dentro de uno de los canales (5; C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>), en el que existe un espacio libre entre un exterior del elemento hueco (14) y las paredes de canal; y

en el que los canales (5; C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>) tienen un pistón (P) entre dos microválvulas (V) formando una bomba.

50 18.- El método según la reivindicación 17, comprendiendo el método además:

55 introducir un volumen preciso de una muestra, incluyendo una muestra de un paciente, incluyendo suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, orina, sangre, etc., haciendo fluir el material al interior del recipiente de reacción (19) que tiene al menos un elemento hueco (14), incluyendo al menos un elemento hueco (14) funcionalizado con un resto de captura, incluyendo mediante presión o bien positiva o bien negativa, tiempo durante el cual un analito diana de interés se retiene gracias a la unión específica a un anticuerpo de captura recubierto sobre la superficie del al menos un elemento hueco (14);

60 enjuagar el recipiente de reacción (19) con una disolución tampón para eliminar mediante lavado la proteína no unida;

65 o bien hacer fluir un segundo anticuerpo, denominado anticuerpo de detección, basándose al menos parcialmente en el hecho de que el segundo anticuerpo está acoplado a una etiqueta fluorescente capaz de emitir una señal luminosa, al interior del recipiente de reacción (19), tras lo cual el segundo anticuerpo se une al analito diana retenido sobre la superficie del al menos un elemento hueco (14) por medio del anticuerpo de captura, o alternativamente hacer fluir un segundo anticuerpo sin un conjugado fluorescente, enjuagar el recipiente de reacción

(19) con un tampón para eliminar mediante lavado la proteína no unida, y entonces añadir un conjugado fluorescente en una etapa posterior;

5 enjuagar el recipiente de reacción (19) con una disolución tampón para eliminar la proteína no unida;

10 irradiar una etiqueta química fluorescente con una longitud de onda de excitación apropiada sobre el recipiente de reacción (19);

15 detectar una cantidad de luz fluorescente emitida por el anticuerpo de detección como resultado de la irradiación; cuantificar una cantidad del analito diana capturado por la cantidad de luz fluorescente emitida por el anticuerpo de detección como resultado de la irradiación de la etiqueta química fluorescente con la longitud de onda de excitación apropiada sobre el recipiente de reacción (19), siendo la cantidad de analito en la superficie del al menos un elemento hueco (14) dentro del recipiente de reacción (19) proporcional a la cantidad de luz emitida por la etiqueta fluorescente del segundo anticuerpo, y por tanto siendo directamente proporcional a la cantidad de analito dentro de la muestra del paciente.

19.- El método según la reivindicación 17, en el que el elemento hueco (14) tiene una longitud de 100 a 500  $\mu\text{m}$ .

20.- El método según la reivindicación 17, en el que el elemento hueco (14) tiene un diámetro más pequeño que los canales microfluídicos (5; C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>).

21.- El método según la reivindicación 17, en el que el elemento hueco (14) que forma el recipiente de reacción (19) tiene una longitud de 100 a 500 pm y en el que el elemento hueco (14) que forma el recipiente de reacción (19) tiene un diámetro más pequeño que los canales microfluídicos (5; C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>).

25

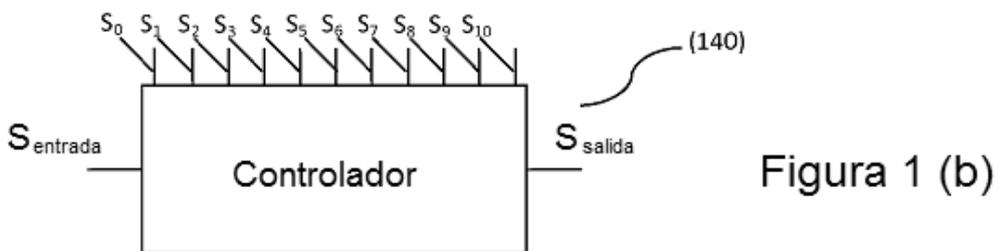
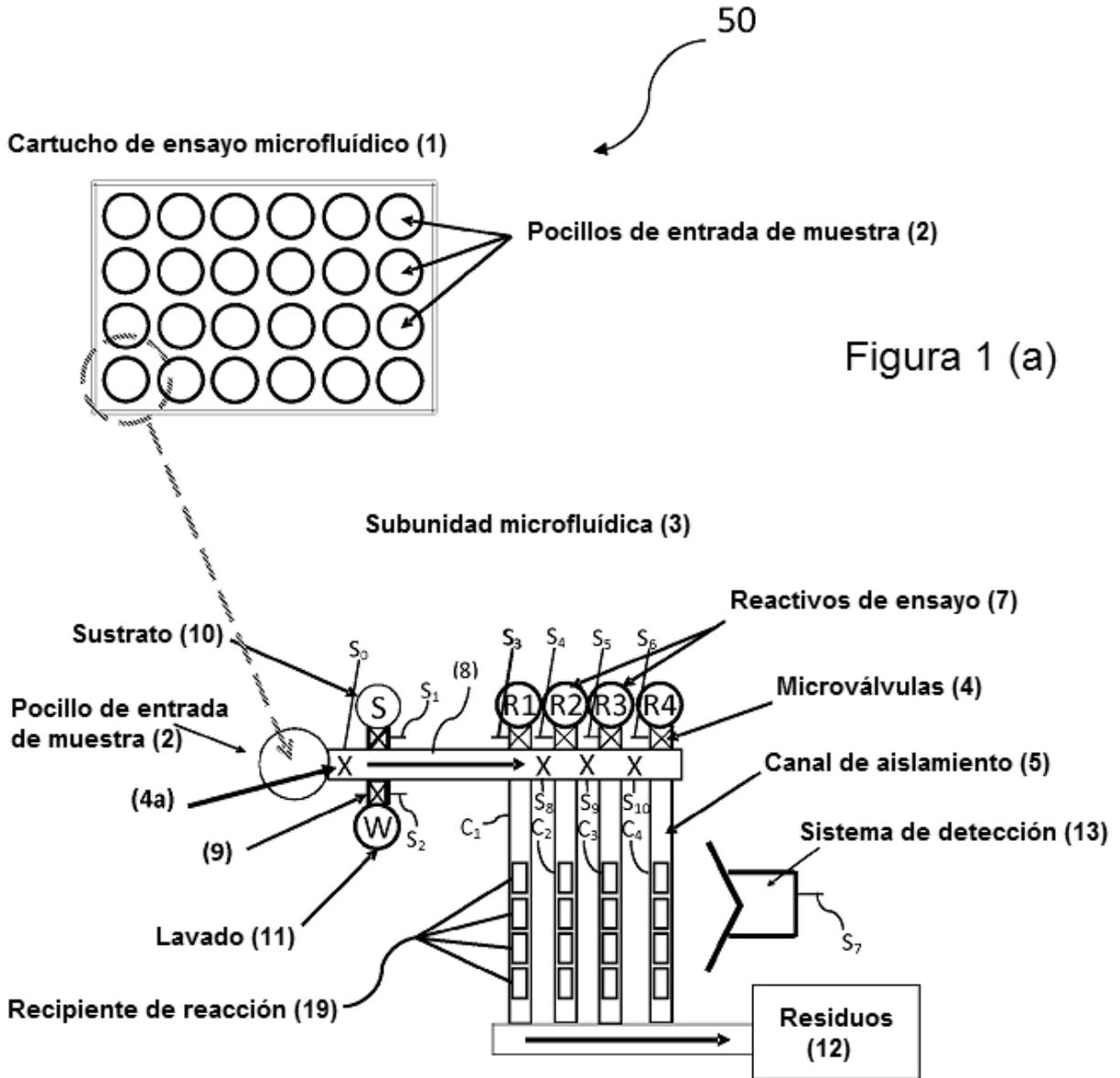
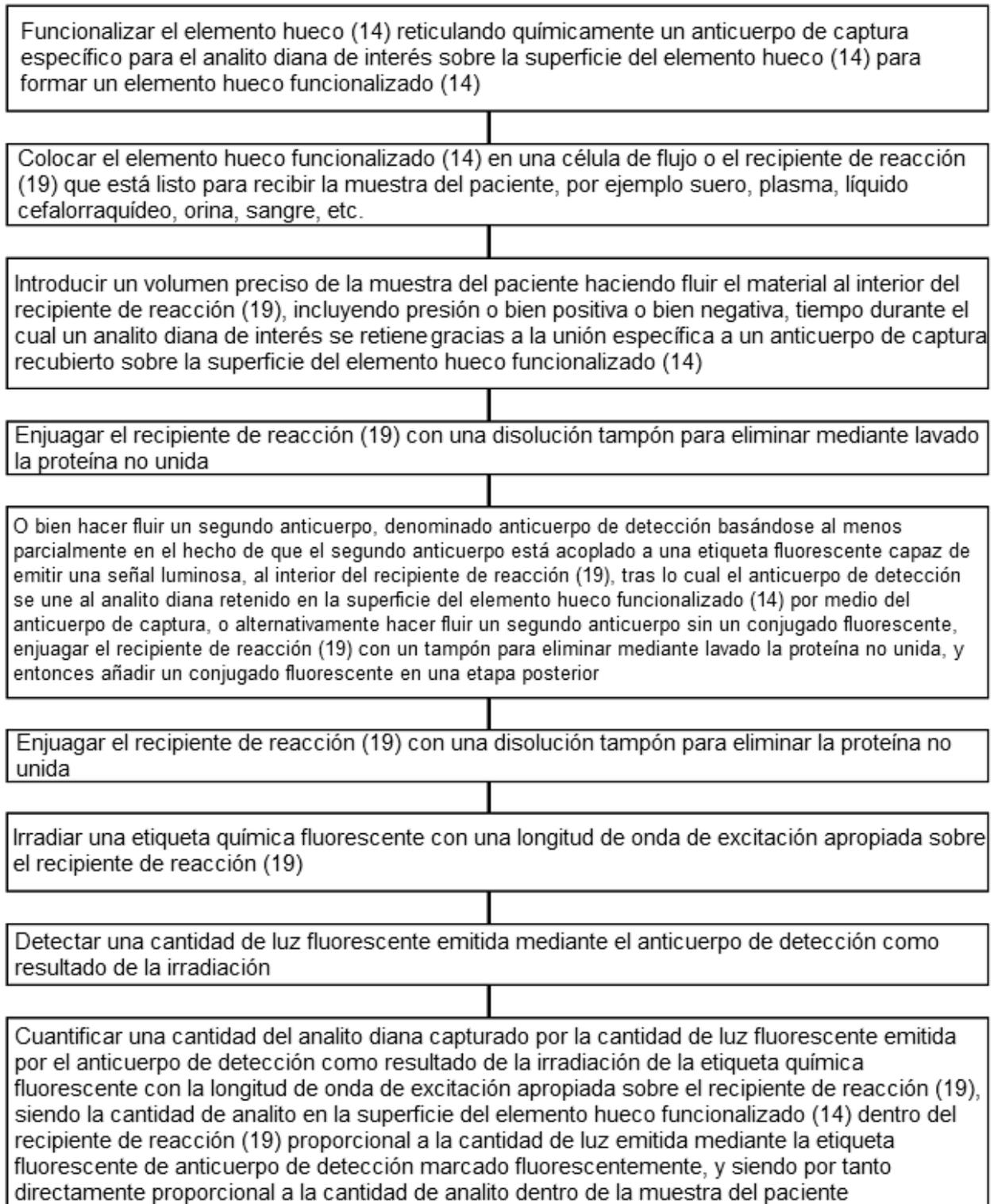


Figura 1

Figura 1(c): UN MÉTODO PARA REALIZAR UN ENSAYO BIOLÓGICO:



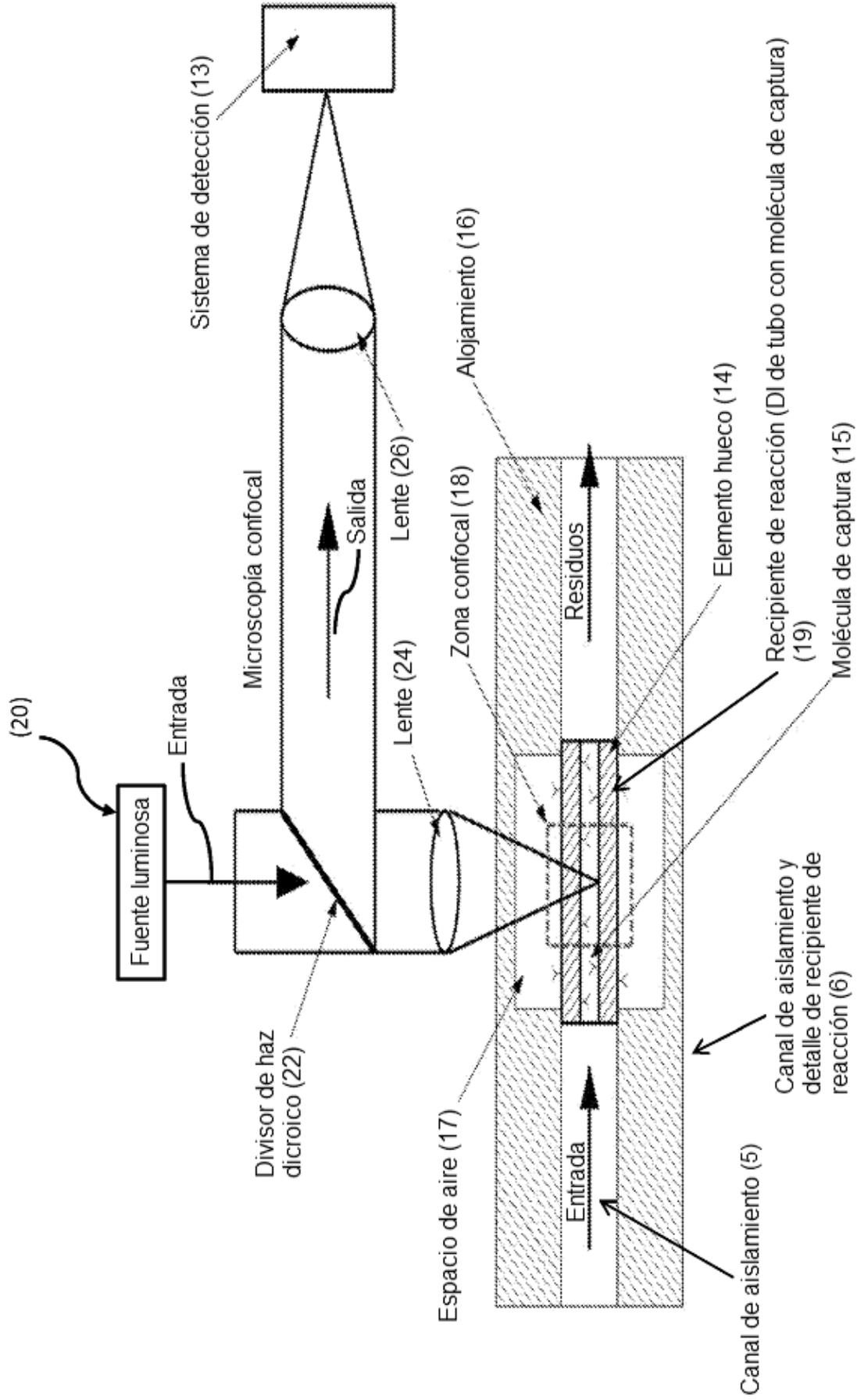


Figura 2: Canal de aislamiento y detalle de recipiente de reacción (6)

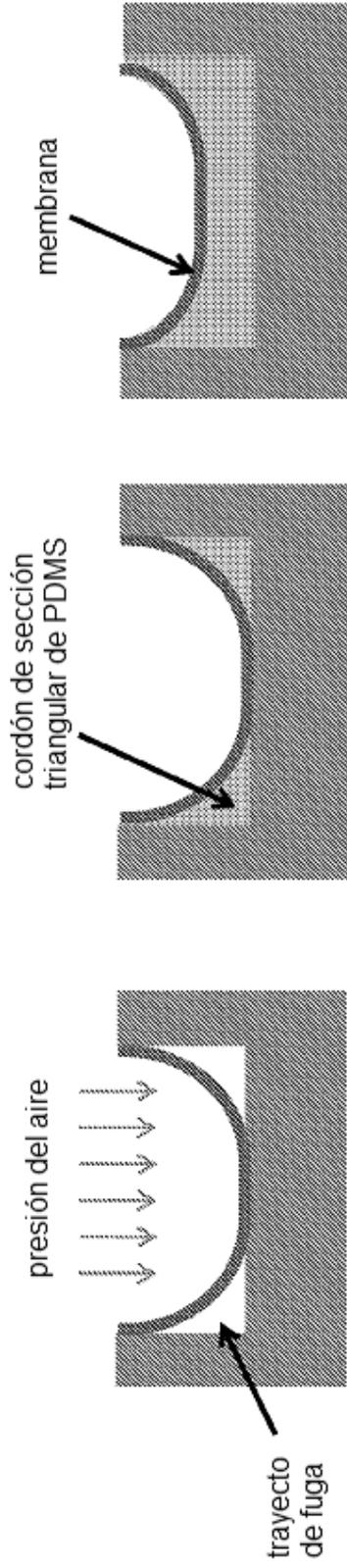
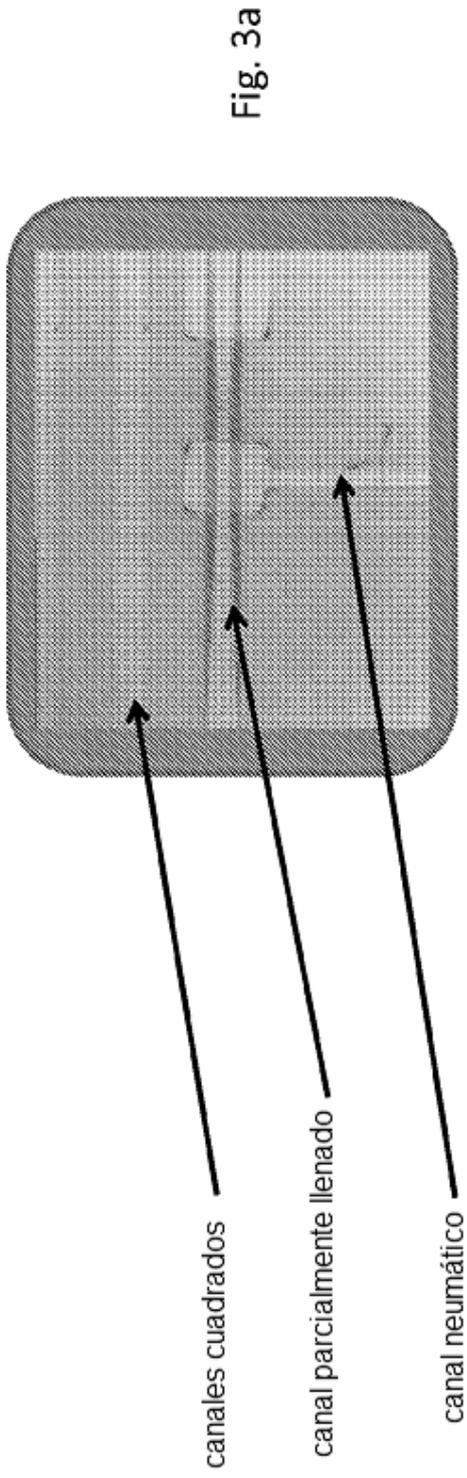


Fig. 3b

Fig. 3c

Fig. 3d

Figura 3: Geometría de canal

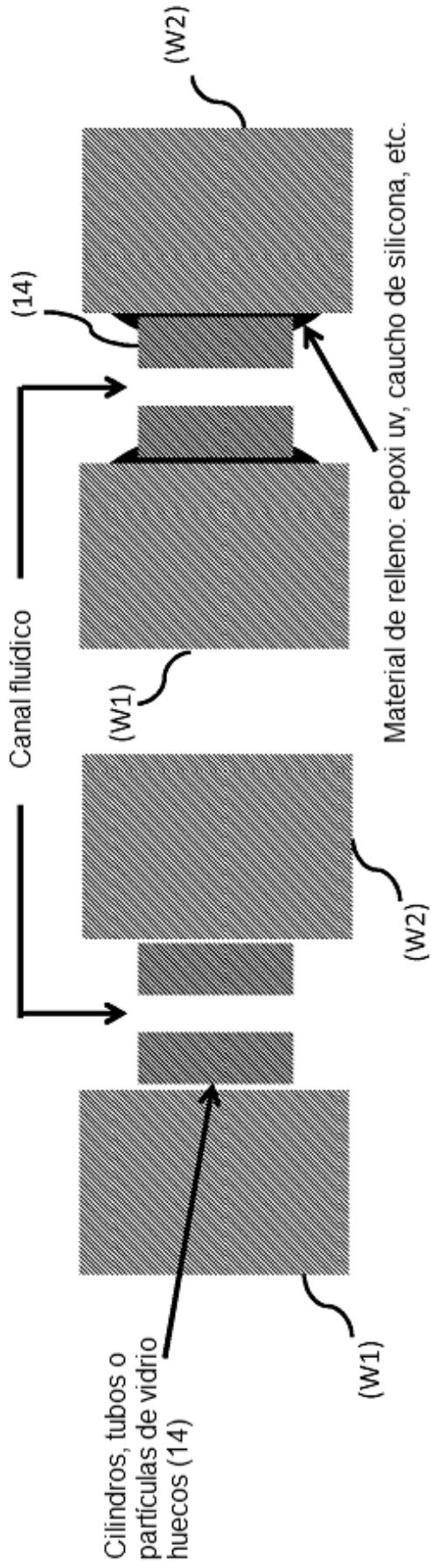


Fig. 3e (1)

Fig. 3f (1)

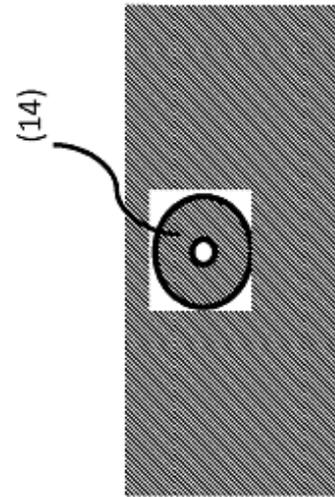


Fig. 3e (2)

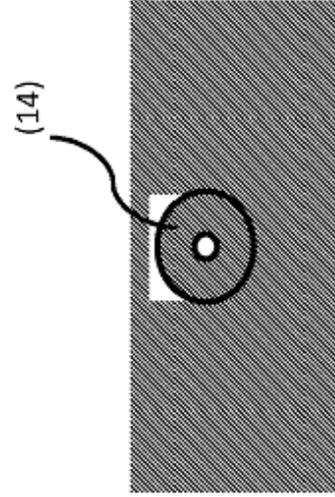


Fig. 3f (2)

Epoxi	Tipo	Viscosidad	Disponible	Flúor	Método de curado	Comentario	Aceptable
Dymax 921 Gel	epoxi curable uv	25 000	sí	alto	uv/térmico	buena viscosidad pero fluorescencia muy alta	no
Loctite 3211	epoxi curable uv	10 000	sí	medio	uv	fluorescencia media	no
Dymax 9622	epoxi curable uv	12 000	sí	bajo	uv	fluorescencia baja	sí
Sylgard 184	encapsulamiento de silicona	3 900	sí	bajo	térmico	24 h a TA, viscosidad demasiado baja	sí
Sylgard 186	encapsulamiento de silicona	7 800	sí	bajo	térmico	24 h a TA, viscosidad demasiado baja	sí
RTV 118	adhesivo de silicona RTV	~ 25 000	sí	bajo	térmico	cura en la punta aprox. 30 min, claridad cuestionable	quizás
"Clear RTV"	adhesivo de silicona RTV	~ 40 000	sí	bajo	térmico	muy grueso y cura en la punta	no
Nusil CF15-2186	elastómero de silicona	80 000	por determinar	p. det.	24 h - TA		por determ.
Nusil R31-2186	adhesivo de silicona RTV	80 000	por determinar	p. det.	24 h - TA		por determ.
Nusil R33-2186	adhesivo de silicona	80 000	por determinar	p. det.	24 h - TA		por determ.
Nusil LS1-6941	adhesivo LSR	75 000	por determinar	bajo	30 min a 75°C	curará a TA	por determ.
Nusil LS-6946	ópticamente elastómero	40 000	por determinar	p. det.	30 min a 75°C	curará a TA	por determ.
Dymax 9621	epoxi curable uv	20 000	por determinar	bajo	uv		por determ.

Fig. 3g: Matriz de selección de epoxi

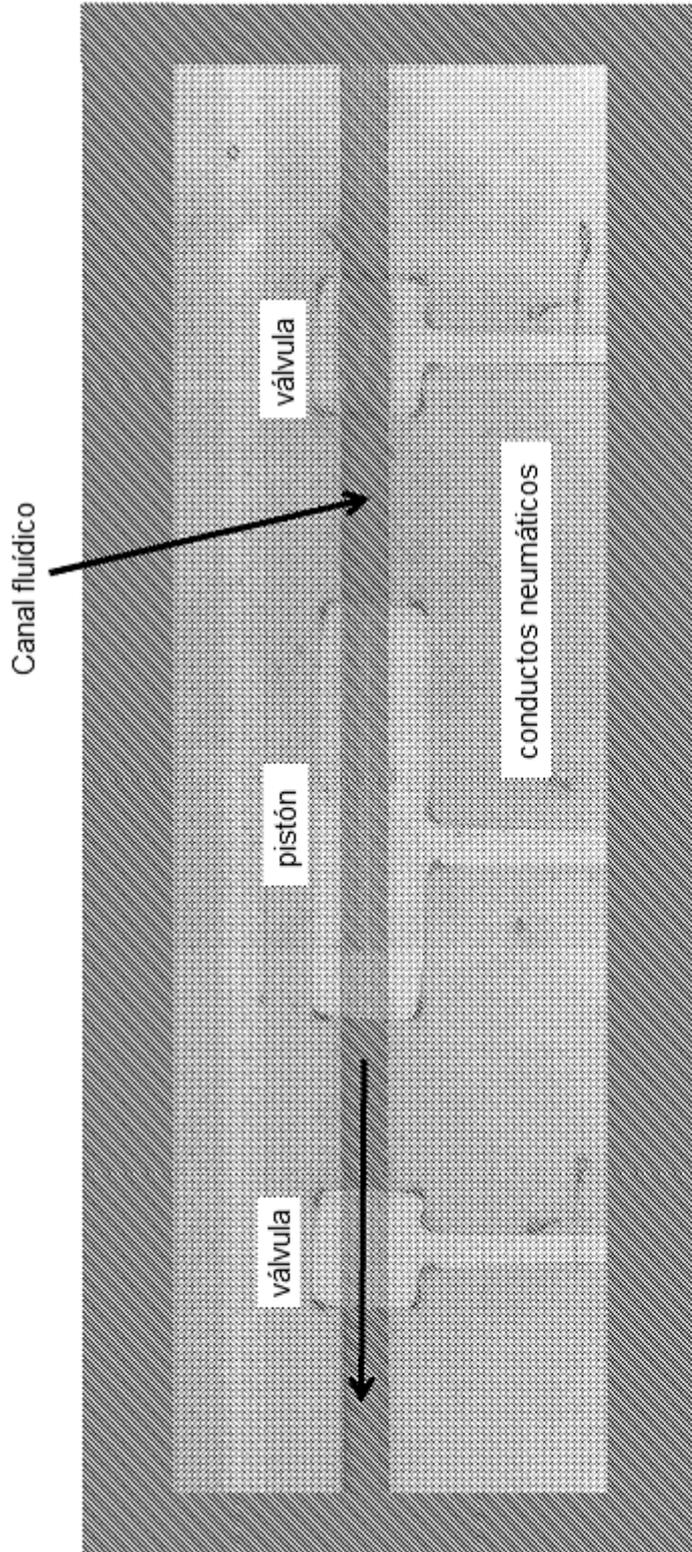


Figura 4: Bomba accionada neumáticamente

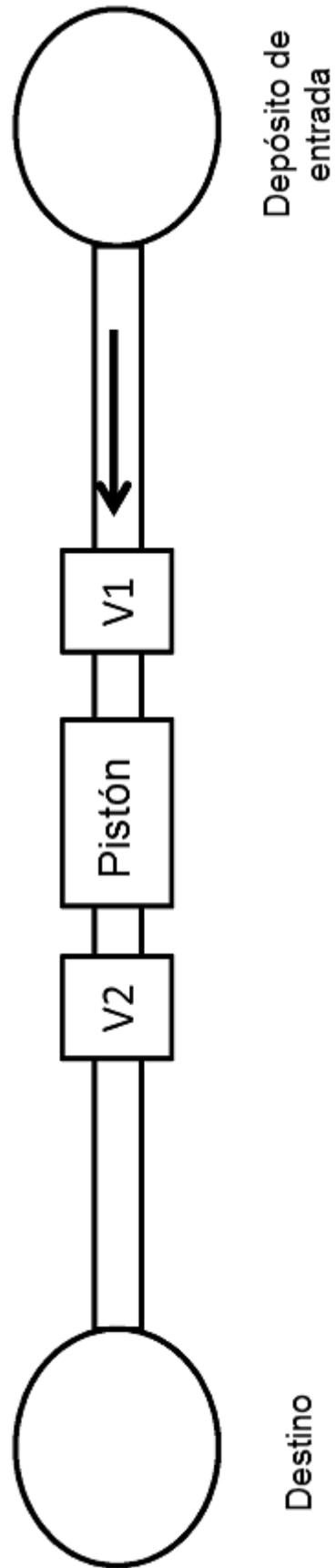


Figura 5: Operación de bombeo

Figura 6: Bombeo de canal independiente de arquitectura cuádruplex

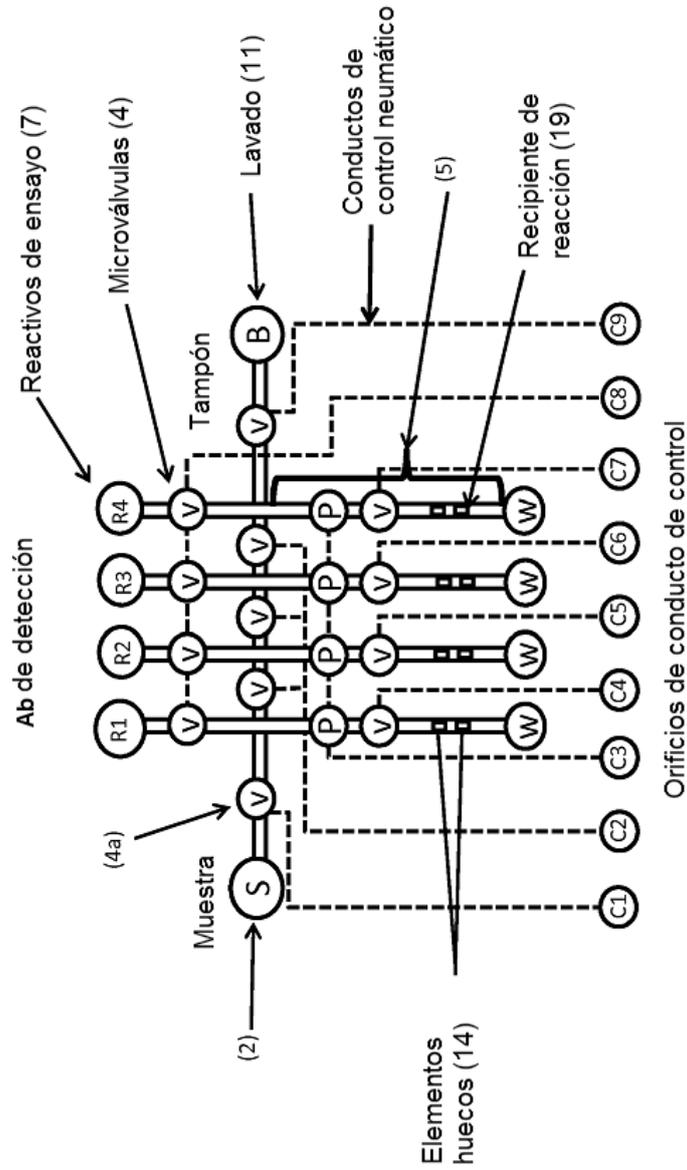


Fig. 6a(1): Arquitectura cuádruplex con control de bombeo independiente y depósitos de residuos individuales.

Estados NC (acc. a vacío) para bombeo de tampón (1 ciclo completo)

Estado	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	1	0	0	0	0	0	0	1
3	0	1	1	0	0	0	0	0	1
4	0	1	1	0	0	0	1	0	1
5	0	1	1	0	0	0	1	0	0
6	0	1	0	0	0	0	1	0	0
7	0	1	0	0	0	0	0	0	0

Fig. 6a(2)

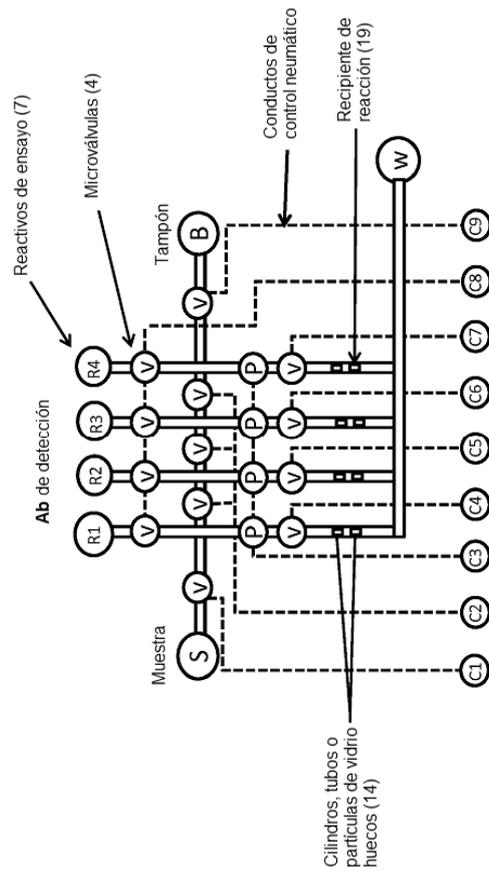


Fig. 6b: Arquitectura cuádruplex con control de bombeo independiente y depósito de residuos común.

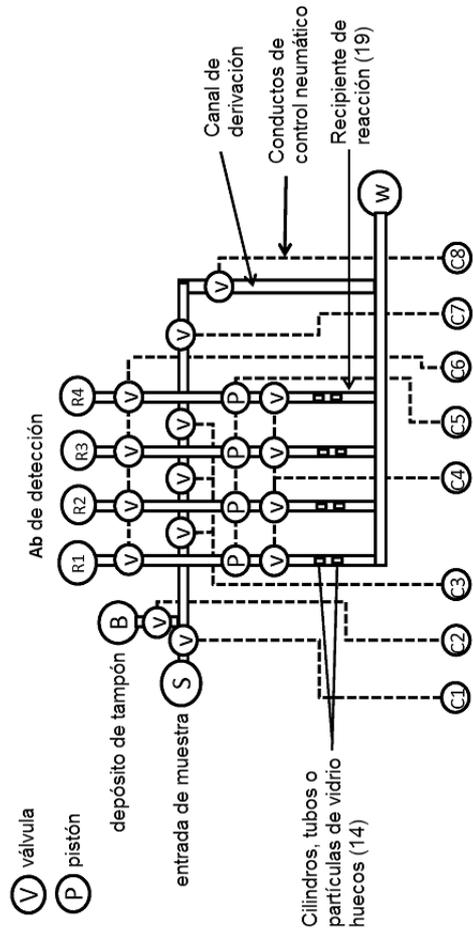


Fig. 6c: Arquitectura cuádruplex con control de bombeo común, depósito de residuos común y canal de derivación.

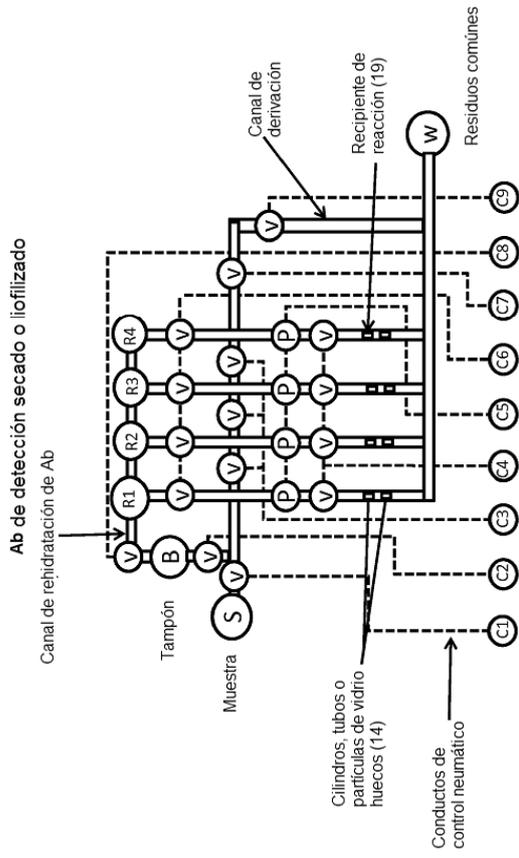
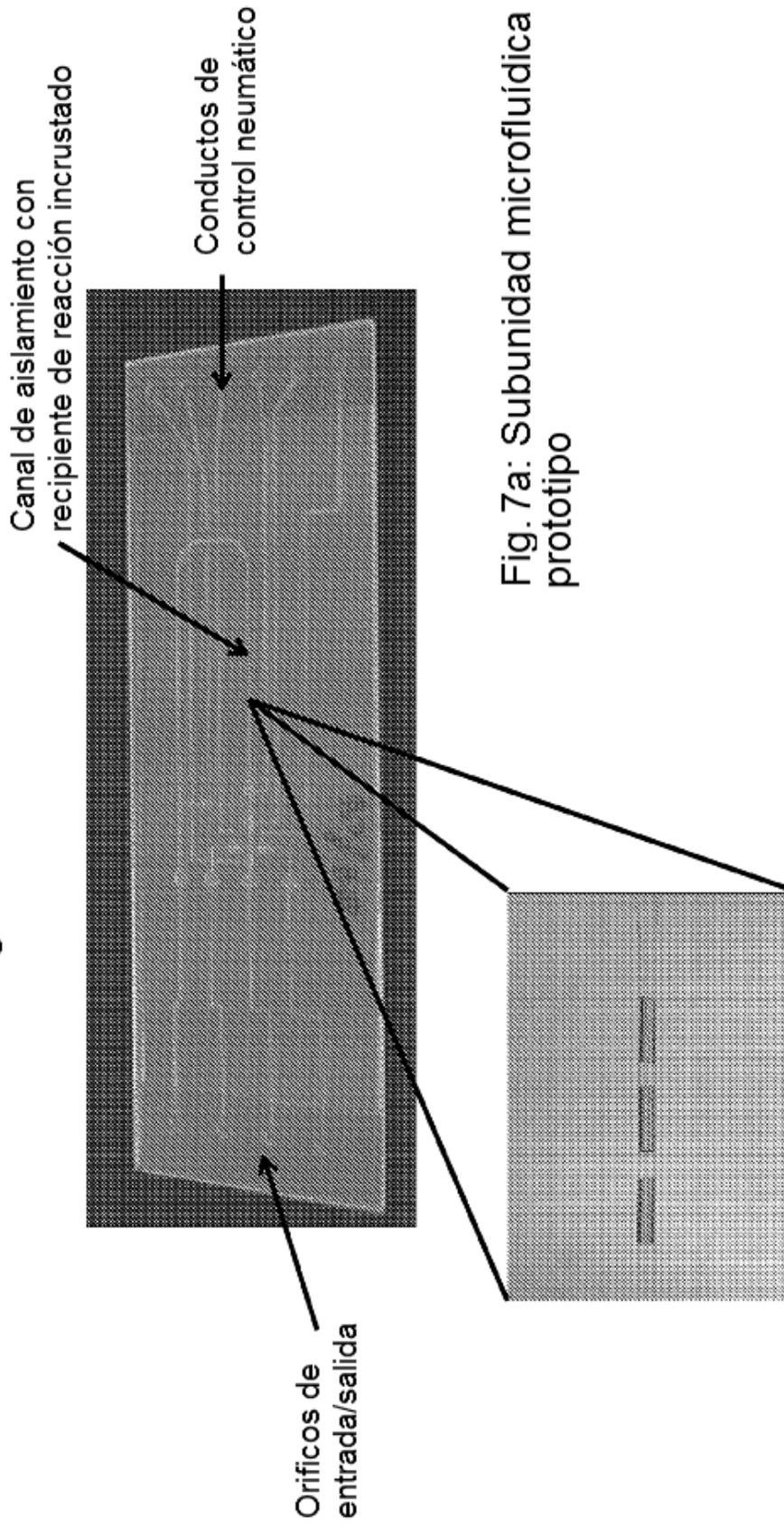


Fig. 6d: Arquitectura cuádruplex con control de bombeo común, depósito de residuos común, canal de derivación y canal de rehidratación de anticuerpo.

Figura 7



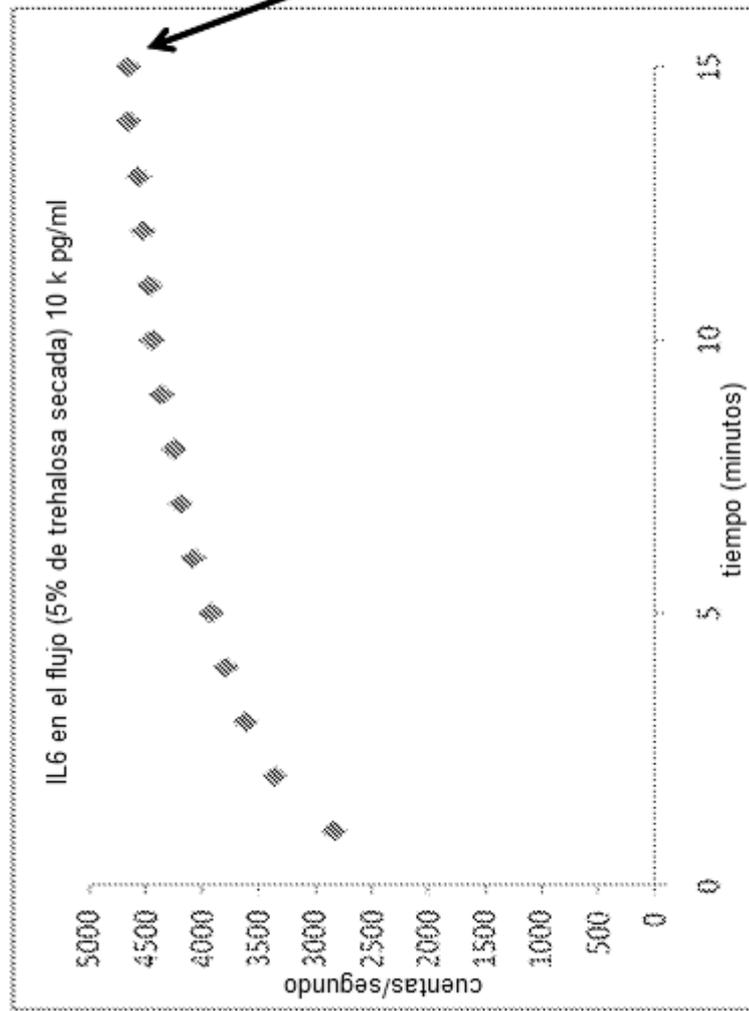


Fig. 7c (1)

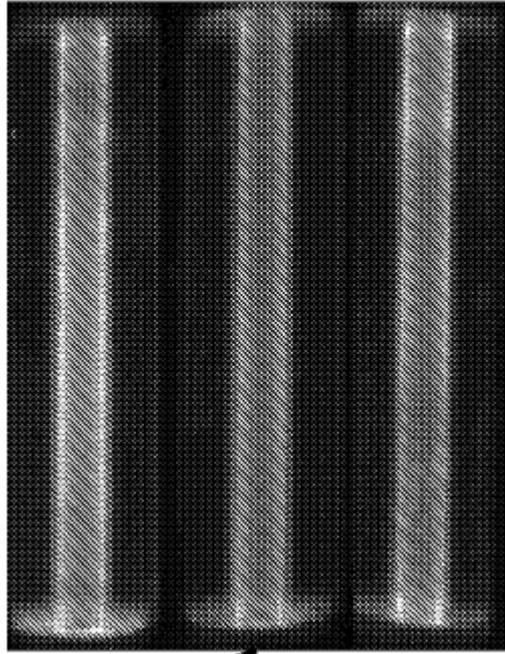


Fig. 7c (2)

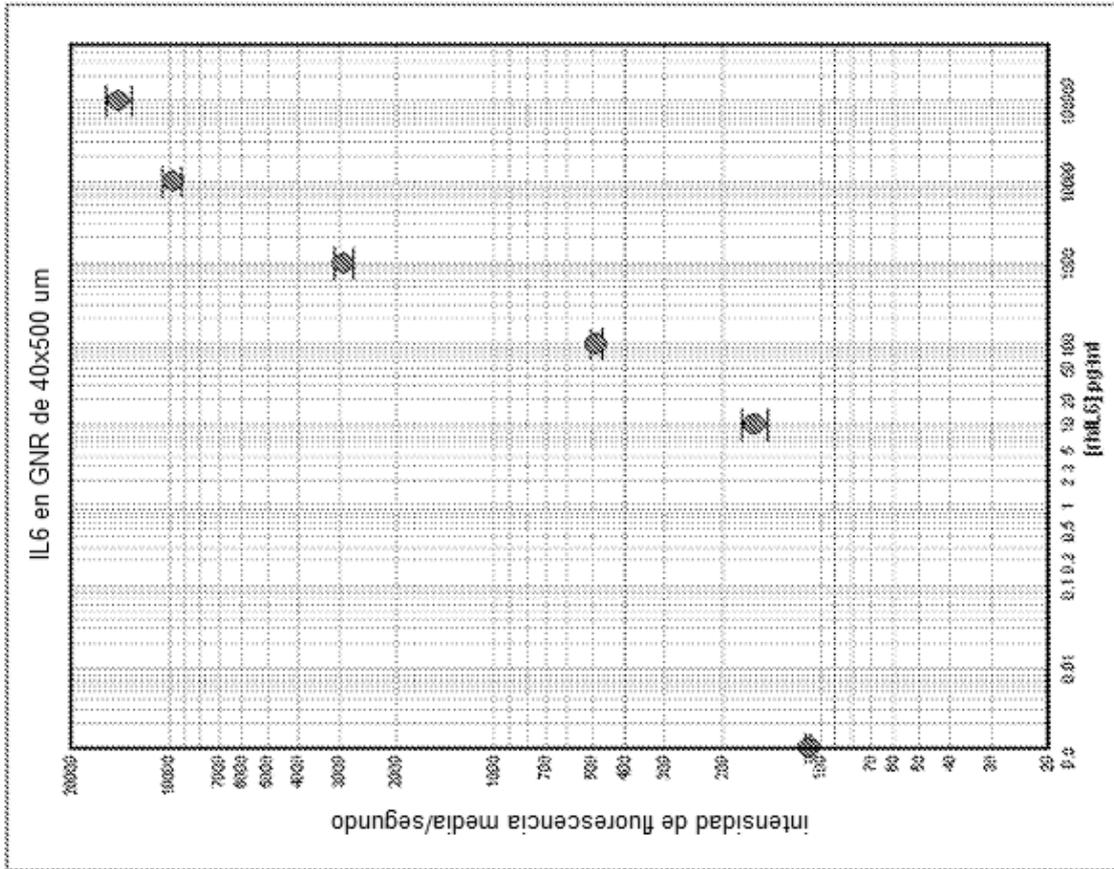


Fig. 7d:

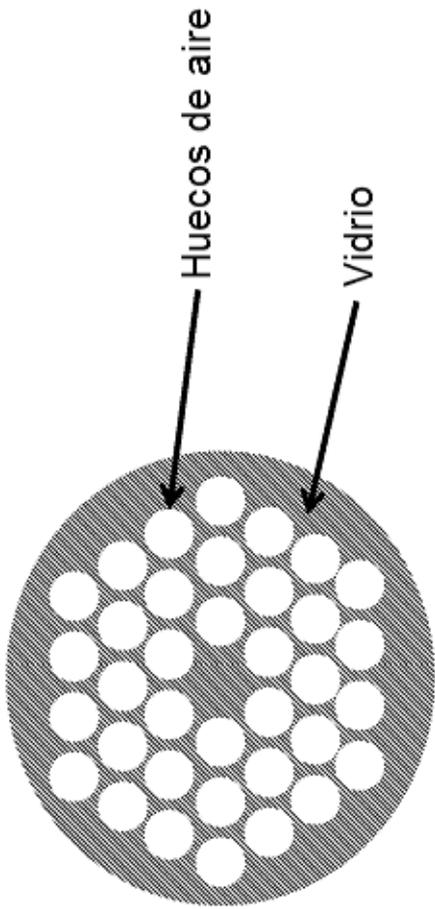


Fig. 8a

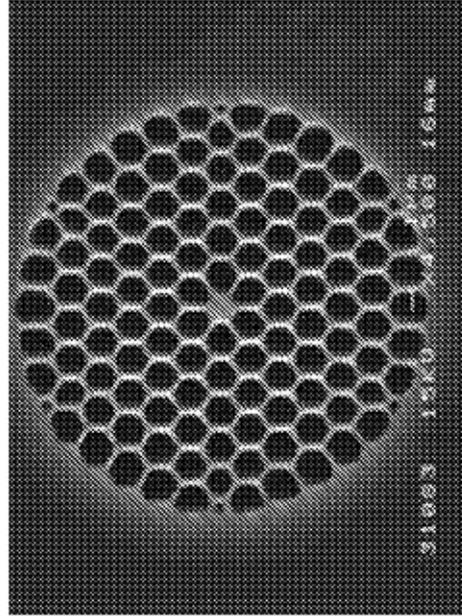


Fig. 8b

Figura 8