

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 253**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2008 PCT/IB2008/055330**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.07.2009 WO09083862**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2008 E 08868852 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 2240278**

54 Título: **Método y cartucho para movilización de microfluidos para la transferencia de partículas magnéticas de un primero a un segundo fluido**

30 Prioridad:

20.12.2007 EP 07123830

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

26.11.2018

73 Titular/es:

**KONINKLIJKE PHILIPS N.V. (100.0%)
High Tech Campus 5
5656 AE Eindhoven, NL**

72 Inventor/es:

**PRINS, MENNO, W., J.;
MAAS, JOOST, H.;
IMMINK, ALBERT, H., J.;
VAN DAM, DIRKJAN, B.;
KOETS, MAATJE;
BRUYNINCKX, MICHEL, J., M.;
VAN DER WIJK, THEA;
BOAMFA, MARIUS, I. y
DEN DULK, REMCO**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 691 253 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 cartucho para movilización de microfluidos para la transferencia de partículas magnéticas de un primero a un segundo fluido

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a sistemas y dispositivos para movilización de microfluidos con estructuras integradas especializadas similares a válvulas para la manipulación de perlas fluidas y magnéticas, así como a métodos que comprenden el uso de tales dispositivos y sistemas.

Antecedentes de la invención

15 Los portadores magnéticos son ampliamente utilizados en el diagnóstico *in vitro* para la concentración ascendente de la diana y la extracción de la diana. Las dianas pueden ser células, fracciones celulares, proteínas, ácidos nucleicos, etc. Las dianas se unen a las partículas magnéticas, y posteriormente estas se separan del fluido en donde se suspendieron las dianas. A partir de entonces, pueden tener lugar pasos adicionales, por ejemplo, almacenamiento, procesamiento bioquímico o detección.

20 Para una revisión de los sistemas de microfluidos, se hace referencia a "N. Pamme, magnetism and microfluidics, Lab Chip, 2006, 6, 24-38". Los sistemas actuales generalmente se basan en una multiplicidad de procesos distintos para manipular fluidos y perlas magnéticas con microbombas y microválvulas, por ejemplo para pasos de lavado de las partículas magnéticas y para reemplazos de regulador. Cada paso por los mismos introduce un potencial de error en el proceso general. Estos procesos también se basan en un gran número de disciplinas distintas, que incluyen química, biología molecular, medicina y otras. Por lo tanto, sería deseable integrar los diversos procesos utilizados en el diagnóstico, en un solo sistema, a un coste mínimo, alta confiabilidad y con una máxima facilidad de operación. La técnica anterior adicional se describe en los documentos WO 2007/110779, DE 102005029809 y EP 1707965.

30 Resumen de la invención

La presente invención proporciona sistemas y dispositivos novedosos para movilización de microfluidos con estructuras especializadas similares a válvulas, junto con los métodos correspondientes para su uso, como se define en las reivindicaciones. Estos sistemas y dispositivos se pueden usar en diversas aplicaciones técnicas, tales como síntesis a microescala, detección, diagnóstico y similares. Se proporciona una función de válvula para partículas magnéticas, en donde la función de válvula preferentemente no tiene canales laterales en el dispositivo para movilización de microfluidos, dando como resultado un cartucho de bajo coste y fácil de procesar.

40 Los dispositivos de acuerdo con la presente invención son dispositivos de compartimentos múltiples en los que se transportan portadores magnéticos entre diferentes compartimentos con un transporte mínimo de fluidos. Para separar los portadores magnéticos de los fluidos circundantes, los canales de los dispositivos pueden estar equipados con materiales especiales de barrera, que permiten el paso de partículas magnéticas pero dificultan el paso de fluidos. Esto se puede lograr mediante el uso de un material deformable, y opcionalmente por componentes o modificaciones hidrófobas, en la estructura de tipo válvula. En los dispositivos y sistemas según una realización de la presente invención, las partículas magnéticas se concentran en el borde de la estructura tipo válvula mediante accionamiento magnético y se arrastran a través de la estructura tipo válvula mediante una fuerza magnética aplicada sobre las partículas. Las estructuras tipo válvula se pueden instalar secuencialmente para mejorar la separación de partículas y fluido.

50 Los dispositivos de acuerdo con la presente invención pueden ser dispositivos de compartimentos múltiples. Además, los sistemas para movilización de microfluidos implementados en dispositivos de compartimentos múltiples en los que se transportan portadores magnéticos entre diferentes compartimentos con un transporte mínimo de fluidos de acuerdo con la presente invención pueden concebirse de tal manera que se puedan proporcionar fluidos a uno o más de los compartimentos independientes del transporte de partículas con o sin el uso de estructuras tipo válvula de acuerdo con la presente invención. De ese modo, los fluidos pueden proporcionarse a través de otro canal que puede estar o no equipado con estructuras tipo válvula de acuerdo con la presente invención y puede comprender válvulas y canales adicionales usados comúnmente en sistemas para movilización de microfluidos.

Breve descripción de los dibujos

60 Figura 1 Diagrama de un dispositivo (no de acuerdo con la invención) con el compartimento 1, el compartimento 2, un canal 3 de barrera, un orificio 4 de entrada de fluido, una unidad 5 de pretratamiento (donde por ejemplo se agregan reactivos al fluido), un canal 6 paralelo, una unidad 7 de pretratamiento (en donde, por ejemplo, las células se filtran y se pueden añadir reactivos adicionales), y la unidad 9 de pretratamiento común. El compartimento 2 se llena con fluido a través del canal 6 y la unidad 7 de pretratamiento.

65

Figura 2 Dispositivo para movilización de microfluidos plano (no de acuerdo con la invención) con canales y compartimentos virtuales. El flujo de fluido puede observarse a través de canales virtuales formados por hidrofiliación local de ambos sustratos de vidrio. El compartimento 1 virtual se llena con una suspensión de perlas magnéticas (que le da al fluido una coloración marrón, de modo que la ubicación de las partículas se puede controlar fácilmente en este experimento) y el compartimento 2 virtual se llena con agua. Los dos compartimentos están separados por una barrera hidrófoba.

Figura 3 Dispositivo para movilización de microfluidos plano en donde se transportaron perlas magnéticas desde un primer compartimento a un segundo compartimento utilizando una fuerza magnética. La imagen muestra la presencia de partículas magnéticas dentro del segundo compartimento.

Figura 4 Representación esquemática de un dispositivo para movilización de microfluidos plano sin canales físicos que contengan áreas de lavado. Las flechas representan partes de los canales desde los cuales se pueden introducir o eliminar solventes de los canales. Los canales virtuales y las áreas de lavado se forman por hidrofiliación local de ambos sustratos de vidrio. Un canal (1) virtual se llena con partículas magnéticas dispersas en un fluido, el otro canal (3) y las áreas (2) de lavado se llenan con un fluido de lavado. Las perlas magnéticas se arrastran desde un canal sobre las estructuras tipo válvula instaladas secuencialmente (en este caso barreras hidrófobas, no de acuerdo con la invención) y a través de las áreas de lavado, en el siguiente canal; el disolvente de migración conjunta se diluye en cada área (2) de lavado.

Figura 5 Representación esquemática de un dispositivo para movilización de microfluidos para la prueba de ácidos nucleicos integrada a) sin estructuras tipo válvula (no de acuerdo con la invención) y b) con estructuras tipo válvula.

Ambos dispositivos a) y b) comprenden: Compartimento (1) con entrada de muestra (entrada) y salida de muestra o ventilación (salida), en donde se introduce la muestra que contiene material celular que comprende ácidos nucleicos; compartimento (2) en donde tiene lugar la lisis celular y se liberan ácidos nucleicos; compartimento (3) en donde se amplifican los ácidos nucleicos, ejemplo por PCR; compartimento (4) en donde se detectan ácidos nucleicos, por ejemplo por captura con anticuerpos.

El dispositivo b) comprende adicionalmente estructuras tipo válvula (representadas por líneas interrumpidas) de acuerdo con la presente invención, mediante las cuales los compartimentos están separados. Los compartimentos (2) y (3) comprenden además subcompartimentos en los que las partículas magnéticas pueden almacenarse antes o después del uso. Obsérvese que la presencia de estructuras tipo válvula a la entrada de los diferentes subcompartimentos es opcional en la presente invención.

Descripción detallada de las realizaciones

En una realización de la presente invención, se proporciona un método para transferir partículas magnéticas desde una muestra de fluidos a través de una estructura de tipo válvula, que comprende las etapas de:

(a) proporcionar un dispositivo que comprende al menos dos compartimentos conectados mediante una estructura tipo válvula en la que la estructura tipo válvula puede permitir el paso de dichas partículas magnéticas tras el accionamiento magnético y donde la estructura tipo válvula impide la mezcla de los dos fluidos en ausencia de una fuerza magnética,

(b) llenar un primero de los al menos dos compartimentos con una muestra de fluidos que comprende partículas magnéticas,

(c) aplicar una fuerza magnética que arrastra dichas partículas magnéticas a través de la estructura tipo válvula transfiriéndola desde un primero de los al menos dos compartimentos a un segundo compartimento.

La estructura de tipo válvula comprende un medio viscoelástico, en donde el medio viscoelástico se selecciona de un gas, un fluido, un sólido deformable o una combinación de los mismos.

En una realización preferida, la estructura de tipo válvula comprende una barrera hidrófoba y la fuerza magnética impulsa las partículas a través de la barrera hidrófoba.

Las Figuras 2 y 3 muestran un dispositivo plano que comprende una barrera hidrófoba. La Figura 2 muestra una suspensión con partículas magnéticas (que le da al fluido una coloración marrón) situada en el compartimento 1, mientras que el compartimento 2 está lleno de agua. En la Figura 3, las partículas magnéticas han sido impulsadas a través de las partículas de la barrera hidrófoba al compartimento 2, por lo que solo una pequeña cantidad del líquido del compartimento 1 ha sido transportada junto con las partículas magnéticas. De acuerdo con la invención, la estructura tipo válvula comprende una obstrucción deformable y la fuerza magnética impulsa las partículas a través del material deformable.

En aún otra realización preferida, el método comprende adicionalmente los siguientes dos pasos entre el paso (b) y (c):

- 5
- concentración de las partículas magnéticas cerca de la estructura tipo válvula mediante accionamiento magnético,
 - pasar las partículas por accionamiento con una fuerza magnética a través de la estructura tipo válvula.

10 En aún otra realización preferida, el primer compartimento se llena con el fluido de muestra que comprende las partículas magnéticas y el segundo compartimento se llena con otro fluido.

15 En aún otra realización preferida del método de acuerdo con la presente invención, el fluido en el primer compartimento y el fluido en el segundo y/o compartimentos adicionales son al menos parcialmente de la misma fuente.

En una realización más preferida de la invención, el fluido en el primer compartimento y el fluido en el segundo y/u otros compartimentos son al menos parcialmente de la misma fuente, en donde la fuente es una muestra biológica.

20 El fluido en el primer compartimento y el fluido en el segundo y/o compartimentos adicionales que son al menos parcialmente de la misma fuente se pueden derivar de un método que comprende los siguientes pasos antes de los pasos a) a c) del método de acuerdo con la presente invención:

- una muestra de fluidos se divide en una parte I y una parte II,
- adición de partículas magnéticas a la parte I de la muestra de fluido dividido y transporte a dicho primero de los al menos dos compartimentos del dispositivo provisto,
- realizar un pretratamiento de la parte II de la muestra de fluido dividido, y
- transporte de la parte II de la muestra de fluido dividida a dicho segundo compartimento del dispositivo provisto.

30 Estos pasos adicionales descritos anteriormente también pueden realizarse en métodos que usan dispositivos que no tienen las estructuras tipo válvula de acuerdo con la presente invención.

35 En una realización más preferida, una diana unida a las partículas magnéticas se cotransporta con las partículas magnéticas desde el primer compartimento al segundo compartimento.

40 En otra realización más preferida, durante el transporte de partículas desde el primer al segundo compartimento, la estructura de tipo válvula hace que las partículas pierdan una parte esencial del fluido cotransportado del primer compartimento antes de que las partículas entren en el segundo compartimento.

45 En otra realización más preferida, menos del 10%, preferiblemente menos del 5%, más preferiblemente menos del 1%, más preferiblemente menos del 0.1% del fluido contenido en el primer compartimento se transporta al segundo compartimento junto con las partículas magnéticas.

En otra realización más preferida, la relación entre el volumen de las partículas magnéticas y el fluido cotransportado del primer compartimento es mayor que 0.05, incluso más preferido 0.1 y particularmente preferido 0.2 y más particularmente preferido mayor que 1.

50 Otra realización de la presente invención es un dispositivo para llevar a cabo un método de acuerdo con la presente invención, que comprende al menos dos compartimentos conectados mediante una estructura tipo válvula en la que la estructura tipo válvula impide la mezcla de los dos fluidos en ausencia de una fuerza magnética. La presente invención es un dispositivo, como se define en la reivindicación 9, para realizar un método de acuerdo con la presente invención, que comprende al menos dos compartimentos conectados por una estructura tipo válvula en la que la estructura tipo válvula permite el paso de partículas magnéticas tras el accionamiento por una fuerza magnética. La estructura tipo válvula comprende un medio viscoelástico, en donde el medio viscoelástico se selecciona de un gas, un fluido, un sólido deformable o una combinación de los mismos.

60 En una realización preferida, la estructura tipo válvula comprende una barrera hidrófoba.

En una realización preferida, la estructura de tipo válvula comprende un canal capilar que comprende al menos dos superficies hidrófobas.

65 En una realización preferida adicional, los compartimentos que están separados por la barrera hidrófoba están en estrecha proximidad. En el contexto de esta invención, "en estrecha proximidad" se define como separados por una

barrera hidrófoba con una longitud de menos de 10 mm, preferiblemente de 0.05 a 3 mm, más preferiblemente de 0.5-3 mm. Sin desear estar sujeto a ninguna teoría, se cree que esta ventana de rangos facilita que cuando las partículas magnéticas en un primer fluido que están agrupadas como un cuerpo, toquen un segundo fluido, se genera una conexión líquida (también llamada cuello fluido) entre los dos fluidos. Sorprendentemente, la conexión de líquido genera una contaminación cruzada mínima entre los dos fluidos, probablemente porque (i) el cuerpo de la partícula magnética está situado como un tapón dentro del canal, y (ii) porque la conexión de fluido parece desprenderse muy rápidamente. Desprendimiento se refiere al fenómeno de que una conexión de líquido se rompa y se retire de un área de válvula hacia las cámaras. El desprendimiento se produce preferiblemente de forma rápida después del paso, para minimizar el arrastre del primer fluido en el segundo fluido. Sin embargo, el desprendimiento debe ocurrir no demasiado rápido, para permitir un alto rendimiento de transporte de partículas a través de la válvula.

La transferencia real de las partículas magnéticas consiste en dos pasos: (1) recolección y concentración de las partículas magnéticas mediante accionamiento magnético, en una región cercana a la estructura tipo válvula; (2) las partículas magnéticas son arrastradas dentro de la región de barrera de la estructura tipo válvula. En la etapa (1), la forma de la cámara de fluido, en el lugar cerca de la estructura tipo válvula donde las partículas magnéticas se recogen y se concentran por accionamiento magnético, es preferiblemente convexa con un radio de curvatura. El radio de curvatura facilita la recolección y concentración de partículas magnéticas, generando un cuerpo de partículas magnéticas enfocado que ejerce una alta presión sobre el menisco fluido. Preferiblemente, el diámetro de curvatura de la región de la cámara de fluido donde las partículas se recogen y concentran, es igual o menor que el diámetro del cuerpo de la partícula magnética cuando el cuerpo está en forma de disco. La estructura tipo válvula comprende una obstrucción deformable.

En una realización más preferida, el material viscoelástico forma una obstrucción deformable y el material viscoelástico se selecciona de un grupo que comprende un aceite, un gel o un polímero deformable o una combinación de los mismos.

Otra realización de la presente invención es un sistema que comprende un dispositivo de acuerdo con la presente invención y que comprende además una fuente magnética.

En una realización más preferida, la fuente magnética puede seleccionarse de un grupo que comprende un electroimán, un cable de corriente integrado, un imán permanente y un imán o electroimán permanente mecánicamente móvil.

Otra realización de la presente invención es un sistema que comprende un dispositivo de acuerdo con la presente invención y que comprende además una unidad de detección.

Otra realización de la presente invención es el uso de un dispositivo de acuerdo con la presente invención o un sistema de acuerdo con la presente invención para detectar dianas biológicas.

Una realización preferida de la presente invención es el uso de un dispositivo de acuerdo con la presente invención o un sistema de acuerdo con la presente invención en un ensayo bioquímico seleccionado del grupo que comprende ensayo de unión/desunión, ensayo en sándwich, ensayo de competición, ensayo de desplazamiento y ensayo enzimático.

Otra realización preferida de la presente invención es el uso de un dispositivo de acuerdo con la presente invención o un sistema de acuerdo con la presente invención en un método seleccionado del grupo que comprende multiplexación de sensores, multiplexación de etiquetas y multiplexación de compartimentos.

En una realización adicional, el primer compartimento se llena con el fluido de muestra, potencialmente después de un pretratamiento tal como filtración, y el segundo compartimento se llena con un fluido de un depósito separado. El segundo compartimento se llena, por ejemplo, con un fluido regulador, suministrado desde el interior del cartucho desde el exterior del cartucho. También es posible que el primer compartimento y el segundo compartimento se llenen con el fluido de muestra, sin embargo después de un pretratamiento diferente.

Esto se esquematiza en la Figura 1. El compartimento 1 se llena con fluido después del pretratamiento 5. El compartimento 2 se llena con el mismo fluido después del pretratamiento 7. Este dispositivo para movilización de microfluidos puede comprender o no una o más estructuras tipo válvula de acuerdo con la presente invención y puede o no comprender otras válvulas usadas comúnmente en sistemas para movilización de microfluidos. La estructura tipo válvula se encuentra estable dentro del dispositivo.

En otra realización preferida del método, el dispositivo o el sistema de acuerdo con la presente invención, se instalan secuencialmente múltiples estructuras tipo válvula entre los al menos dos compartimentos. De esta forma, los dispositivos o sistemas para movilización de microfluidos, por ejemplo, pueden equiparse con áreas de lavado adicionales que pueden suministrarse por separado con fluidos de lavado. Cada área de lavado sirve, por lo tanto, para limitar adicionalmente la cantidad de disolvente de comigración/sobreflujo desde un primer canal o cámara a un

segundo canal o cámara. Un aspecto de la presente invención es el uso de una estructura tipo válvula, que evita la mezcla de dos fluidos en ausencia de una fuerza magnética y que permite el paso de partículas magnéticas tras el accionamiento mediante una fuerza magnética en un sistema o dispositivo para movilización de microfluidos.

5 Las siguientes definiciones son aplicables para los dispositivos, métodos y sistemas de acuerdo con la presente invención.

10 La estructura tipo válvula mencionada en el presente documento es un espacio a través del cual, en ausencia de una fuerza magnética, un fluido no puede pasar, pero a través del cual las partículas magnéticas de acuerdo con la presente invención pueden ser accionadas por una fuerza magnética. La función de válvula de la estructura de tipo
15 válvula se efectúa mediante el medio viscoelástico comprendido en el mismo, cuyo medio viscoelástico se selecciona de un gas, un fluido, un sólido deformable o una combinación de los mismos. En el caso de que el medio viscoelástico sea un gas o un fluido, la estructura tipo válvula comprende un material o característica adicional que define la ubicación del gas o fluido, por ejemplo una estructura o región mecánica que sustancialmente fija la interfaz gas/fluido o fluido/fluido, por ejemplo una estructura de inmovilización mecánica y/o una transición de energía de superficie en el dispositivo. La estructura tipo válvula también puede comprender un sólido deformable, que sirve como una obstrucción del flujo viscoelástico deformable.

20 La transferencia real de las partículas magnéticas consiste en dos pasos: (1) recolección y concentración de las partículas magnéticas mediante accionamiento magnético, en una región cercana a la estructura tipo válvula; (2) las partículas magnéticas son arrastradas al espacio inicialmente ocupado por el material viscoelástico por la fuerza magnética aplicada sobre las partículas. El fluido en donde las partículas magnéticas se dispersaron por primera vez quedará atrás, lo que da como resultado una extracción, una separación o un tipo de autolimpieza de las partículas magnéticas. Como consecuencia de la realidad física, es imposible evitar por completo que una cantidad del fluido
25 sea transportada a través de la estructura tipo válvula junto con las partículas magnéticas. Sin embargo, mediante un diseño cuidadoso de la geometría de canales/compartimentos y válvulas, tal cotransporte puede minimizarse.

30 Los materiales viscoelásticos para la estructura de tipo válvula de acuerdo con la presente invención pueden seleccionarse, por ejemplo, de peso denso (por ejemplo, fluido o sólido) a liviano (por ejemplo, aire), y de elástico (por ejemplo, un plástico como PDMS) a inelástico y viscoso (por ejemplo un gel, o un aceite hidrófobo). Los materiales con propiedades fisicoquímicas y mecánicas similares a las mencionadas anteriormente también se pueden usar como material viscoelástico en la presente invención.

35 En el caso de un aceite u otro líquido, se puede usar inmovilización de menisco para asegurar que la estructura de tipo válvula que comprende el material viscoelástico esté situada de forma estable dentro del dispositivo. La inmovilización del menisco puede efectuarse mediante una región que sustancialmente inmoviliza una línea de contacto de la interfaz gas/fluido o fluido/fluido, por ejemplo una estructura mecánica con orientación variable de la superficie normal (por ejemplo, un borde) y/o una transición de energía superficial (por ejemplo, de energía de superficie alta a baja, por ejemplo, de hidrófila a hidrófoba).

40 Los canales o compartimentos con respecto a la presente invención son espacios en los que los fluidos, que se usan en el dispositivo, sistema o método de acuerdo con la presente invención, están confinados a un área determinada. La geometría de dichos canales o compartimentos puede adoptar cualquier forma adecuada, tal como, por ejemplo, áreas circulares o rectangulares en las que se recogen muestras para su posterior procesamiento y canales lineales que conectan las áreas antes mencionadas. Los canales pueden injertarse en el material de sustrato mediante
45 diversos métodos conocidos por la persona experta, tales como grabado, fresado, gofrado, moldeo, impresión, y similares. No de acuerdo con la invención, los canales pueden estar presentes en forma de "canales virtuales" o también "compartimentos virtuales". Dichos canales virtuales comprenden áreas con propiedades de superficie que difieren de la superficie circundante del sustrato de tal manera que los fluidos esenciales permanecen confinados dentro de los canales. Por ejemplo, tales canales virtuales pueden producirse a partir de superficies de vidrio que se funcionalizan con una capa hidrófoba de octadeciltriclorosilano u otros silanos, o hidrocarburos, que pueden estar parcialmente fluorados o perfluorados. Estas capas pueden entonces, por ejemplo, grabarse con una máscara para obtener canales virtuales. Los canales virtuales son ideales para la combinación con tecnología de electrohumectación. Una ventaja adicional de la tecnología de canal virtual es que está habilitada para el
50 procesamiento de grandes áreas y el posterior corte en dados para proporcionar un proceso de producción de bajo coste de acuerdo con la presente invención.

55 La elección de materiales de sustrato para la producción de dispositivos o sistemas de acuerdo con la presente invención no está limitada particularmente. Sin embargo, tales materiales de sustrato tendrán que ser funcionales en las condiciones usadas en las aplicaciones de acuerdo con la presente invención. Ejemplos de tales materiales de sustrato son materiales orgánicos e inorgánicos, materiales químicamente y biológicamente estables, tales como vidrio, cerámica, plásticos, tales como polietileno, policarbonato, polipropileno, PET, y similares. Los sustratos pueden contener características y materiales adicionales, tales como características ópticas (por ejemplo, ventanas para lectura óptica), características magnéticas (por ejemplo, materiales para mejorar la actuación de las partículas magnéticas), características eléctricas (por ejemplo, cables de corriente para detección, actuación y/o control),
60
65

características térmicas (por ejemplo, para el control térmico), características mecánicas (por ejemplo, para la estabilidad del cartucho), características de identificación, etc.

El material cotransportado que puede ser una diana y/o un material adicional (por ejemplo, un grupo informador) puede unirse a una partícula magnética por medios químicos o físicos, tales como enlaces covalentes, interacciones de van-der-Waals, interacciones iónicas, interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno, complejación y similares. Los enlazadores químicos para enlace covalente pueden ser, pero no están limitados a, ácidos nucleicos, péptidos, carbohidratos, hidrocarburos, PEG, que pueden unirse con diversas estrategias químicas, tales como enlace amida, enlace ditiol, enlace éster o química de clic. Los ejemplos de estrategias de unión biomolecular se pueden seleccionar de, pero no se limitan a, anticuerpos, interacciones proteína-proteína, interacciones proteína-ácidos nucleicos, interacciones entre moléculas y/o fracciones celulares y/o células completas. Dependiendo del tipo de extracción deseado, las químicas de superficie y las unidades estructurales bioquímicas unidas a la superficie se pueden seleccionar para unión no específica así como para unión específica de dianas o clases de dianas a las partículas magnéticas. Una persona experta podrá seleccionar uno de estos métodos bien conocidos que sea adecuado para la diana. Un ejemplo de un método de unión biomolecular específico es unir ácidos nucleicos, por ejemplo obtenido por PCR, a las partículas magnéticas por hibridación con oligonucleótidos complementarios. Estos oligonucleótidos pueden ser complementarios a una secuencia específica encontrada en los cebadores de PCR de modo que solo se capturan los ácidos nucleicos amplificados.

La diana en el presente documento puede ser cualquier entidad química o biológica que sea adecuada para la unión a las partículas magnéticas. Por lo tanto, la diana puede ser una molécula, como una molécula orgánica pequeña, un fármaco, una hormona, un polipéptido, una proteína, un anticuerpo, un ácido polinucleico, carbohidratos o también un reactivo químico. La diana también puede ser una entidad biológica más grande, como un microorganismo, una célula animal o una célula humana, como por ejemplo células sanguíneas, células tisulares o células cancerosas, una célula vegetal, una célula bacteriana, una célula fúngica, un virus o fragmentos o partes de los anteriores, tales como fragmentos de paredes de células bacterianas, partículas similares a virus, fragmentos de cápsidas virales y similares.

Una muestra o fluido de muestra específica un fluido que comprende una diana, la última de los cuales se analiza adicionalmente en el presente documento. Dicha muestra o fluido de muestra se puede usar de acuerdo con la presente invención tal como está, o se puede derivar de una muestra anterior y opcionalmente se puede haber pretratado. Por consiguiente, si una muestra se fracciona antes o durante el uso de acuerdo con la presente invención por cualquier método conocido por la persona experta en una o más partes de dicha muestra, los fluidos resultantes de la misma se denominarán además muestras o fluidos de muestra, independientemente de si comprenden las mismas sustancias que la muestra original o solo partes de la misma.

Las técnicas de pretratamiento son conocidas por la persona experta y no están limitadas a técnicas específicas. Ejemplos de técnicas de pretratamiento son, por ejemplo, calentamiento, lisis, fraccionamiento (por ejemplo, mediante centrifugación, filtración, decantación, cromatografía y similares), concentración, modificación con reactivos biológicos y/o químicos.

Un fluido de muestra puede comprender sólidos disueltos, solubilizados o dispersados o corpúsculos sólidos como, por ejemplo, células.

Se puede obtener una muestra o fluido de muestra como se describe anteriormente a partir de diversas fuentes, que no están particularmente limitadas. Los ejemplos de tales fuentes son, pero no se limitan a muestras de origen biológico, que preferiblemente pueden ser muestras derivadas de pacientes, más preferiblemente muestras de puntos de atención, muestras de pruebas de alimentos, industriales, clínicas y ambientales.

Las muestras de origen biológico que pueden utilizarse en la presente invención no están particularmente limitadas. Algunos de los posibles ejemplos de fuentes de dichas muestras son fluidos corporales, como sangre o fluidos linfáticos, saliva, esputo, heces, expulsiones, sudor, secreciones de la piel, muestras de tejidos homogeneizados, muestras bacterianas que pueden provenir de cultivos de laboratorio o de un producto natural fuente, como muestras ambientales. Las muestras de origen biológico también abarcan muestras obtenidas de procesos *in vitro* y material biológico que puede haberse alterado (por ejemplo, mutado, funcionalizado, etc.) en un proceso *in vitro*. Ejemplos de tales procesos son, pero no se limitan a, amplificación de ácidos nucleicos, lisados celulares pretratados o no tratados, purificación de proteínas, funcionalización química y/o bioquímica de proteínas (por ejemplo, fosforilación, glicosilación, etc.), métodos de purificación, tales como FPLC, PAGE, ultracentrifugación, electroforesis capilar y similares.

Las partículas magnéticas (MP) usadas en el método, sistema o dispositivo de acuerdo con la presente invención se pueden usar como vehículos para las dianas. La detección de la diana, que puede escindirse antes de la detección o permanecer unido a las MP, puede realizarse mediante métodos estándar conocidos por la persona experta. Alternativamente, una molécula informadora adicionalmente puede unirse a las MP, que pueden tratarse o escindirse selectivamente de manera que la muestra permanezca unida a las MP o que se detecte mientras

permanece unida a las MP, puede usarse para la detección mediante métodos estándar conocidos por la persona experta.

La detección puede basarse en las propiedades específicas de las propias partículas magnéticas, en la diana o en grupos informadores unidos a las partículas o a las dianas mediante los medios de unión mencionados anteriormente. Por ejemplo, las técnicas de detección pueden basarse en, pero sin limitación, colorimetría, luminiscencia, fluorescencia, fluorescencia resuelta en el tiempo, contraste de interferencia fototérmica, dispersión de Rayleigh, dispersión Raman, resonancia de plasmón superficial, cambio de masa (por ejemplo, por MALDI), microbalanzas de cristal de cuarzo, deflexiones, voltametría de pulso diferencial, cartografía química por espectroscopía de frecuencia de generación no lineal, cambio óptico, resistividad, capacitancia, anisotropía, índice de refracción y/o recuento de nanopartículas, métodos que se basan en la transmisión, refracción o absorción de radiación electromagnética, como luz visible, IR o ultravioleta, RMN, ESR. La detección puede basarse en métodos que miden directamente la presencia de las partículas magnéticas o la diana unida a las mismas o que se libera de las mismas. La detección también puede basarse en métodos indirectos, que se basan en la acumulación, liberación o modificación de una o más moléculas indicadoras secundarias, tales como FRET, ELISA, PCR, PCR en tiempo real, métodos basados en hibridación y similares. Por ejemplo, la detección de ácidos nucleicos obtenidos por PCR puede basarse en cebadores de PCR o dNTPs que están marcados con un grupo informador, de modo que solo se detectan los ácidos nucleicos amplificados.

Ejemplos específicos de partículas magnéticas modificadas son: Strept-MP: las partículas magnéticas pueden recubrirse con una capa biológica activa para unirse a otras sustancias. Por ejemplo, las partículas magnéticas pueden recubrirse con estreptavidina para unir específicamente una biotina o unidades estructurales biológicas etiquetadas con biotina. Immuno-MP: las partículas magnéticas pueden recubrirse con una capa biológica activa para unirse a otras sustancias. Por ejemplo, las partículas magnéticas pueden recubrirse con anticuerpos para unir específicamente a antígenos o unidades estructurales biológicas etiquetadas con antígenos. Oligo-FITC: los cebadores etiquetados se pueden usar durante la amplificación para construir etiquetas en el producto. Por ejemplo, una etiqueta FITC puede integrarse en un producto de amplificación oligonucleico, lo que facilita adicionalmente la manipulación y detección usando anticuerpos anti-FITC. Obsérvese que las partículas magnéticas modificadas no están de ninguna manera limitadas a los ejemplos mencionados anteriormente.

Alternativamente, las propias partículas magnéticas también se pueden utilizar para fines de detección. En este caso, el sensor para detectar las partículas puede ser cualquier sensor adecuado para detectar la presencia de partículas magnéticas sobre o cerca de la superficie del sensor. La detección puede basarse en cualquier propiedad de las partículas, por ejemplo a través de métodos magnéticos (por ejemplo magnetorresistivo, Hall, bobinas), métodos ópticos (por ejemplo, formación de imágenes, fluorescencia, quimioluminiscencia, absorción, dispersión, técnicas de campo evanescente, resonancia de plasmón superficial, espectroscopía Raman, etc.), detección sónica (por ejemplo onda acústica, deflexión, cristal de cuarzo, etc.), detección eléctrica (por ejemplo, conducción, impedancia, amperométrico, ciclo rédox), combinaciones de los mismos, etc. Para su uso en algunos de los métodos mencionados anteriormente, las partículas magnéticas deben estar equipadas con otras entidades funcionales, como por ejemplo un tinte fluorescente. Tales partículas modificadas están disponibles comercialmente o en algunos casos las partículas tendrán que modificarse antes del uso en la presente invención. Una persona experta sabrá cómo seleccionar la modificación necesaria que sea adecuada para el método de detección deseado.

Las partículas magnéticas usadas en el método, sistema o dispositivo de acuerdo con la presente invención pueden estar en la dimensión que varía entre 3 nm y 10000 nm, preferiblemente entre 10 nm y 5000 nm, más preferiblemente entre 50 nm y 3000 nm.

El electroimán, como se usa en el método, el dispositivo o el sistema de acuerdo con la presente invención, también puede ser un imán multipolar. Las corrientes a través de las bobinas de imán multipolares se pueden controlar de tal manera que se implementa un motor de paso de fase lineal para arrastrar las perlas a largas distancias sobre cada una de las múltiples estructuras tipo válvula. De esta forma, no se necesitan piezas mecánicamente móviles en el dispositivo de lectura. Idealmente, la geometría escalonada de la estructura en forma de válvula se puede sincronizar con la geometría del electroimán multipolar.

La detección mediante los métodos de detección mencionados aquí puede ocurrir con o sin exploración del elemento sensor con respecto a la superficie del biosensor. Los datos de medición pueden derivarse como una medición de punto final, así como también al registrar señales cinética o intermitentemente.

La diana o una etiqueta para la detección se pueden detectar directamente mediante el método de detección. Alternativamente, las partículas, la diana o la etiqueta pueden procesarse adicionalmente antes de la detección. Un ejemplo de procesamiento posterior es que se agregan materiales de interés o que las propiedades (bio)químicas o físicas de la diana o la etiqueta se modifican para facilitar la detección.

El dispositivo, sistema o método de acuerdo con la presente invención comprende al menos dos compartimentos separados por una estructura tipo válvula. No obstante, un dispositivo, sistema o método de acuerdo con la presente invención puede comprender más de dos compartimentos, que pueden estar conectados por canales para obtener

una disposición en serie o paralela de compartimentos, por lo que al menos dos áreas distintas se definen por separación de uno otro por una estructura tipo válvula. Sin embargo, no necesariamente todos los compartimentos deben separarse de cada uno de los compartimentos adyacentes mediante estructuras tipo válvula (por ejemplo, comparar la Figura 5b en la que las estructuras tipo válvula que separan los compartimentos secundarios de los compartimentos 2 y 3 son opcionales).

En una realización preferida, los compartimentos que están separados por la estructura tipo válvula están muy próximos. Una ventaja de la proximidad de las dos cámaras es que las partículas magnéticas se transportan eficientemente a través de la válvula hidrófoba. Se atribuye el transporte eficiente (i) a la corta distancia interfluida que debe cruzarse y (ii) a la energía interfacial que se libera cuando la parte frontal del cuerpo de la partícula magnética toca el segundo fluido. El contacto del cuerpo de la partícula magnética con el segundo fluido provoca la desaparición del menisco en la parte frontal del cuerpo de la partícula magnética. Como resultado, las partículas magnéticas pueden moverse eficientemente al segundo fluido.

La estructura tipo válvula en una realización comprende una barrera hidrófoba. Esta barrera se realiza preferiblemente en un canal del cual al menos dos superficies son esencialmente hidrófobas. Lo más preferido es que dos superficies posicionadas de manera opuesta sean hidrófobas. Incluso más preferido, el canal completo es hidrófobo. En el caso de un canal circular, donde es difícil identificar superficies separadas, se prefiere que al menos el 50% de la superficie del canal sea hidrófobo y esto se distribuye preferiblemente de modo que dos cuadrantes opuestos de la superficie del canal sean hidrófobos. Sorprendentemente, hemos encontrado que los canales en los que al menos dos superficies son hidrófobas tienen un rendimiento significativamente mejor en el transporte de partículas que los canales con una superficie hidrófoba y una hidrófila. Especialmente, el equilibrio del desprendimiento se mejora en estos canales. En particular, parece que el menisco del fluido se cierra fuertemente alrededor de la parte posterior del cuerpo de la partícula magnética. El desprendimiento ocurre poco después de que el cuerpo de la partícula magnética se haya fusionado con el segundo fluido. Se cree que el cierre hermético del menisco alrededor de la parte posterior del cuerpo de la partícula magnética garantiza una transferencia muy pequeña del primer fluido al segundo fluido. Este desprendimiento inducido por fusión combina dos propiedades importantes: (i) el transporte de partículas magnéticas hacia el segundo fluido se mejora al fusionarse debido a que se libera la energía interfacial asociada con el frente del cuerpo de la partícula magnética, y (ii) el menisco se aprieta fuertemente detrás del cuerpo de la partícula magnética, lo que da una baja contaminación cruzada.

Los compartimentos pueden estar equipados de forma independiente con subcompartimentos adicionales en los que se pueden almacenar partículas magnéticas para añadir partículas magnéticas o eliminar partículas magnéticas de la muestra. Además, los compartimentos pueden estar equipados de forma independiente con características adicionales específicas, tales como superficies que se modifican, por ejemplo con anticuerpos para permitir ensayos de tipo ELISA, en forma de matrices para ácidos nucleicos, con moléculas de captura. Además, los compartimentos pueden tener características para la adición de reactivos específicos del compartimento, en forma seca o húmeda, para facilitar el proceso (bio) químico en el compartimento. Además, el dispositivo o sistema puede estar compuesto total o parcialmente de un material que está adaptado al uso con las técnicas de detección o procesamiento descritas aquí. Por lo tanto, dicho material puede ser, por ejemplo, resistente al calor (por ejemplo, para PCR) o translúcido (por ejemplo, para espectroscopía).

En el método, sistema o dispositivo de acuerdo con la presente invención, se pueden usar uno o más tipos de partículas magnéticas que pueden diferir independientemente en el material del que están compuestas y/o que pueden modificarse independientemente con moléculas de superficie para poder ser compatible con las dianas respectivas y las técnicas de detección y procesamiento mencionadas en este documento.

En las técnicas de pretratamiento, detección y procesamiento mencionadas en este documento (por ejemplo, PCR, ELISA, FRET, métodos espectroscópicos y métodos adicionales mencionados en este documento), se pueden usar componentes adicionales, tales como reguladores, disolventes, aditivos y reactivos que se usan rutinariamente con estas técnicas y que son conocidos por la persona experta.

El dispositivo, sistema o método de acuerdo con la presente invención se puede usar con varios tipos de ensayos bioquímicos, por ejemplo ensayo de unión/desunión, ensayo en sándwich, ensayo de competencia, ensayo de desplazamiento, ensayo enzimático, etc. El sistema o dispositivo de acuerdo con la presente invención puede detectar dianas biológicas moleculares. Obsérvese que las dianas moleculares a menudo determinan la concentración y/o la presencia de unidades estructurales más grandes, por ejemplo células, virus, o fracciones de células o virus, extracto de tejido, etc.

El método, sistema o dispositivo de acuerdo con la presente invención son adecuados para multiplexación de sensores (es decir, el uso paralelo de diferentes sensores y superficies de sensores), multiplexación de etiquetas (es decir, el uso paralelo de diferentes tipos de etiquetas) y multiplexación de compartimentos (es decir, el uso paralelo de diferentes compartimentos de reacción).

El sistema o dispositivo de acuerdo con la presente invención se puede usar como biosensores de puntos de atención, rápidos, robustos y fáciles de usar. El sistema o dispositivo de acuerdo con la presente invención puede

tener la forma de un artículo desechable para ser utilizado con un instrumento lector compacto, que contiene uno o más medios generadores de campo magnético para la manipulación de partículas magnéticas y/o uno o más medios de detección. Los medios para la manipulación y/o detección también pueden ser proporcionados por un dispositivo externo. Además, el dispositivo, métodos y sistemas de la presente invención se pueden usar en pruebas automatizadas de alto rendimiento. En este caso, el dispositivo con compartimentos de reacción debe tener una forma que se adapte a un instrumento automatizado, por ejemplo una forma similar a un dispositivo de placa de pozo o un dispositivo de cubeta. El dispositivo o sistema de acuerdo con la presente invención también puede proporcionarse en forma de un sistema listo para usar, similar a un kit, en donde los reactivos necesarios (regulador) y las partículas magnéticas se incorporan en un lugar seco y/o una forma húmeda.

Además de las aplicaciones analíticas, el método, sistema o dispositivo de acuerdo con la presente invención se puede usar en un sistema de laboratorio en un chip o en un sistema de proceso en un chip para fines de síntesis. Las moléculas y los tipos de reacciones no están particularmente limitados, siempre que los grupos reactivos de las moléculas y las condiciones de reacción sean adecuados para un sistema de laboratorio en un chip o de proceso en un chip. Una persona experta podrá decidir qué condiciones son compatibles con los dispositivos laboratorio-en-un-chip o proceso-en-un-chip y en particular con las estructuras tipo válvula de acuerdo con la presente invención de tal manera que no se produce reacción entre los grupos reactivos y la estructura de tipo válvula de acuerdo con la presente invención. Algunos de los ejemplos de tales síntesis pueden ser síntesis de polinucleótidos, síntesis de polipéptidos, química de ligamiento, química de clic u otras modificaciones químicas que generalmente se pueden ejecutar en un dispositivo de laboratorio-en-un-chip o proceso-en-un-chip.

Aplicaciones adicionales incluyen análisis de ADN (por ejemplo, mediante PCR y secuenciación de alto rendimiento), diagnóstico de enfermedades en el punto de atención, proteómica, equipo de separación de células sanguíneas, ensayos bioquímicos, análisis genético, detección de fármacos y similares.

Ejemplos:

Producción de un dispositivo o sistema de acuerdo con la presente invención:

Ejemplo 1 (no de acuerdo con la invención)

Se fabricó un dispositivo para movilización de microfluidos a partir de sustratos de vidrio recubiertos con una monocapa de octadeciltriclorosilano u otros silanos. Se dispuso como recubrimiento una máscara sobre la superficie de ambos sustratos y se expuso al plasma atmosférico. Se utilizó un diseño de máscara reflejada para los dos sustratos. La hidrofiliación local conduce a "canales virtuales" entre las placas de vidrio. Los dos sustratos de vidrio se ensamblaron juntos con cinta de doble cara que actúa como una capa separadora para los dos sustratos de vidrio. La cinta también actúa como un sellado de líquidos hacia los entornos externos de modo que se logra un ambiente saturado de humedad para los canales virtuales. Esto evita que los fluidos se evaporen aún más desde los canales virtuales. Una vez ensamblado, se introdujo en el canal una dispersión acuosa de perlas magnéticas. Los canales y compartimentos físicos para fluidos pueden ser producidos por una amplia gama de técnicas de fabricación, incluyendo técnicas de estampado y unión, tales como gofrado, moldeo, fresado, grabado, impresión, sellado, soldadura, pegado, etc.

Ejemplo 2: Sistema para movilización de microfluidos de dos compartimentos:

El fluido es una muestra de sangre. En la unidad 9 de pretratamiento, la muestra, por ejemplo, es filtrada, se añaden sales reguladoras y otros reactivos, preferiblemente a partir de un reactivo seco. En la unidad 5 de pretratamiento se añaden partículas magnéticas, que se incuban con la muestra en el compartimento 1. En la unidad 7 de pretratamiento, tiene lugar un pretratamiento adicional, por ejemplo filtración de la muestra. Este fluido se transporta al compartimento 2, por ejemplo por transporte capilar. Las partículas magnéticas se transportan a través del canal 3 de barrera. Estas pueden reaccionar adicionalmente en el compartimento 2, por ejemplo para detección o procesamiento posterior.

Son posibles varias secuencias de temporización. En lo descrito anteriormente, el compartimento 2 se llenó en primer lugar con fluido y después se transportaron partículas magnéticas al compartimento 2. También es posible que las partículas magnéticas se muevan primero al compartimento 2 y después se suministre fluido al compartimento 2.

Ejemplo 3: - Sistema para movilización de microfluidos de tres compartimentos:

Un ejemplo de un ensayo de tres compartimentos es el siguiente (MP en el presente documento significa "partícula magnética"):

Se agregan Immuno-MPs a la muestra. En el primer compartimento, los inmuno-MPs capturan células u otras unidades estructurales, por ejemplo virus. A continuación, las MP se transportan al segundo compartimento a través de una estructura tipo válvula. Esto representa un paso de extracción y concentración. Las células se someten a lisis

en el segundo compartimento. A continuación, las moléculas de sonda se unen a las dianas en el lisado. Por ejemplo, oligo-biotina y oligo-FITC se unen específicamente al ARN liberado. A continuación, los inmuno-MPs se extraen del segundo compartimento en un primer subcompartimento, y se liberan Strept-MP en el segundo compartimento desde un segundo subcompartimento. El segundo subcompartimento puede estar conectado al segundo compartimento mediante una estructura tipo válvula. En el segundo compartimento, los Strept-MP se unen a las sondas biotiniladas. A continuación, los Strept-MP se transportan al tercer compartimento a través de una estructura tipo válvula. El tercer compartimento está equipado con un sensor con anticuerpos anti-FITC. Opcionalmente también están presentes reactivos (secos) en el tercer compartimento con el fin de mejorar los procesos de unión y detección.

Ejemplo 4: - Sistema para movilización de microfluidos de cuatro compartimentos:

En el primer compartimento, se agrega un reactivo con inmuno-MP1 a la muestra. Las moléculas de captura en MP1 están acopladas a través de un enlazador escindible. Los MP1's capturan células u otras unidades estructurales, por ejemplo virus. A continuación, las MP1 se transportan al siguiente compartimento a través de una estructura tipo válvula. Esto constituye una primera etapa de concentración ascendente, en la que el volumen es reducido, por ejemplo de 1 ml a 50 μ l. En el segundo compartimento, una enzima escinde las células de las MP1's. Los MP1 se retiran del compartimento en un subcompartimento. A continuación, las inmuno-MP2' se suministran desde otro subcompartimento, por lo que estas MP2 no tienen un enlazador escindible. Las MP2 atrapan las células. A continuación, las MP2 se transportan al siguiente compartimento a través de una estructura tipo válvula, que representa una segunda etapa de concentración ascendente, por ejemplo reduciendo el volumen de 50 μ l a 2 μ l. En el tercer compartimento, las células son sometidas a lisis. A continuación, las moléculas de sonda se unen a las dianas en el lisado. Por ejemplo oligo-biotina y oligo-FITC se unen específicamente al ARN liberado. A continuación, las inmuno-MP se extraen del compartimento en un subcompartimento, y los Strept-MP se liberan en el tercer compartimento desde otro subcompartimento. Estos se unen a las sondas biotiniladas. A continuación, los Strept-MP se transportan al cuarto compartimento a través de una estructura tipo válvula. En el cuarto compartimento, la detección se realiza usando anticuerpos anti-FITC.

Ejemplo 5 (no de acuerdo con la invención) - Dispositivo para movilización de microfluidos con canales de lavado

Se fabricó un dispositivo plano para movilización de microfluidos sin canales físicos que contenía áreas de lavado, como se describe en la Figura 4. Se formaron canales virtuales y áreas de lavado mediante hidrofiliación local de ambos sustratos de vidrio. Un canal (1) virtual se llenó con partículas magnéticas y un fluido de color (Orange II sal de sodio II en agua), el otro canal (3) y las áreas (2) de lavado se llenaron con agua. Las perlas magnéticas se arrastraron con un imán permanente desde un canal (1) sobre las barreras hidrófobas y a través de las áreas (2) de lavado, hacia el siguiente canal (3); el disolvente de migración conjunta se diluyó en cada área de lavado, lo que podría verse en las concentraciones decrecientes de Orange II después de cada paso sobre una barrera hidrófoba.

Ejemplo 6: - Dispositivo para movilización de microfluidos para pruebas integradas de ácidos nucleicos

Un dispositivo que se representa mediante la Figura 5 b) o una configuración similar se puede usar para la prueba integrada de ácidos nucleicos. Se introduce una muestra a través de la entrada (entrada). Las células se capturan y se transportan desde el compartimento (1) a (2) usando partículas magnéticas que comprenden moléculas de captura (por ejemplo, anticuerpos) que son específicas para las células de interés. Opcionalmente, el sobrenadante puede eliminarse a través de la salida (salida). En el compartimento (2), las células se someten a lisis y las primeras partículas magnéticas se eliminan en un compartimento de almacenamiento separado. Posteriormente, se agrega un segundo lote de partículas magnéticas que reconocen ácidos nucleicos o una clase de materiales de ácidos nucleicos de un compartimento de almacenamiento adicional. Los ácidos nucleicos son luego cotransportados con las partículas magnéticas en el compartimento (3), donde el material de ácidos nucleicos puede ser liberado de las partículas magnéticas, donde las segundas partículas magnéticas pueden ser retiradas en un compartimento de almacenamiento, y donde posteriormente los ácidos nucleicos son amplificados (por ejemplo, por PCR). Una tercera especie de partículas magnéticas, que comprende moléculas de captura que reconocen solo ácidos nucleicos amplificados, se usa luego para cotransportar ácidos nucleicos amplificados en el compartimento (4), donde se detectan los ácidos nucleicos amplificados.

Ejemplo 7 (no de acuerdo con la invención) - Canal hidrófilo entre dos compartimentos con dos superficies hidrófobas.

Se han llevado a cabo experimentos con dos tipos de dispositivos: el dispositivo 7.1 con dos superficies hidrófobas presentes en un canal que conecta dos compartimentos y el dispositivo 7.2 que contiene dos compartimentos conectados con un canal con una superficie hidrófoba y una ligeramente hidrófila.

La parte inferior de ambos dispositivos es un portaobjetos de vidrio microscópico sobre el que se aplica una monocapa autoensamblada (SAM) de perfluorodecil-tri-etoxisilano. Esta SAM se elimina parcialmente mediante el tratamiento con plasma de oxígeno, dejando un patrón de cámaras hidrófilas como islas en un fondo hidrófobo. Para el dispositivo 7.1, la parte superior es una lámina de PMMA que se ha recubierto en Telfon™ AF 1600. Para el

dispositivo 7.2, la parte superior es una diapositiva no tratada de PMMA. En ambos dispositivos, la parte superior está separada de la parte inferior por una cinta de doble cara de 100 μm de grosor.

- 5 La SAM rica en flúor tiene un ángulo de contacto de aproximadamente 105° . El PMMA no tratado tiene un ángulo de contacto de aproximadamente 75° , mientras que el PMMA recubierto por inmersión en TeflonTM AF 1600 tiene un ángulo de contacto de aproximadamente 115° .

Se usó el procedimiento general como se describe en los ejemplos anteriores.

- 10 Después de la fusión de las partículas magnéticas con el segundo fluido, la conexión del fluido se desprendió en el dispositivo con dos superficies hidrófobas (7.1) y no en el dispositivo con una superficie hidrófoba y una superficie hidrófila (7.2). Por lo tanto, se puede concluir que la hidrofobicidad de las partes superior e inferior es preferencial para un buen desprendimiento.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para transferir partículas magnéticas de una muestra de fluidos a través de una estructura (3) tipo válvula a un segundo fluido, que comprende los pasos de:
- (a) proporcionar un cartucho de microfluidos que comprende al menos dos compartimentos (1, 2) conectados por la estructura (3) de tipo válvula donde la estructura tipo válvula puede permitir el paso de dichas partículas magnéticas tras el accionamiento magnético y en donde la estructura tipo válvula evita la mezcla de los dos fluidos en ausencia de una fuerza magnética;
- 10 (b) llenar un primero de los al menos dos compartimentos con la muestra de fluidos que comprende partículas magnéticas,
- 15 (c) aplicar una fuerza magnética que arrastra dichas partículas magnéticas a través de la estructura tipo válvula transfiriéndolas desde un primero de los al menos dos compartimentos al segundo compartimento; donde el segundo compartimento se llena con el segundo fluido; en donde la estructura tipo válvula comprende una obstrucción deformable y la fuerza magnética impulsa las partículas a través de la obstrucción deformable que dificulta el paso de fluidos, y
- 20 en donde la obstrucción deformable es o comprende un medio viscoelástico, en donde el medio viscoelástico se selecciona de un fluido, en particular un gas, un sólido deformable o una combinación de los mismos,
- en donde la función de válvula de la estructura tipo válvula es efectuada por el medio viscoelástico, y un material o característica adicional define la ubicación estable del medio viscoelástico si este último es un fluido.
- 25 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la estructura tipo válvula es parte de un canal capilar que conecta los al menos dos compartimentos.
- 30 3. Un método para transferir partículas magnéticas desde una muestra de fluidos a través de una estructura tipo válvula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde la estructura tipo válvula comprende una barrera hidrófoba y la fuerza magnética impulsa las partículas a través de la barrera hidrófoba.
- 35 4. Un método para transferir partículas magnéticas desde una muestra de fluidos a través de una estructura tipo válvula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde la estructura tipo válvula comprende un material o característica adicional que define la ubicación del medio, como por ejemplo una estructura o región mecánica que sustancialmente inmoviliza la interfaz gas/fluido o fluido/fluido, como por ejemplo una estructura de fijación mecánica y/o una transición de energía de superficie en el dispositivo.
- 40 5. Un método para transferir partículas magnéticas desde una muestra de fluidos a través de una estructura tipo válvula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el método comprende adicionalmente dos etapas entre la etapa (b) y (c):
- concentrar las partículas magnéticas cerca de la estructura tipo válvula mediante accionamiento magnético,
- 45 - pasar las partículas por accionamiento con una fuerza magnética a través de la estructura tipo válvula.
6. Un método para transferir partículas magnéticas desde una muestra de fluidos a través de una estructura tipo válvula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde una diana unida a las partículas magnéticas es cotransportada con las partículas magnéticas desde el primer compartimento hasta el segundo compartimento.
- 50 7. Un método para transferir partículas magnéticas desde una muestra de fluidos a través de una estructura tipo válvula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde durante el transporte de partículas desde el primer al segundo compartimento, la estructura tipo válvula hace que las partículas pierden una parte esencial del fluido cotransportado del primer compartimento antes de que las partículas entren en el segundo compartimento.
- 55 8. Un método para transferir partículas magnéticas desde una muestra de fluidos a través de una estructura tipo válvula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la relación entre el volumen de las partículas magnéticas y el fluido cotransportado del primer compartimento es mayor que 0.05.
- 60 9. Cartucho para movilización de microfluidos para realizar un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende al menos dos compartimentos (1, 2) conectados por una estructura (3) similar a una válvula en la que la estructura tipo válvula impide la mezcla de los dos fluidos en ausencia de una fuerza magnética;
- 65

en donde la estructura tipo válvula comprende una obstrucción deformable hecha de un medio viscoelástico seleccionado de un fluido, en particular un gas, un sólido deformable o una combinación de los mismos;

5 en donde la obstrucción deformable impide el paso de fluidos y permite el paso de partículas magnéticas a través de los mismos; y

en donde un material o característica adicional define la ubicación estable del medio viscoelástico si este último es un fluido, por ejemplo un gas; y

10 en donde la función de la válvula de la estructura tipo válvula se efectúa mediante el medio viscoelástico.

10. Un sistema para movilización de microfluidos que comprende un cartucho para movilización de microfluidos de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende además una fuente magnética dispuesta para aplicar una fuerza magnética que arrastra dichas partículas magnéticas a través de la estructura tipo válvula que la transfiere desde el primer compartimento al segundo compartimento.

11. El sistema de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la fuente magnética se selecciona de un grupo que comprende un electroimán, un cable de corriente integrado, un imán permanente y un imán permanente o electroimán que se mueve mecánicamente.

20 12. Uso de un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 9 o un sistema de acuerdo con la reivindicación 10 u 11 en un ensayo bioquímico seleccionado del grupo que comprende el ensayo de unión/desunión, ensayo en sándwich, ensayo de competencia, ensayo de desplazamiento y ensayo enzimático.

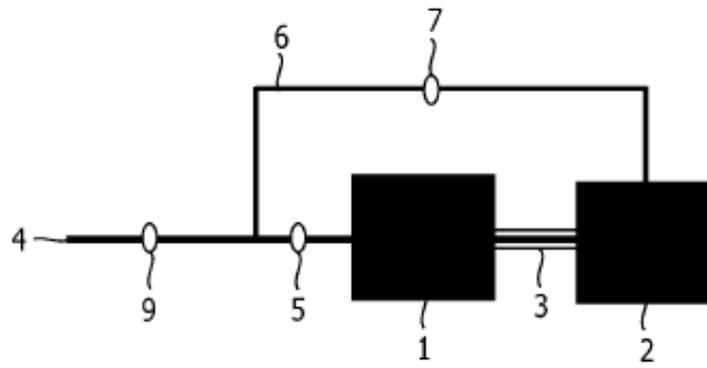


FIG. 1

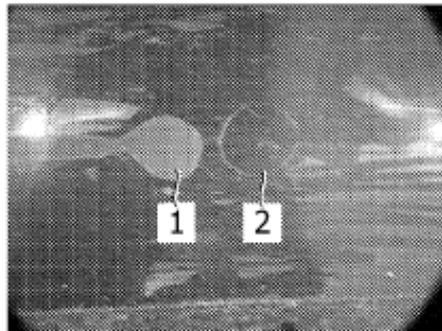


FIG. 2

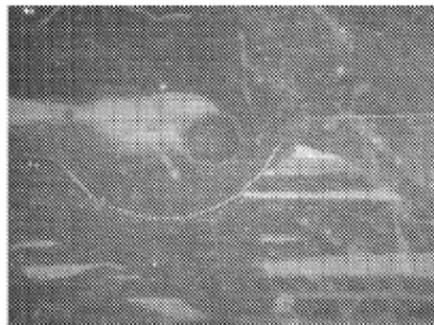


FIG. 3

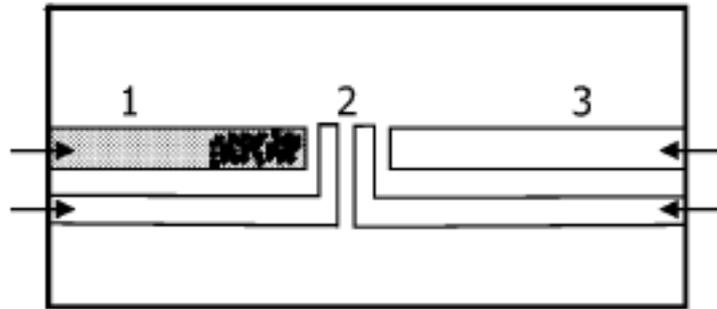


FIG. 4a

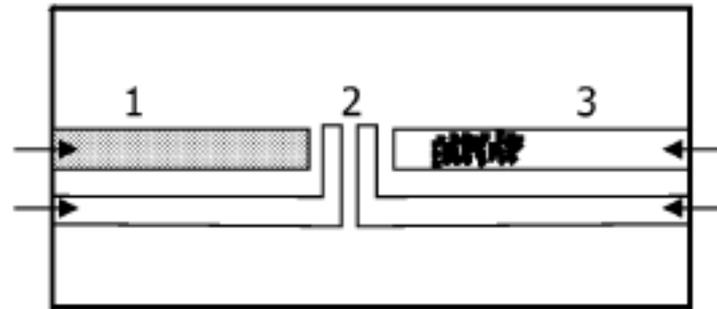


FIG. 4b

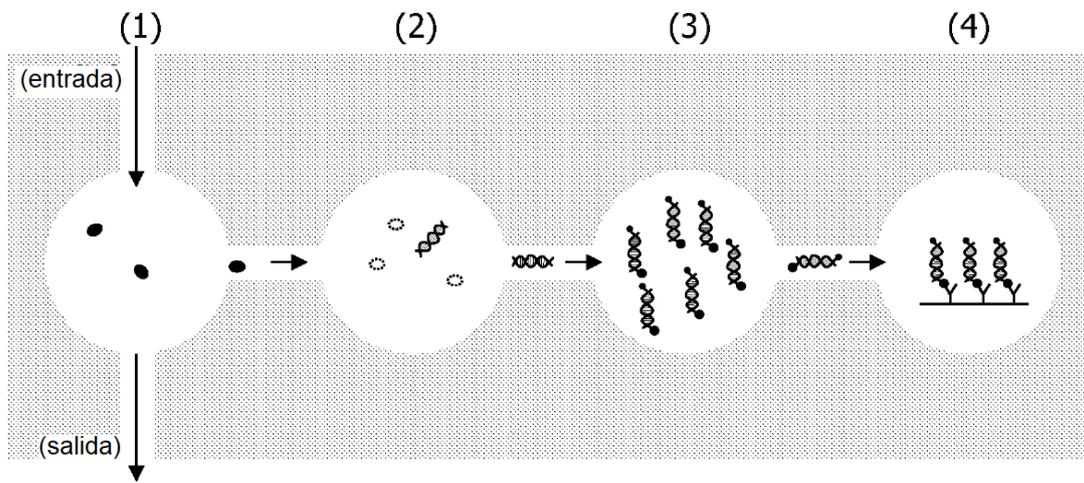


FIG. 5a

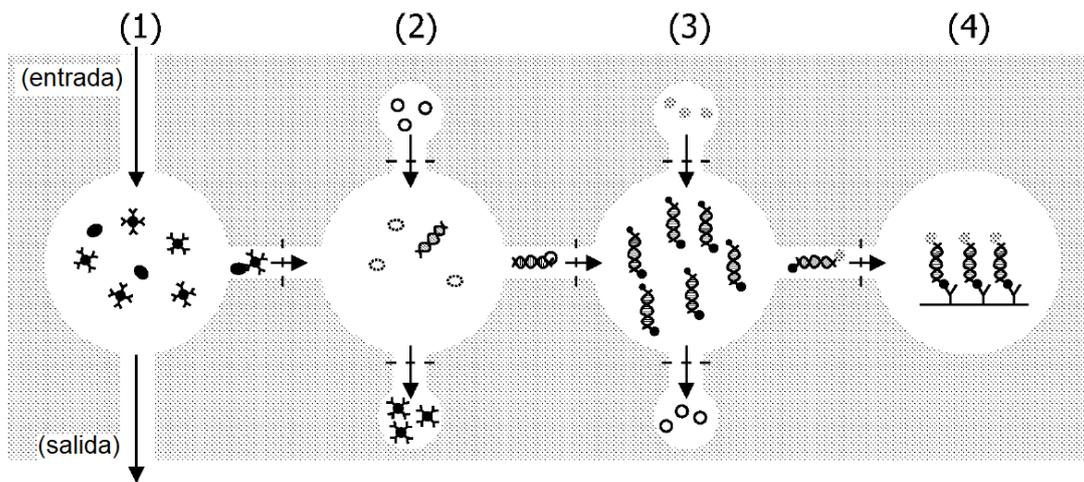


FIG. 5b