

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 422**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 27/74 (2006.01)

H01F 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.11.2013 PCT/EP2013/074736**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.07.2014 WO14111187**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2013 E 13795765 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 2946209**

54 Título: **Procedimiento de captura de una molécula en una muestra**

30 Prioridad:

17.01.2013 FR 1350421

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.05.2019

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) (50.0%)
3, rue Michel Ange
75016 Paris, FR y
INSTITUT POLYTECHNIQUE DE GRENOBLE
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**BLAIRE, GUILLAUME;
ZANINI, LUIZ FERNANDO;
REYNE, GILBERT;
DEMPSEY, NORA;
WEIDENHAUPT, MARIANNE;
BRUCKERT, FRANZ y
CUGAT, ORPHÉE**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 711 422 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

Procedimiento de captura de una molécula en una muestra

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de captura y a un procedimiento de detección, en concreto por inmunoanálisis ("immunoassay" según la terminología anglosajona) de una molécula en una muestra, siendo típicamente dicha molécula que se va a capturar o detectar un antígeno o un anticuerpo. Se describe también a continuación un kit de captura de una molécula adecuado para llevar a cabo dichos procedimientos.

Antecedentes de la invención

10 El ensayo ELISA (acrónimo del término anglosajón "Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay") se usa habitualmente para diagnosticar de forma cuantitativa marcadores moleculares (antígenos o anticuerpos) presentes en fluidos, biopsias, cultivos o cualquier otra muestra.

Este ensayo se usa en particular para el diagnóstico de infecciones (VIH, HPV, etc.), el estado del sistema cardiovascular e inmunitario (troponina C, anticuerpos específicos, etc.), la presencia y el desarrollo de cánceres (PSA, CEA, etc.).

15 Esta técnica, que actualmente es el más sólido y más extendido de los métodos de diagnóstico, tiene, no obstante, inconvenientes, concretamente su complejidad, el uso de equipos automáticos caros y su duración que puede llegar a varias horas.

20 El ensayo ELISA es una técnica de inmunoanálisis en fase heterogénea, es decir, que necesita un soporte sólido (típicamente una placa de valoración que comprende una pluralidad de pocillos) en el que se fija previamente una molécula adecuada para capturar la molécula que se va a determinar.

Una vez que la molécula de interés se ha capturado sobre dicho soporte, un lavado permite retirar el resto de la muestra y proceder a la etapa de detección y cuantificación de dicha molécula.

25 Por ejemplo, en el caso del ensayo ELISA llamado "sándwich" que permite determinar un antígeno en una solución, la superficie del soporte se recubre con una cantidad determinada de un anticuerpo llamado de captura, siendo adecuado dicho anticuerpo para unirse al antígeno buscado.

Después se aplica sobre el soporte la solución que puede contener dicho antígeno; dicho antígeno se une entonces al anticuerpo de captura situado sobre la superficie del soporte.

A continuación, se lleva a cabo un lavado del soporte para retirar el antígeno no unido que queda posiblemente en la solución.

30 Se deposita entonces sobre el soporte una solución que contiene un anticuerpo llamado anticuerpo de detección, que es adecuado para unirse al antígeno fijado sobre el soporte y que además está acoplado a una enzima.

Se lleva a cabo una nueva etapa de lavado de modo que se conserve sobre el soporte el antígeno unido al anticuerpo de detección, estando dicho anticuerpo él mismo acoplado con la enzima.

35 Finalmente, para la detección y cuantificación del antígeno, se deposita sobre el soporte un sustrato que la enzima convierte en una señal detectable (por ejemplo, un color, o de forma espectroscópica, es decir, por emisión de fluorescencia) representativa de la unión entre el antígeno y el anticuerpo de detección.

Dicha señal se puede observar a simple vista o mediante un instrumento, tal como un espectrofotómetro.

El ensayo ELISA comprende diferentes implementaciones, pero todas comprenden múltiples etapas de injerto e incubación separadas por etapas de lavado.

40 La importante duración del ensayo ELISA se debe esencialmente a la sucesión de las diferentes etapas.

Ya se han descrito variantes de este ensayo que aplican microesferas magnéticas.

45 El artículo de D. Issadore et al, "Self-assembled magnetic filter for highly efficient immunomagnetic séparation", *Lab Chip*, 2011, 11, 147, describe así un procedimiento de captura de una molécula en una muestra, haciendo circular dicha muestra en un microcanal fluidoico dispuesto debajo de una matriz de polidimetilsiloxano (PDMS) en la que se han inmovilizado granos magnéticos de NdFeB.

Por el procedimiento de fabricación llevado a cabo para dicho soporte, los granos se reparten de forma aleatoria en el espesor de la matriz y su orientación magnética es aleatoria.

Cada grano genera un gradiente de campo magnético que puede atraer partículas magnéticas de un diámetro de 1 μm acopladas a las moléculas que se van a detectar para formar complejos.

5 Sin embargo, dicho gradiente de campo magnético es tanto menos eficaz cuanto menor es el tamaño de las partículas a capturar, de modo que este dispositivo tiene menor eficacia para la captura de partículas magnéticas de dimensiones inferiores a 1 μm , por ejemplo del orden de 500 nm o menos, y en concreto de nanopartículas.

Por otra parte, la captura de las partículas magnéticas es relativamente lenta.

A esta etapa de captura le sigue un lavado de la superficie de la matriz de PDMS y después una detección por fluorescencia de los complejos inmovilizados sobre dicha superficie.

10 Se conocen también del documento WO2007125129 estructuras de imán(es) permanente(s) para el atrapamiento y/o guiado y/o filtrado de partículas diamagnéticas o de susceptibilidad magnética inferior a la susceptibilidad magnética del medio que rodea las partículas. Las microfuentes de campo magnético están ordenadas y dichas partículas pueden ser microesferas funcionalizadas.

15 Por otra parte, se conocen procedimientos de captura de partículas magnéticas en una gota colocada sobre un soporte plano que contiene microfuentes de campos magnéticos ordenados (ZANINI Luiz Fernando: "Bio-Mag-MEMS autonomes basés sur des aimants permanents", Tesis, 3 de mayo 2013, páginas 1-166).

Además, se conocen procedimientos de captura de moléculas magnéticas presentes en el interior de un microcanal que contiene las microfuentes de campos magnéticos (Guillaume BLAIRE et al: "Hybrid Bio-Mag-MEMS combining magnetophoresis and dielectrophoresis", *The European Physical Journal B*, vol. 86, n°4, 1 de abril de 2013).

20 El documento WO2013/174881 (técnica anterior según el artículo 54(3) CBE) describe un procedimiento de fabricación de un soporte que comprende microfuentes de campos magnéticos ordenadas.

Breve descripción de la invención

Un objeto de la invención es proponer un procedimiento de detección de una molécula tal como antígeno o un anticuerpo, que necesite un número limitado de etapas, incluso una sola etapa, y que sea sensiblemente más corto que los ensayos conocidos.

25 Este procedimiento debe ser además compatible con los instrumentos usados ya por los biólogos, tales como las placas de valoración, fluorímetros, pipetas de multicanales, de modo que se pueda poner en práctica directamente en los laboratorios de investigación y análisis.

De acuerdo con la invención, se propone un procedimiento de captura de una molécula en una muestra según la reivindicación 1.

30 Por "ordenadas", se entiende que las microfuentes de campo magnético están repartidas en el entorno de la superficie del soporte dirigida a estar en contacto con la muestra, según un motivo determinado y que presentan además una orientación magnética determinada. Dicho ordenamiento excluye, de hecho, un reparto y/o una orientación aleatoria de las microfuentes de campo magnético.

35 Según una realización de la invención, el procedimiento comprende una etapa de lavado de dicho soporte para retirar dicha muestra, quedando retenidos los complejos sobre el soporte por las microfuentes de campo magnético.

Según otra realización de la invención, la detección de los complejos se puede llevar a cabo a nivel de las microfuentes de campo magnético ordenadas, sin lavado previo del soporte.

Por molécula se entiende en el presente texto una proteína, en concreto un anticuerpo, un ácido nucleico (ADN o ARN), un virus, una bacteria, un antígeno, una célula y de forma general cualquier objeto biológico.

40 Preferiblemente, las partículas magnéticas presentan un diámetro comprendido entre 5 y 50 nm.

Según una realización, el soporte comprende una matriz no magnética que encierra una pluralidad de aglomerados tridimensionales ordenados de micro o nanopartículas imantadas de un material magnético duro o blando, formando dichos aglomerados las microfuentes de campo magnético.

45 Según otra realización, el soporte comprende una matriz no magnética que encierra una pluralidad de microbobinas magnéticas ordenadas según un motivo determinado con respecto a la superficie del soporte.

Dicha matriz no magnética puede ser flexible.

Además, dicha matriz no magnética puede ser de un material traslúcido o transparente.

Según una forma de realización de la invención, la molécula que se va a capturar es un antígeno y el elemento capaz de unirse a dicha molécula es un anticuerpo receptor de dicho antígeno.

Opcionalmente, se añade a dicha mezcla un anticuerpo llamado de detección que lleva un marcador fluorescente, luminiscente o colorimétrico, siendo capaz dicho anticuerpo de unirse al antígeno unido al anticuerpo acoplado a la partícula magnética. El anticuerpo de detección puede estar también marcado con una enzima que cataliza una reacción de oxidorreducción que permite una detección electroquímica.

- 5 Según otra forma de realización de la invención, la molécula que se va a capturar es un anticuerpo y el elemento capaz de unirse a dicha molécula es un antígeno reconocido por dicho anticuerpo.

Según una realización, el soporte es una placa de valoración que comprende una pluralidad de pocillos, estando dispuestas las microfuentes de campo magnético en una pared de cada uno de dichos pocillos, depositándose la mezcla en al menos uno de dichos pocillos.

- 10 En el procedimiento de la invención, el soporte es una placa plana que comprende una pluralidad de microfuentes de campo magnético, depositándose la mezcla en forma de la menos una gota sobre dicho soporte.

Según otra realización, el soporte es un canal microfluídico en donde al menos una de las paredes comprende las microfuentes de campo magnético.

- 15 A continuación, se describe un procedimiento de detección y, si procede, de cuantificación de una molécula, en el que se captura dicha molécula sobre un soporte llevando a cabo el procedimiento de captura descrito más arriba, y después se lleva a cabo una etapa de detección de dicha molécula.

La detección de la molécula capturada sobre el soporte se puede hacer por fluorescencia, luminiscencia, colorimetría, electroquímica y/o radiometría.

- 20 Una primera ventaja de este procedimiento es la reducción significativa del número de etapas previas a la detección y, si procede, a la cuantificación (siendo necesarias solo una etapa de mezcla, y opcionalmente, una etapa de lavado), con respecto a los ensayos de inmunoanálisis conocidos (el ensayo de ELISA sándwich convencional comprende como mínimo seis etapas).

- 25 De hecho, la atracción de las partículas magnéticas por las microfuentes de campo magnético permite por una parte extraer rápidamente los objetos asociados a dichas partículas, y por otra parte, asegurar un lavado más eficaz (en el caso en el que se lleve a cabo dicho lavado), reteniendo firmemente las fuerzas de interacción magnética los complejos inmovilizados que se desea conservar.

Además, este procedimiento ofrece una alternativa al conjunto de las posibles implementaciones del ensayo ELISA, y se puede llevar a cabo para realizar ensayos de tipo "sándwich" y también ensayos directos o ensayos competitivos seleccionando los antígenos y anticuerpos adecuados.

- 30 Este procedimiento también se puede adaptar para realizar ensayos de inmunoprecipitación.

Otra ventaja de este procedimiento es su gran simplicidad de aplicación y su bajo coste, asociado a la ausencia de necesidad de fuente de energía externa para la captura de los complejos y el lavado.

- 35 En la medida en que se pueda evitar la etapa de lavado previa a la detección, el procedimiento puede comprender solo una etapa única de mezcla en contacto con el soporte que comprende las microfuentes de campo magnético ordenadas.

Debido a esta simplicidad, el procedimiento se podría llevar a cabo en un dispositivo de ensayo integrado del tipo "point-of-care" (de diagnóstico inmediato). Más adelante se describe un kit de captura de una molécula para llevar a cabo el procedimiento de captura reivindicado.

- 40 Dichas partículas magnéticas presentan una superficie funcionalizada adecuada para el acoplamiento de un elemento capaz de unirse selectivamente a dicha molécula.

Según una realización, el soporte es una placa de valoración que comprende una pluralidad de pocillos, estando dispuestas las microfuentes de campo magnético en al menos una pared de cada pocillo.

Según una realización, el soporte es una placa plana en cuya superficie están dispuestas las microfuentes de campo magnético.

- 45 Según una realización, el soporte es un microcanal fluídico, estando dispuestas las microfuentes de campo magnético en la superficie de al menos una de las paredes de dicho microcanal.

Otra ventaja de este procedimiento es que permite una detección sin lavado de la molécula capturada, gracias a que el experimentador conoce las zonas donde son capturadas las partículas magnéticas. La señal específica se obtiene restando a la señal total una señal que corresponde a la captura no específica de moléculas.

5 Según una realización, las moléculas son detectadas por fluorescencia, luminiscencia o colorimetría gracias a un anticuerpo de detección. Una imagen de fluorescencia, luminiscencia o absorbancia de la superficie que lleva los microimanes permite determinar la señal específica y no específica. La señal total corresponde a la presencia de moléculas a nivel de las zonas de fuerte gradiente del campo magnético, la señal no específica corresponde a la presencia de moléculas en las zonas de gradientes débiles del campo magnético.

10 Según otra realización, las moléculas son detectadas por electroquímica gracias a un anticuerpo de detección acoplado a una enzima que tiene propiedades de oxidorreducción. Se disponen electrodos sobre la superficie del soporte de modo que permitan la medición de la señal total y no específica. La señal total corresponde a los electrodos dispuestos a nivel de las microfuentes de campo magnético ordenadas, la señal no específica corresponde a los electrodos dispuestos a nivel de zonas desprovistas de microfuentes de campo magnético.

Breve descripción de los dibujos

Otras características y ventajas de la invención saldrán de la siguiente descripción detallada, en referencia a los dibujos adjuntos en los que:

15 - las figuras 1A a 1C son vistas esquemáticas de las etapas para llevar a cabo el procedimiento de detección según una realización,

- la figura 2 ilustra de forma esquemática una superficie magnéticamente estructurada de modo que forma microfuentes de campo magnético,

20 - las figuras 3A a 3D ilustran de forma esquemática las diferentes etapas del procedimiento de impresión termomagnética que permite hacer un soporte que comprende microfuentes de campo magnético,

- las figuras 4A a 4D ilustran de forma esquemática las diferentes etapas del procedimiento llamado "Micro Magnetic Imprinting",

- la figura 5 ilustra una forma de realización de la invención en la que la mezcla se deposita sobre un soporte plano en forma de una gota,

25 - la figura 6 presenta una comparación de los porcentajes de las bolas capturadas sobre un soporte plano y en un pocillo de valoración en función del tiempo,

- las figuras 7A a 7E ilustran un procedimiento de fabricación de un microcanal fluídico que comprende microfuentes de campo magnético que permiten llevar a cabo el procedimiento según la invención,

- la figura 8 es una curva de la señal de fluorescencia en función de la cantidad de antígeno obtenido durante los experimentos,

30 - la figura 9 representa las líneas de corriente de un fluido que contiene partículas magnéticas puesto en contacto con un soporte que comprende dos dominios magnéticos imantados en direcciones opuestas,

- la figura 10A representa la distribución de complejos fluorescentes capturados por las partículas magnéticas a nivel de microfuentes de campo magnético, determinada durante los experimentos y observada por microscopio; la figura 10B ilustra la relación entre la señal específica y la señal no específica medida en las imágenes de microscopio del tipo de la figura 10A.

35

Descripción detallada de realizaciones de la invención

Las figuras 1A a 1C ilustran de forma esquemática las principales etapas del procedimiento de detección según una realización de la invención que corresponde a un ensayo de inmunoanálisis de tipo "sándwich".

En este caso la molécula que se va a detectar y determinar es un antígeno.

40 Según este procedimiento, se lleva a cabo una mezcla de los siguientes elementos:

- una muestra que puede contener el antígeno 1 cuya presencia se desea detectar y cuantificar,

- partículas magnéticas 2 previamente acopladas a un anticuerpo de captura 3, es decir una proteína receptora específica del antígeno a detectar, en exceso con respecto al antígeno,

45 - un anticuerpo de detección 4 que lleva un marcador 5 fluorescente, luminiscente o coloreado, en exceso con respecto al antígeno.

Dicho marcador 5 lo puede llevar directamente el anticuerpo de detección o indirectamente, por medio de una enzima.

Dicha mezcla se realiza en un recipiente en el que, bajo el efecto de la difusión de los diferentes constituyentes, el antígeno 1 se une al anticuerpo de captura 3 acoplado a una partícula magnética 2, y después el anticuerpo de detección 4 se une al antígeno 1.

5 Se forma así un complejo "sándwich" formado por una partícula magnética 2, el anticuerpo de captura 3, el antígeno 1, el anticuerpo de detección 4 y el marcador 5.

Las uniones entre el antígeno y el anticuerpo de captura, y entre el anticuerpo de detección y el antígeno, son uniones no covalentes.

En cambio, el acoplamiento entre la partícula magnética y el anticuerpo es una unión covalente.

10 Dicha mezcla se deposita, por ejemplo mediante una pipeta, sobre un soporte que comprende microfuentes de campo magnético ordenadas.

15 Las microfuentes de campo magnético tienen el efecto de atraer las partículas magnéticas y por consiguiente de inmovilizar los complejos precipitados sobre el soporte, según un motivo que está estrechamente relacionado con el ordenamiento de las microfuentes de campo magnético en relación con la superficie de dicho soporte. Por ejemplo, si las microfuentes de campo magnético están dispuestas en forma de tablero de ajedrez en el que dos casillas adyacentes presentan imantaciones de sentido opuesto, las partículas magnéticas se inmovilizarán a nivel de la unión entre las dos microfuentes de campo magnético, que es el sitio donde el campo de dispersión, así como su gradiente, es más intenso.

Los antígenos no unidos a partículas magnéticas y los anticuerpos marcados no unidos al antígeno no son atraídos por las microfuentes de campo magnético y quedan en suspensión en la mezcla.

20 Una etapa opcional de lavado permite eliminar estos residuos y conservar en el soporte solo los complejos, estando estos retenidos por las microfuentes de campo magnético por interacción con las partículas magnéticas.

De hecho, la fuerza magnética generada sobre los complejos por las microfuentes de campo magnético (que son capaces de generar gradientes de campo magnético muy fuertes) es superior a la fuerza de aspiración ejercida durante el lavado.

25 Así se capturan y mantienen sobre el soporte las moléculas de interés, acopladas a las partículas magnéticas.

Sin embargo, como se expone en detalle más adelante, también se puede no realizar la etapa de lavado. En efecto, el conocimiento del ordenamiento de las microfuentes de campo magnético con respecto a la superficie del soporte y llevar a cabo una técnica de detección adecuada, permiten detectar partículas atrapadas por dichas microfuentes ordenadas sin que sea necesario retirar la muestra o lavar la superficie del soporte.

30 Una vez realizada esta captura, se puede llevar a cabo entonces un método de cuantificación conocido por el experto en la técnica, según la naturaleza de los marcadores usados.

Entre estos métodos de cuantificación, se pueden señalar la fluorescencia, luminiscencia, colorimetría, una reacción de oxidorreducción, radiactividad, turbidimetría, detección magnética por micro y nanosensores magnéticos, GMR localizados, etc.

35 La duración total de este ensayo típicamente está comprendida entre 10 y 20 minutos, mientras que está comprendida entre 2 y 6 horas para un ensayo ELISA que lleva a cabo las etapas clásicas de mezcla y detección.

Con respecto al ensayo ELISA que, como se ha indicado más arriba, es un procedimiento de inmunoanálisis en fase heterogénea, el procedimiento según la invención se puede considerar como un procedimiento de inmunoanálisis en fase homogénea.

40 En efecto, la unión entre el antígeno que se va a determinar y el anticuerpo de detección se produce en el volumen de la muestra y no sobre la superficie del soporte, estando destinado dicho soporte únicamente a la inmovilización de los complejos durante el lavado previo a la detección y la cuantificación o en vista de una detección directa sin lavado tal como se ha considerado más arriba.

45 La presencia, en dicho volumen, de un gran número de partículas magnéticas de dimensiones que pueden ser inferiores a las usadas en los procedimientos conocidos, y el coeficiente de difusión elevado que confiere a estas partículas su pequeño tamaño, aumenta su probabilidad de encontrarse con los antígenos y los anticuerpos de detección.

50 Hay que indicar que, aunque el ejemplo dado antes se refiere a un ensayo de inmunoanálisis de tipo "sándwich", que puede reemplazar el ensayo ELISA sándwich clásico, el procedimiento se puede ajustar para ofrecer las mismas modalidades que otros ensayos de inmunoanálisis (de tipo ELISA directo o ELISA competitivo) u otros procedimientos que implican la captura de una molécula, tales como la inmunoprecipitación.

Por ejemplo, un ensayo de inmunoprecipitación está dirigido a purificar una proteína determinada en una muestra que comprende una pluralidad de proteínas.

Este ensayo usa anticuerpos adecuados para unirse selectivamente a la proteína que se desea detectar.

5 En dicho ensayo, dichos anticuerpos se acoplan a una pluralidad de partículas magnéticas y se introducen dichas partículas en la muestra.

Los anticuerpos unidos a las partículas magnéticas se van a unir entonces a las proteínas que son reconocidas específicamente.

Las proteínas que se quieren aislar están unidas a los anticuerpos que están ellos mismos acoplados a las partículas magnéticas, formando así complejos.

10 Gracias a las microfuentes de campo magnético ordenadas, se pueden inmovilizar entonces dichos complejos sobre un soporte y después, si es necesario, proceder a un lavado para retirar el resto de la muestra.

Al contrario, en los procedimientos que no usan fuentes de campo magnético, los anticuerpos se unen químicamente a los pocillos de la placa de valoración que se ha funcionalizado previamente.

15 Con respecto al procedimiento de D. Issadore et al., el uso de un soporte que comprende microfuentes de campo magnético ordenadas permite, para un tamaño dado de las partículas magnéticas, aumentar el alcance de las microfuentes de campo magnético y/o, para un alcance dado, aumentar la fuerza ejercida sobre las partículas de pequeño tamaño.

Por consiguiente, la invención permite una captura más rápida y más eficaz.

20 Por otra parte, el ordenamiento de las microfuentes de campo magnético permite realizar la detección sin proceder necesariamente al lavado del soporte, lo cual no es posible cuando las microfuentes de campo magnético están dispuestas aleatoriamente en el soporte, no pudiendo entonces el experto en la técnica diferenciar las partículas capturadas de las partículas no capturadas.

Partículas magnéticas

25 Las partículas usadas son partículas magnéticas de dimensiones micrométricas (micropartículas) o nanométricas (nanopartículas).

De forma ventajosa, dichas partículas son equivalentes a bolas.

En el texto que sigue, las partículas se podrán denominar por lo tanto por el término "bolas" aunque su geometría no sea una esfera perfecta.

30 Dichas bolas están disponibles en el mercado en grandes cantidades y bajo coste, en concreto para aplicaciones tales como la imagenología por resonancia magnética (IRM) lo cual no encarece el coste del ensayo.

Preferiblemente, dichas bolas están monodispersas, confiriendo la uniformidad dimensional de las bolas iguales propiedades y mejorando así la difusión de las bolas en la mezcla y su captura por las microfuentes de campo magnético.

35 En algunos casos, las bolas se comercializan en forma dispersa en una matriz poco o que no es magnética, tal como un polímero, sílice (SiO₂), etc.

Las bolas preferiblemente son biocompatibles.

Para permitir el acoplamiento por unión covalente de un elemento destinado al acoplamiento selectivo con la molécula que se va a capturar, la superficie de las partículas se funcionaliza, por ejemplo, mediante proteínas A o G.

40 En el presente texto, el término "nanopartícula" indica un objeto cuyas tres dimensiones están en la escala nanométrica, es decir cuyo tamaño característico, por ejemplo, el diámetro medio si se trata de una bola, típicamente es inferior a 100 nm.

El término "micropartícula" indica un objeto cuyas tres dimensiones están en la escala micrométrica, es decir cuyo tamaño característico, por ejemplo, el diámetro medio si se trata de una bola, está comprendido entre 100 nm y 100 μm.

45 Salvo que se mencione lo contrario, el término "partícula" o "bola" usados en el texto a continuación abarca a la vez las nanopartículas y las micropartículas magnéticas.

Por sus dimensiones, las partículas magnéticas usadas presentan propiedades superparamagnéticas.

Se recuerda que el término "superparamagnético" indica la propiedad de las partículas de material ferromagnético o ferrimagnético de pequeñas dimensiones de cambiar aleatoriamente de dirección de imantación en ausencia de un campo magnético aplicado, bajo el efecto de la agitación térmica.

- 5 El carácter de ser superparamagnético implica que, en ausencia de cambio magnético de excitación exterior, las bolas no tienen ningún momento magnético neto, de modo que no son atraídas mutuamente, lo que evita su aglomeración.

Con respecto a las micropartículas, las nanopartículas una vez acopladas con un anticuerpo, presentan rendimientos mucho más importantes en términos de captura de antígenos.

Esta mejora se puede explicar por la reducción de escala de las nanopartículas con respecto a las micropartículas.

- 10 Así, para una reducción de diámetro de un factor 100 (por ejemplo, entre una microbola de 3 μm de diámetro y una nanobola de 30 nm de diámetro):

- el coeficiente de difusión se multiplica por 100,
- la relación superficie/volumen se multiplica por 100,
- el número de bolas por m^3 se multiplica por 10^6 .

- 15 Al fijarse los anticuerpos de captura sobre la superficie de las partículas, el aumento de la relación superficie/volumen permite, con la misma masa de partículas, aumentar el número de anticuerpo de captura y por consiguiente mejorar la sensibilidad del ensayo.

Además, la disminución del tamaño de las partículas aumenta su velocidad de difusión en la mezcla y por lo tanto permite una formación más rápida de complejos.

- 20 Otra ventaja de las nanopartículas es que son de dimensiones equivalentes a los objetos biológicos (cadenas de ADN, marcadores de cáncer, proteínas específicas) que se quieren detectar.

Así, tienen el mismo movimiento browniano que estos objetos, lo que permite aumentar la capacidad de la captura.

- 25 Finalmente, el aumento del número de anticuerpos de captura gracias a las nanopartículas permite desplazar el equilibrio termodinámico de la reacción de asociación y, por lo tanto, podría permitir el uso de anticuerpos actualmente pasados por alto debido a su menor afinidad.

Por consiguiente, aunque el procedimiento según la invención se pueda llevar a cabo con cualquier tamaño de partícula magnética, se seleccionarán preferiblemente partículas que tengan un diámetro comprendido entre 5 nm y 1 μm , de modo más preferido entre 5 nm y 500 nm, incluso entre 5 nm y 100 nm o entre 5 y 50 nm.

Microfuentes de campo magnético

- 30 Por microfuente de campo magnético se entiende un imán cuyas tres dimensiones son de escala micrométrica, es decir cuya longitud, anchura y espesor son inferiores a 1 mm.

Según una realización, dichas microfuentes de campo magnético están constituidas por un material magnético duro que puede estar imantado de forma permanente.

- 35 Esto permite asegurar la autonomía del dispositivo de ensayo, es decir evitar la necesidad de una alimentación eléctrica o de un campo magnético externo para permitir la captura de las partículas superparamagnéticas.

No obstante, es posible que dichas microfuentes estén hechas de un material magnético blando, una fuente de campo magnético exterior (por ejemplo, un imán permanente o un electroimán) teniendo que colocarse entonces en la cercanía del soporte para imantarlos, temporalmente o de forma permanente.

- 40 El gradiente de campo magnético en general es más fuerte en la periferia de una microfuente de campo magnético y, si procede, en la interfase entre dos microfuentes de campo magnético orientadas de forma diferente.

Las microfuentes de campo magnético usadas en la invención generan campos magnéticos comparables a los de los imanes macroscópicos actualmente disponibles, es decir, de una intensidad del orden de 0,1 a 1×10^6 A/m.

En cambio, los gradientes de campo magnético medidos encima de la superficie del soporte pueden alcanzar 10^6 T/m, es decir varios órdenes de magnitud superiores a los gradientes generados por imanes macroscópicos.

- 45 Las fuerzas magnéticas inducidas sobre las partículas magnéticas son mucho más importantes que las generadas por imanes macroscópicos (es decir, que presentan al menos dos dimensiones superiores a 1 mm), lo que puede explicarse por el cambio de escala.

Así, la reducción en un factor 1000 de la fuente de campo magnético (por ejemplo, entre un imán cúbico de 10 mm de lado y un imán de 10 μm) tiene como efecto multiplicar por 1000 la fuerza magnética ejercida por la microfuerza.

Como resultado, dichas microfuentes de campo magnético son actualmente el único medio experimental demostrado que permite capturar eficazmente nanopartículas.

- 5 Hasta ahora, los autores de la invención han demostrado experimentalmente que estas microfuentes de campo magnético son de hecho capaces de capturar nanopartículas cuyo diámetro es superior o igual a 5 nm.

Sin embargo, el interés de las microfuentes de campo magnético no se limita a las nanopartículas superparamagnéticas.

- 10 De hecho, incluso para las micropartículas, el aumento de la fuerza magnética con respecto a la de los imanes macroscópicos convencionales facilita la captura de los complejos que comprenden las micropartículas.

Las microfuentes de campo magnético se pueden fabricar en concreto por uno de los siguientes procedimientos.

Según una realización de la invención, las microfuentes se fabrican por estructuración magnética a escala micrométrica de una capa de material magnético duro.

- 15 La producción de imanes permanentes eficaces a escalas micrométricas puede comprender las dos siguientes etapas sucesivas:

- la síntesis de películas magnéticas espesas eficaces, que presentan un espesor comprendido entre 1 y 100 μm ;

- la producción de microfuentes de campo magnético (equivalentes a microimanes permanentes) por estructuración magnética de dicha película magnética.

Síntesis de películas magnéticas

- 20 Se describe un procedimiento de deposición por vía física por pulverización por medio de triodo que permite la deposición de un material magnético en capas espesas (típicamente 1-100 μm) en N.M. Dempsey et al., *App. Phys. Lett.* 90, 092509 (2007).

A modo de ejemplo, se han sintetizado capas de NdFeB, FePt y SmCo y tienen notables propiedades magnéticas.

- 25 Se pueden considerar otros métodos de fabricación de imanes en capas, en particular la deposición electrolítica, deposición de sol-gel, deposición por evaporación, deposición por láser pulsado, etc.

También se puede llevar a cabo la unión de una capa de material magnético sobre un sustrato.

Los materiales que se pueden usar para formar capas son materiales magnéticos duros, que a continuación se pueden imantar de forma permanente.

- 30 Entre los materiales adecuados para este uso, se pueden mencionar los imanes basados en tierras raras, de fórmula RFeB (donde R consiste esencialmente en Nd, Pr, Tb, Dy o una mezcla de varios de estos elementos), RCo o RCoCu (estructura cristalográfica de tipo 1/5), RCoCuFe (estructuras cristalográficas de tipo 1/7 o 2/17), RFeN (donde R consiste esencialmente en Sm), aleaciones de metal de transición de la serie 3d (Fe, Co, Ni)-metal noble (Pt o Pd como elemento mayoritario), imanes de ferrita, imanes de MnBi, MnAl, MnGa, FeGa, AlNiCo.

- 35 Según una realización ventajosa, se selecciona el material magnético duro entre las familias de NdFeB, SmCo y FePt.

Por otra parte, la generación de campos magnéticos y gradientes de campos magnéticos importantes requiere una microestructuración magnética de la capa de material magnético duro. Es esta estructuración la que asegura el ordenamiento de las microfuentes de campo magnético.

- 40 De forma particularmente ventajosa, dicha capa se puede microestructurar magnéticamente mediante una de las dos técnicas presentadas a continuación.

Estructuración magnética por el método llamado "topográfico"

Esta técnica consiste en estructurar antes de la deposición, el sustrato sobre el que a continuación se deposita el material magnético duro y/o estructurar directamente la capa magnética.

Las dimensiones de las estructuraciones topográficas determinan las dimensiones de los microimanes obtenidos.

- 45 Cada parte de capa magnética grabada y/o depositada sobre un microsaliendo o en una microcavidad del sustrato se puede equiparar con un elemento magnético independiente.

Obsérvese que pueden ser necesarias etapas de planarización, litografía óptica, y ataque químico.

Estos microelementos hechos así a continuación se imantan según una dirección seleccionada.

Constituyen entonces un conjunto de microimanes independientes, que presentan todos la misma dirección de imantación [A. Walther et al., *J. Magn. Mag. Mat.* 321 (2009) 590].

- 5 Estos microimanes individuales, opcionalmente situados a diferentes alturas, constituyen sistemas que presentan gradientes muy fuertes de campo magnético a escalas micrométricas [M. Kustov et al., *J. App. Phys.* 108, 063914 (2010)].

La figura 2 ilustra de forma esquemática un ejemplo de microestructuración topográfica.

- 10 El sustrato 5 comprende una pluralidad de microcavidades que, en este ejemplo, se presentan en forma de zanjas paralelas.

Después se deposita el material magnético duro en estas zanjas de manera que forme regiones magnéticas paralelepípedas 6.

La formación de dichas cavidades y el depósito del material magnético son conocidos para el experto en la técnica, y por lo tanto no se van a describir con detalle aquí.

- 15 De ser necesario, se procede después a un pulido de modo que se obtenga una placa plana cuya superficie presente una alternancia de regiones de sustrato 5 y regiones de material magnético duro 6.

Después se aplica un campo magnético externo de modo que se imanten de forma permanente las regiones 6 del material magnético duro.

- 20 El experto en la técnica puede definir la intensidad del campo magnético que se va a aplicar para obtener la imantación deseada en función de los materiales usados.

Dichas microfuentes de campo magnético generan un fuerte gradiente de campo magnético y por lo tanto son adecuadas para la captura e inmovilización de las nano o micropartículas magnéticas.

Las dimensiones de las microfuentes son de escala submilimétrica y dependen de la precisión de los procedimientos topográficos usados.

- 25 No hace falta decir que las formas de estas microfuentes no están limitadas a formas paralelepípedas; pueden por tanto estar dispuestas en forma de un tablero de ajedrez, pero también pueden presentar una forma circular, hexagonal, etc.

Estructuración magnética por el método llamado "impresión termomagnética" (o "Thermo-Magnetic Patterning" según la terminología anglosajona)

- 30 El principio de la estructuración por impresión termomagnética es usar una fuente de calor para calentar localmente determinadas zonas de una capa magnéticamente dura y así crear volúmenes imantados según direcciones alternadas, que constituyen microfuentes de campo magnético.

A modo de ejemplo, se puede usar como fuente de calor un láser pulsado de nanosegundo según un método cuyo principio se describe con referencia a las figuras 3A a 3D.

- 35 Como se ilustra en la figura 3A, una capa 6 de un material magnético duro se imanta en una dirección y sentido dados (representado por la flecha).

Después esta capa 6 se coloca en un campo magnético externo uniforme H_{ext} ($\mu_0 H_{ext} < \mu_0 H_c$) de dirección opuesta a la dirección de imantación original, y después se irradia localmente mediante un láser pulsado L (en este caso un láser de excímeros de tipo KrF (248 nm), o un láser de Nd-YAG).

- 40 Como se ilustra en la figura 3B, dicha irradiación se realiza a través de una máscara M que, en este ejemplo, está provista de un determinado número de aberturas rectangulares paralelas.

La temperatura de la superficie de las zonas irradiadas aumenta muy rápidamente y después el calor se difunde en el material (véase la figura 3C).

- 45 Dada la disminución del campo coercitivo $\mu_0 H_c$ de un material cuando aumenta su temperatura, la inversión magnética de las zonas irradiadas se puede obtener por aplicación del campo magnético externo H_{ext} durante el pulso del láser.

Como se ilustra en la figura 3D, la capa está constituida finalmente por una red de microimanes de imantaciones alternas representados por las flechas y de dimensiones definidas por las dimensiones de la máscara usada durante la irradiación láser.

5 Los sistemas hechos por este procedimiento presentan gradientes de campo magnético muy fuertes a escalas micrométricas [M. Kustov et al., *J. App. Phys.* 108, 063914 (2010)].

Para más detalles relativos a este procedimiento, se puede mencionar el artículo de F. Dumas-Bouchiat et al., *App. Phys. Lett.* 96, 102511 (2010).

Este principio de impresión termomagnética se puede extender a cualquier tipo de capas magnéticas duras, incluidas las que presentan imantaciones isotropas o en el plano.

10 Procedimiento llamado "Micro Magnetic Imprinting" (impresión micromagnética)

Según otra forma de realización de la invención, las microfuentes 21 se presentan en forma de aglomerados ordenados de nano o micropartículas de un material magnético duro encerradas en una matriz no magnética e imantadas.

15 De forma particularmente ventajosa, dicha matriz puede ser de un material flexible, lo que permite obtener un soporte flexible.

Las figuras 4A a 4D ilustran etapas de un modo de fabricación del soporte según la invención.

Con referencia a la figura 4A, se usa un sustrato maestro M1 para ordenar las nano o micropartículas antes de encerrarlas en una matriz no magnética.

20 Dicho sustrato maestro M1 presenta una cara magnética estructurada, es decir una cara M10 constituida por una pluralidad de microfuentes M10a, M10b de campo magnético repartidas según un motivo determinado.

La imantación de las diferentes microfuentes se representa por una flecha.

En las figuras 4A a 4D, la cara magnéticamente estructurada M10 del sustrato maestro es plana.

25 Sin embargo, en algunas formas de realización de la invención, puede ser preferible usar un sustrato maestro cuya cara no sea plana, sino que presente cavidades o salientes, con el fin de reproducir en la película formada a partir del sustrato maestro salientes o cavidades complementarias.

El sustrato maestro se puede fabricar por diferentes técnicas conocidas por el experto en la técnica.

En particular, se puede llevar a cabo un procedimiento de estructuración por impresión termomagnética o un procedimiento de estructuración por topografía tal como se han descrito más arriba.

30 En un ejemplo no limitante ilustrado en la figura 4A, el sustrato maestro está constituido por una capa M11 magnéticamente dura de NdFeB que presenta un espesor de 5 μm sobre un sustrato soporte M12 de silicio y magnéticamente estructurado por impresión termomagnética de modo que forma regiones M10a de imantación opuesta a la de las regiones M10b.

En este sustrato maestro, la intensidad del campo magnético y del gradiente del campo magnético es máxima a nivel de las interfaces entre las regiones M10a y M10b que presentan imantaciones opuestas.

35 Por consiguiente, las nano o micropartículas que presentan una susceptibilidad magnética positiva son atraídas por la fuerza magnetoforética hacia las interfaces.

El sustrato maestro no obstante no está limitado a esta forma particular, sino que puede estar constituido por un material magnético duro o blando estructurado por topografía.

El sustrato maestro puede ser opcionalmente un conductor eléctrico.

40 Cuando el sustrato maestro presenta una superficie estructurada por topografía, es decir no plana, esta topografía particular se puede aprovechar para imprimir una forma complementaria en la película final.

Cuando se desea formar una película plana a partir de dicho sustrato maestro, es necesario planarizarlo previamente, sea por extracción de materia (por ejemplo, mediante un pulido mecanoquímico para eliminar los salientes), o sea por adición de materia (por ejemplo, mediante una técnica de deposición para llenar las cavidades).

45 En relación con la figura 4B, se mandan sobre la cara magnéticamente estructurada del sustrato maestro 1 nano o micropartículas P de un material magnético duro.

Bajo el efecto de la fuerza magnetoforética de atracción de la cara magnéticamente estructurada del sustrato maestro, las partículas P se aglomeran en los bordes de cada una de las microfuentes.

5 En la medida en que la fuerza disminuye a medida que uno se aleja de la cara del sustrato maestro, estos aglomerados 21 presentan en general una sección triangular o trapezoidal, con una base más amplia del lado del sustrato maestro M1 y que disminuye con la distancia.

Para favorecer el ordenamiento de las partículas no únicamente en un plano sino también en una dirección perpendicular al sustrato maestro, se puede aplicar simultáneamente un campo magnético externo que presente una dirección adecuada.

10 Cuando se envían las partículas, se agita ventajosamente el sustrato maestro de modo que se optimice el atrapamiento de las partículas a nivel de los bordes de las microfuentes de campo magnético.

Por otra parte, durante o después de este envío, se puede proyectar un chorro de gas seco para favorecer el atrapamiento de las partículas a nivel de dichos bordes y/o eliminar las partículas no atrapadas antes de la deposición de la matriz no magnética.

15 Las partículas son de un material magnético duro, que puede ser uno de los materiales de la lista desarrollada más arriba.

Por consiguiente, la aplicación, después de la formación de la película, de un campo magnético externo, permitirá imantarla de forma permanente y por lo tanto formar una película magnéticamente estructurada autónoma.

En relación con la figura 4C, después se deposita sobre las partículas aglomeradas sobre el sustrato maestro, una matriz 22 de un material no magnético en forma de una capa fina.

20 El espesor de la matriz 22 típicamente está comprendida entre 100 nm y 5 mm.

De forma ventajosa, la matriz es de un material elastómero, lo que permite conferir a la película una cierta flexibilidad.

25 Según realizaciones preferidas de la invención, la matriz es de uno de los siguientes materiales: polidimetilsiloxano (PDMS), resina epoxídica, caucho, baquelita, poli(metacrilato de metilo) (PMMA), poliestireno (PS), resina fotosensible, parileno, óxidos tales como SiO₂, Al₂O₃, metales tales como Cu, Ag, materiales carbonados tales como grafito, DLC, etc.

Si es necesario, se deja la matriz 22 endurecer o reticular durante el tiempo adecuado.

Por otra parte, la matriz puede ser ventajosamente de un material transparente o traslúcido.

30 El experto en la técnica puede seleccionar una matriz adecuada entre los productos disponibles en el mercado, en función de las propiedades buscadas.

En relación con la figura 4D, se deslaminada la película 2 constituida por la matriz 22 y los aglomerados 21 de partículas magnéticas frente al sustrato maestro M1.

En cuanto al sustrato maestro se puede reutilizar para la fabricación de una nueva película.

35 Por lo tanto, aunque para el sustrato maestro es necesario llevar a cabo técnicas de microfabricación y, por consiguiente, presenta un cierto coste, se puede reutilizar indefinidamente, y la fabricación de la propia película magnéticamente estructurada no implica dichas técnicas complejas y costosas, usando solo materiales poco caros.

Este procedimiento además es fácilmente industrializable y permite producir películas de gran superficie y en gran cantidad con coste bajo.

40 Según una forma de realización de la invención, se puede depositar sobre el sustrato maestro, antes de depositar las partículas, una capa de material que permita facilitar la deslaminación de la película y que quede unida al sustrato maestro tras el deslaminado.

Teniendo en cuenta el pequeño tamaño de las partículas que se van a inmovilizar sobre el soporte, las microfuentes de campo magnético ordenadas se disponen preferiblemente directamente en la superficie del soporte, o en las inmediaciones de la misma, en contacto con la muestra para proporcionar fuerzas de atracción máximas.

45 Placa de multipocillos

De forma convencional, se usan placas de valoración que comprenden una pluralidad de pocillos (por ejemplo, 96 o 384 pocillos) en los ensayos de inmunoanálisis.

Para inmovilizar los complejos, se pueden integrar en dicha placa las microfuentes de campo magnético ordenadas como se han descrito anteriormente.

5 Esta integración se puede obtener haciendo la propia placa en un material adecuado para formar microfuentes de campo magnético ordenadas, según uno de los procedimientos descritos más arriba. Las microfuentes de campo magnético se colocan entonces preferiblemente en el fondo de cada uno de los pocillos.

Según otra forma de realización, se pueden insertar en el interior de cada pocillo un soporte del tamaño de dichos pocillos sobre el que se disponen dichas microfuentes de campo magnético ordenadas.

10 Según otra realización, se puede hacer una placa de valoración en la que los pocillos no tienen fondo, y llevar bajo dicha placa un soporte plano que contiene las microfuentes de campo magnético ordenadas dispuestas a nivel de cada uno de los pocillos, de modo que constituya el fondo estanco de dichos pocillos.

Por lo tanto, el procedimiento es compatible con los soportes usados habitualmente en inmunoanálisis, por lo que no es necesaria la modificación de los equipos de laboratorio existentes.

Soporte plano

15 Según la invención, el soporte sobre el que se inmovilizan los complejos no es una placa de valoración sino un soporte de superficie plana donde se dispone una pluralidad de microfuentes magnéticas ordenadas.

Dicho soporte se puede hacer por los diferentes procedimientos de microestructuración de capas magnéticas descritos más arriba.

De forma alternativa, dicho soporte se puede hacer por el procedimiento de "Micro Magnetic Imprinting" descrito más arriba.

20 Esta técnica de fabricación presenta la ventaja de poder fabricar con coste bajo una gran cantidad de soportes, siendo costoso solamente el sustrato maestro, que se puede reutilizar a discreción.

Por otra parte, con esta técnica, el soporte presenta la ventaja de poder hacerse con un material transparente o traslúcido.

En algunos casos esta propiedad puede facilitar la detección y la cuantificación por métodos ópticos.

25 Por lo tanto, permite iluminar el soporte por debajo, lo que permite observar la coloración por la parte de arriba del soporte con una cámara y filtros que el experto en la técnica sabrá seleccionar.

Al contrario, esta transparencia puede ser molesta, por ejemplo, en el caso de la fluorescencia intensa, donde las señales podrían interferir entre ubicaciones contiguas.

Por lo tanto, se podría seleccionar el material del soporte en función del método de detección previsto.

30 Al usar dicho soporte plano, la mezcla de la molécula que se va a detectar, las partículas magnéticas y el elemento capaz de unirse selectivamente a dicha molécula, se hace en un recipiente y después se extraen volúmenes limitados de mezcla y se depositan sobre dicho soporte en forma de gota, como se ilustra en la figura 5.

El tamaño de las gotas depende del volumen depositado y de la hidrofilia del material del soporte. Este tamaño es por lo tanto ajustable, típicamente comprendido entre 1 microlitro y 200 microlitros.

35 Las microfuentes de campo magnético ordenadas se reparten ventajosamente sobre la superficie del soporte según un motivo regular, de modo que permita la captura de complejos cualquiera que sea la región del soporte sobre la que se ha depositado la gota.

40 La ubicación destinada a cada gota preferiblemente se marca sobre el soporte plano, por ejemplo, mediante un marcaje magnético local, o químicamente (haciendo la superficie del soporte localmente hidrófila o hidrófoba), o también topográficamente, mediante un hueco de pequeña profundidad realizado sobre la superficie del soporte. También se puede marcar visualmente la ubicación para ayudar al experimentador a localizarla.

De forma inesperada, se ha demostrado que la velocidad de captura de las bolas magnéticas era sensiblemente mayor en gotas depositadas sobre dicho soporte plano que en una solución depositada en un pocillo de una placa de valoración.

45 La figura 6 presenta el porcentaje de bolas de 100 nm de diámetro capturadas respectivamente en una gota (datos representados por un círculo) y la cantidad de bolas del mismo tipo capturadas en un pocillo (datos representados por un cuadrado).

Después de 10 minutos, 75% de las bolas han sido capturadas por las microfuentes de campo magnético ordenadas dispuestas en el fondo de los pocillos de valoración, mientras que se ha recuperado más de 90% de las bolas por las microfuentes de campo magnético ordenadas dispuestas en el soporte que recibe la gota.

5 Este fenómeno se explica por la presencia de un movimiento de convección inducido en el interior del fluido por el transporte de las partículas magnéticas hacia las microfuentes de campo magnético ordenadas que las capturan.

La rapidez de difusión de las partículas permite, por lo tanto, liberarse de cualquier dispositivo de vibración que es necesario en los ensayos convencionales para acelerar la mezcla de la solución.

Otra ventaja del soporte plano con respecto a una placa de valoración convencional, es que permite, para una misma acumulación del soporte, proporcionar más sitios de captura de moléculas.

10 Cinética de captura de nanopartículas magnéticas por un soporte que comprende microfuentes de campo magnético ordenadas

La cinética y la eficacia de captura notables de las nanopartículas magnéticas por soportes que comprenden microfuentes de campo magnético ordenadas, se deben a un acoplamiento hidrodinámico entre las partículas.

15 De hecho, las partículas magnéticas más cercanas a la superficie del soporte son atraídas rápidamente por las microfuentes de campo magnético ordenadas, y su arrastre conlleva de forma hidrodinámica el movimiento de partículas más alejadas hacia las microfuentes de campo magnético, que una vez acercadas a la superficie del soporte, son a su vez magnéticamente atraídas.

20 Este acoplamiento entre fuerzas magnéticas y tracción hidrodinámica tiene como consecuencia la aparición de una corriente de fluido de convección que mueve el fluido encima de las microfuentes de campo magnético, lo que explica la eficacia y la cinética de la captura a larga distancia de nanopartículas a pesar del pequeño tamaño de estas.

Esta interpretación está justificada por un modelo teórico y por un experimento que demuestra la existencia de este acoplamiento.

25 En este experimento, los autores de la invención han visualizado el movimiento de una muestra fluida gracias a partículas coloreadas no magnéticas en suspensión en un fluido depositado sobre una unión lineal entre dos zonas imantadas.

Esta unión simula un elemento de una matriz de microfuentes de campo magnético ordenadas hecha por la técnica de *Thermo Magnetic Patterning* descrita más arriba.

Es en esta unión donde se localizan los gradientes de campo magnético más elevados.

30 La medición del movimiento y de la velocidad de las bolas (por una técnica llamada "particle tracking velocimetry" (velocimetría por seguimiento de partículas)) ha permitido reconstituir el movimiento y la velocidad del fluido.

35 En la figura 9, que ilustra las líneas de corriente inducidas por la atracción de las nanopartículas superparamagnéticas en suspensión encima de una unión entre dos dominios magnéticos D1, D2, cuyos sentidos de imantación están representados por las flechas (el eje z designa el espesor del fluido encima de la unión), se ve claramente que se crean dos vórtices simétricos rápidamente de una parte a otra de la unión, que mueven el líquido en una distancia del orden de varios mm.

En ausencia de micropartículas magnéticas, no es evidente ningún movimiento ordenado del fluido.

El campo de velocidades del fluido medido corresponde, dentro del 10%, a lo que se calcula por el modelo de acoplamiento hidrodinámico-magnético descrito antes.

40 Este acoplamiento se pone de manifiesto para concentraciones de partículas magnéticas superiores a 10^6 partículas/ml, lo cual es lo que se observa efectivamente experimentalmente.

La formación de corriente de convección está íntimamente ligada al ordenamiento de las microfuentes de campo magnético.

Sistema microfluídico

45 Según otra realización ventajosa de la invención, el soporte puede ser un sistema microfluídico de tipo "lab-on-chip".

El soporte comprende entonces un microcanal y una red de microfuentes magnéticas dispuestas de forma ordenada en al menos una pared de dicho canal.

Dicho microcanal se puede hacer según un procedimiento de "Micro Magnetic Imprinting" descrito más arriba.

En este caso, como se ilustran en las figuras 7A a 7E, la cara magnéticamente estructurada del sustrato maestro 1 no es plano, sino que presenta al menos un saliente o una cavidad cuyo negativo estará presente en la película.

5 En el ejemplo no limitante ilustrado en la figura 7A, la cara magnéticamente estructurada 10 del sustrato maestro 1 presenta un saliente en relieve 10', estando constituida la superficie del saliente por una pluralidad de microfuentes de campo magnético 10a, 10b.

Por ejemplo, dicho saliente puede presentar una forma paralelepípeda.

10 Según las aplicaciones previstas, el resto de la superficie del sustrato maestro puede estar también magnéticamente estructurado, pero también está previsto que solo esté estructurada magnéticamente la superficie del saliente 10'; en este último caso, las nano o micropartículas suministradas solo se aglomerarán en los bordes de las microfuentes magnéticas que constituyen la superficie del saliente 10', no reteniendo partículas el resto de la superficie del sustrato maestro.

Como se ha explicado más arriba, se suministran sobre el sustrato maestro las nano o micropartículas magnéticas, que se ordenan y se aglomeran en estructuras tridimensionales 20 en los bordes de las microfuentes de campo magnético 10a, 10b (figura 7B).

15 Después, en relación con la figura 7C, se deposita la matriz no magnética 3 sobre el sustrato maestro.

Al final del deslaminado, la película 4 así obtenida ilustrada en la figura 7D presenta, por lo tanto, una cavidad 40 complementaria del saliente 10' del sustrato maestro.

Según la forma del resalte, la película consiste así en uno o varios pocillos, o en uno o varios canales.

A partir de dicha película se puede formar por lo tanto un microcanal fluido.

20 Para este fin, como se ilustra en la figura 7E, solo es necesario aplicar contra dicha película 4 una película plana 4' o cualquier otra estructura que permite formar la cuarta pared de la cavidad 40.

De forma ventajosa, dicha película plana 4' se puede fabricar también según la invención y puede comprender en su superficie estructuras magnéticas tridimensionales 20'.

25 Así, a partir de las películas 4 y 4' se forma un dispositivo 6 que comprende un microcanal 60 que presenta, sobre dos paredes opuestas 61a y 61b, una superficie magnéticamente estructurada.

Un tratamiento de superficie puede permitir asegurar la estanqueidad de las dos películas.

Por ejemplo, cuando las dos películas tienen una matriz de PDMS, se puede realizar una activación de las superficies por un plasma de oxígeno.

30 Gracias a la presencia de las estructuras magnéticas tridimensionales sobre las dos caras 61a y 61b del microcanal 61, se mejora el atrapamiento de las nano o micropartículas en una solución que circula en dicho microcanal.

Naturalmente, la naturaleza de las partículas magnéticas, así como su reparto en relación con la superficie de cada pared, pueden ser idénticos para cada una de las dos paredes o bien ser diferentes.

35 En dicho sistema, se inyecta la mezcla a la entrada del microcanal: la solución circula en el microcanal, quedando inmovilizados progresivamente los complejos sobre el fondo del microcanal por las microfuentes de campo magnético.

Después opcionalmente se puede proceder a una etapa de lavado para retirar los residuos de la solución, quedando los complejos magnéticamente atrapados por las microfuentes situadas sobre las paredes del canal.

Ejemplo de acoplamiento de un anticuerpo con una partícula magnética (protocolo comercial Dynabead)

40 A modo indicativo, el acoplamiento de un anticuerpo con una bola magnética se puede hacer según el siguiente procedimiento:

- suspender de nuevo las bolas agitando con vórtice una solución en la que se dispersan,
- extraer la cantidad de bolas deseada,
- retirar el líquido sobrenadante con ayuda de una pipeta y un imán,
- añadir el anticuerpo diluido en PBS-Tween al 0,01%,
- 45 - incubar 10 minutos a temperatura ambiente con agitación,

- retirar el líquido sobrenadante con ayuda de una pipeta y un imán,
- volver a suspender las bolas acopladas con el anticuerpo en PBS-Tween al 0,01%.

Validaciones experimentales

5 Una realización de la invención se ha validado en un ensayo de determinación de un antígeno de tipo "sándwich" realizado en las siguientes condiciones.

10 Se ha usado para este experimento como antígeno que se va a determinar la "coreprotein" (proteína core) (biotinilada) del virus de la hepatitis C, como anticuerpo de captura un anticuerpo monoclonal específico de esta proteína (Pierce Hepatitis C Virus Core Antigen Monoclonal Antibody (C7-50)), bolas superparamagnéticas de 100 nm de diámetro, funcionalizadas con la proteína A (fluidMAG-Protein A, Chemicell) y como anticuerpo de detección puntos cuánticos funcionalizados con avidina (QD625, Invitrogen).

En este experimento, las concentraciones usadas eran 1,3 nM para el anticuerpo de captura, 10^9 /ml para las bolas superparamagnéticas y 10^{10} /ml para los puntos cuánticos.

Los puntos cuánticos, las bolas funcionalizadas con el anticuerpo y el antígeno biotinilado se pusieron, en una misma etapa, sobre un sustrato flexible que comprendía las microfuentes de campo magnético.

15 La duración de la mezcla/captura se fijó en 7 minutos.

Después de este tiempo, se retiró el líquido sobrenadante y se realizaron dos lavados con 50 μ l de PBS.

Finalmente, se midió la cantidad de antígeno directamente sobre el soporte gracias a la fluorescencia de los puntos cuánticos.

La figura 8 ilustra la fluorescencia (en unidades arbitrarias) en función de la concentración de antígeno.

20 El conjunto del ensayo se realizó en una decena de minutos.

El límite de detección es de 10 pM, lo cual es comparable con el límite de los ensayos ELISA disponibles en el mercado realizados en esta proteína.

Más allá de 5 nM, el ensayo era positivo, pero la respuesta del ensayo se saturaba debido a la cámara usada.

25 En cualquier caso, dichas concentraciones están mucho más allá de los casos clínicos; además se puede diluir la muestra para repetir el ensayo si es necesario.

Detección sin lavado

La organización espacial de las microfuentes de campo magnético ordenadas permite hacer una detección sin lavado del soporte ni marcaje de los inmunocomplejos.

30 Para ello solo hay que determinar la densidad de fluorescencia en la superficie de las microfuentes de campo magnético ordenadas en las zonas de gradiente de campo magnético fuerte (señal específica) y en las zonas de gradiente de campo magnético débil (señal no específica).

Esta detección se puede hacer por fluorescencia, focalizando la toma de imagen sobre la superficie del soporte que contiene las microfuentes de campo magnético, o disponiendo detectores en la superficie del propio soporte.

El siguiente experimento demuestra la viabilidad de dicha detección.

35 Se mezclaron nanopartículas magnéticas (50 nm, 10^9 ml⁻¹) y nanopartículas fluorescentes no magnéticas (puntos cuánticos, 30 nm, 10^9 ml⁻¹) funcionalizadas con biotina, con concentraciones pequeñas de avidina, que es una proteína que se une de forma casi irreversible a cuatro moléculas de biotina.

Este acoplamiento imita la formación de inmunocomplejos: (nanopartículas magnéticas)-(anticuerpo de captura)-(antígeno)-(anticuerpo de detección)-(marcador fluorescente) u otro.

40 Después de 10 minutos de incubación, se deposita una gota sobre la superficie de un soporte que comprende las microfuentes de campo magnético ordenadas hecho por la técnica de *Micro-Magnetic Imprinting* y se observa al microscopio óptico de fluorescencia 10 minutos después.

El microscopio se focaliza a nivel del soporte.

45 En la figura 10A, la imagen de arriba a la izquierda presenta la estructura del soporte que comprende las microfuentes de campo magnético ordenadas observada con contraste de fase (estando dispuestas las microfuentes de campo magnético según una cuadrícula que presenta un color más oscuro que el resto de la matriz) mientras que

la imagen de abajo a la izquierda presenta la distribución de los puntos cuánticos biotinilados en la superficie del soporte en presencia de nanopartículas magnéticas biotiniladas y avidina, observada por fluorescencia (los puntos cuánticos presentan un color claro en esta imagen).

5 La superposición de las dos imágenes a la derecha de la figura 10A permite ver los puntos cuánticos que resultan de una interacción específica con las nanopartículas magnéticas: se ve claramente que los puntos cuánticos (de color claro) están principalmente alineados a lo largo de la cuadrícula (de color oscuro) definida por las microfuentes de campo magnético (señal específica) y por lo tanto reproducen el motivo definido por las microfuentes de campo magnético, solo algunos puntos cuánticos se encuentran en zonas situadas en el interior de esta cuadrícula (señal no específica).

10 En ausencia de avidina, ningún motivo es visible.

La densidad de fluorescencia sobre las zonas de gradiente fuerte y débil del campo magnético se midió sobre las imágenes de microscopía mostradas en A.

15 La figura 10B muestra la evolución de la relación (señal específica)/(señal no específica), que es igual a la relación de (fluorescencia específica x área de las regiones de gradiente débil del campo magnético)/(fluorescencia no específica x área de las regiones de gradiente fuerte del campo magnético) en función de la concentración de avidina.

Si no tiene lugar ninguna interacción específica, esta relación es 1. La zona sombreada corresponde al intervalo de confianza de 6 sigmas. Todos los puntos fuera de esta zona son significativos con una probabilidad de error inferior a 10^{-6} .

20 Por lo tanto, una concentración 50 nM es detectable con un nivel de significación de 99,9997% (seis sigmas).

La microestructuración de las microfuentes de campo magnético ordenadas permite definir las regiones de interés "específicas" y "no específicas". Por lo tanto, se puede aprovechar para simplificar la detección.

Hay que indicar que las microfuentes de campo magnético que se dispongan de forma aleatoria no permitirán esta detección sin lavado.

25 Referencias

D. Issadore et al, Self-assembled magnetic filter for highly efficient immunomagnetic separation, *Lab Chip*, 2011, 11,147

N.M. Dempsey et al., *App. Phys. Lett.* 90, 092509 (2007)

A. Walther et al., *J. Magn. Mag. Mat.* 321 (2009) 590

30 M. Kustov et al., *J. App. Phys.* 108, 063914 (2010)

F. Dumas-Bouchiat et al., *App. Phys. Lett.* 96, 102511 (2010)

WO2007/125129A1

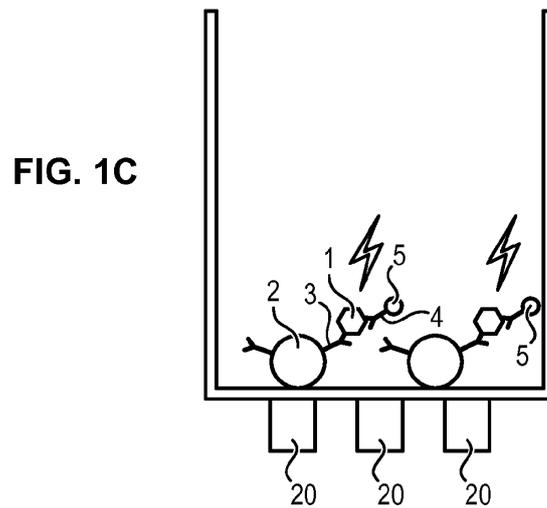
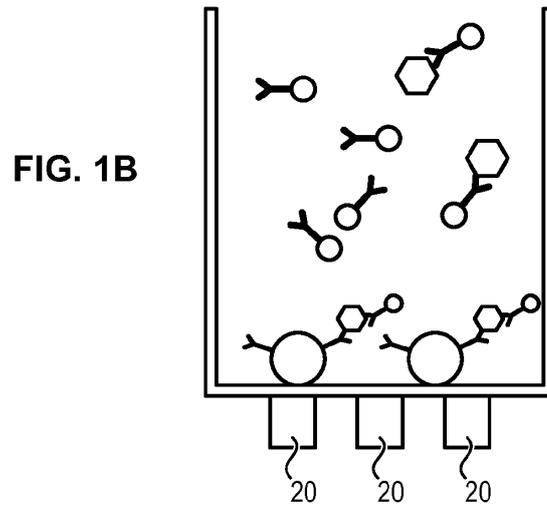
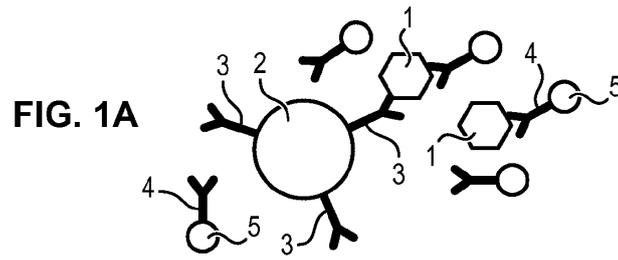
ZANINI Luiz Fernando : "Bio-Mag-MEMS autonomes basés sur des aimants permanents", Tesis, 3 de mayo de 2013, páginas 1-166.

35 Guillaume BLAIRE et Al: "Hybrid Bio-Mag-MEMS combining magnetophoresis and dielectrophoresis", *The European Physical Journal B*, vol. 86, n°4, 1 de abril de 2013.

WO2013/174881 A1

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de captura de una molécula en una muestra, que comprende las siguientes etapas:
 - 5 a) la mezcla de dicha muestra con partículas magnéticas, estando acoplada cada una de dichas partículas con un elemento adecuado para unirse selectivamente a dicha molécula que se va a capturar, de modo que se forme al menos un complejo que comprende una partícula magnética, dicho elemento y dicha molécula unida a dicho elemento, presentando dichas partículas magnéticas un diámetro comprendido entre 5 nm y 500 nm, después
 - b) la deposición de una gota de la mezcla obtenida al final de la etapa a) sobre un soporte, siendo dicho soporte una placa plana en cuya superficie se disponen microfuentes de campo magnético ordenadas,
 - 10 c) inmovilización de dicho al menos un complejo sobre el soporte que comprende las microfuentes de campo magnético ordenadas, caracterizado por que la concentración de las partículas magnéticas en la mezcla obtenida al final de la etapa a) es superior a 10^6 partículas/ml.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que el soporte comprende una matriz no magnética que encierra una pluralidad de aglomerados tridimensionales ordenados de micro o nanopartículas imantadas de un material magnético duro o blando, formando dichos aglomerados las microfuentes de campo magnético.
- 15 3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por que la molécula que se va a capturar es un antígeno y por que el elemento capaz de unirse a dicha molécula es un anticuerpo receptor de dicho antígeno.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado por que se añade a dicha mezcla un anticuerpo llamado de detección que lleva un marcador fluorescente, luminiscente o colorimétrico, siendo capaz dicho anticuerpo de unirse al antígeno unido al anticuerpo acoplado a la partícula magnética.
- 20 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por que la molécula que se va a capturar es un anticuerpo y por que el elemento capaz de unirse a dicha molécula es un antígeno reconocido por dicho anticuerpo.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que comprende, después de la inmovilización de dicho al menos un complejo sobre el soporte, una etapa de lavado de dicho soporte para retirar la muestra, quedando retenido dicho al menos un complejo sobre el soporte por las microfuentes de campo magnético ordenadas.
- 25 7. Procedimiento de detección de una molécula en una muestra, que comprende las siguientes etapas:
 - 30 - captura de la molécula sobre un soporte mediante un procedimiento de captura según una de las reivindicaciones 1 a 5,
 - detección de la molécula capturada sobre el soporte por fluorescencia, luminiscencia colorimetría, electroquímica y/o radiometría.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado por que la etapa de detección se lleva a cabo directamente después de la etapa de captura, sin etapa intermedia de lavado del soporte.
- 35 9. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado por que comprende, entre la etapa de captura y la etapa de detección, una etapa de lavado de dicho soporte para retirar dicha muestra, quedando retenido dicho al menos un complejo sobre el soporte por las microfuentes de campo magnético ordenadas.



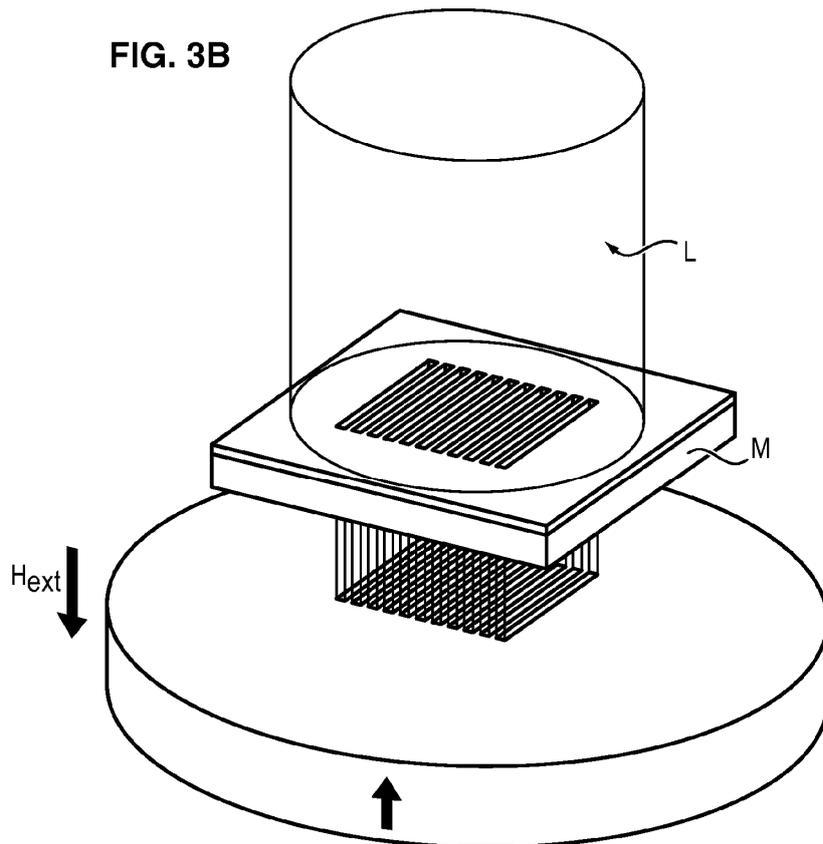
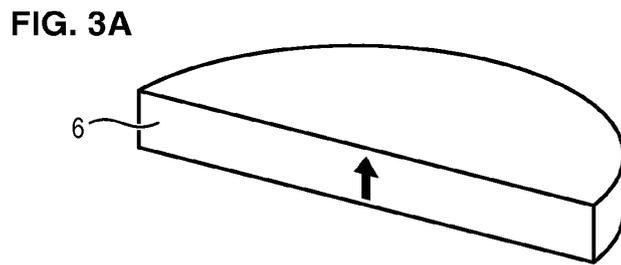
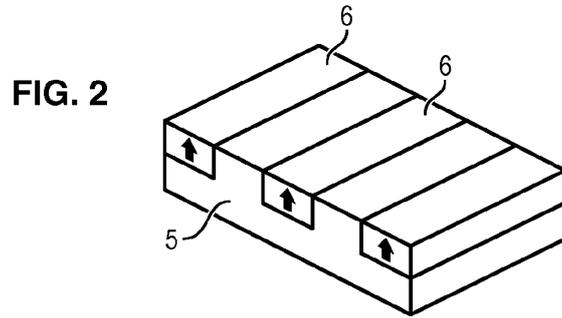


FIG. 3C

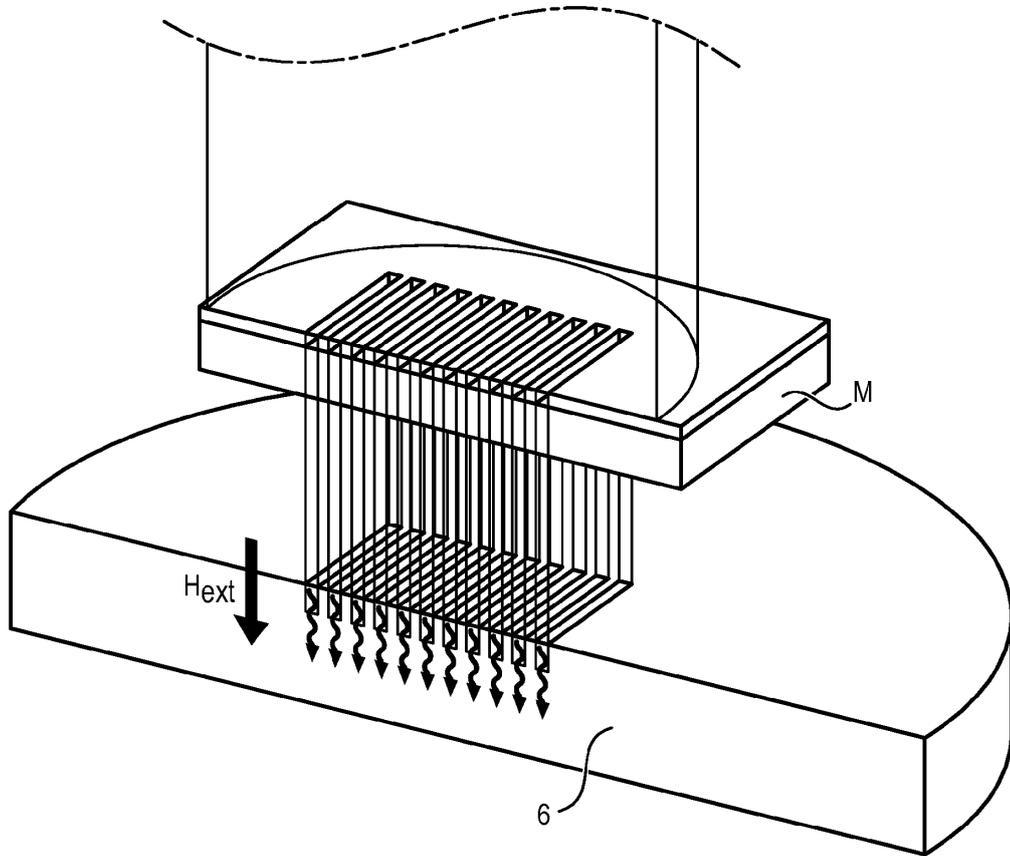


FIG. 3D

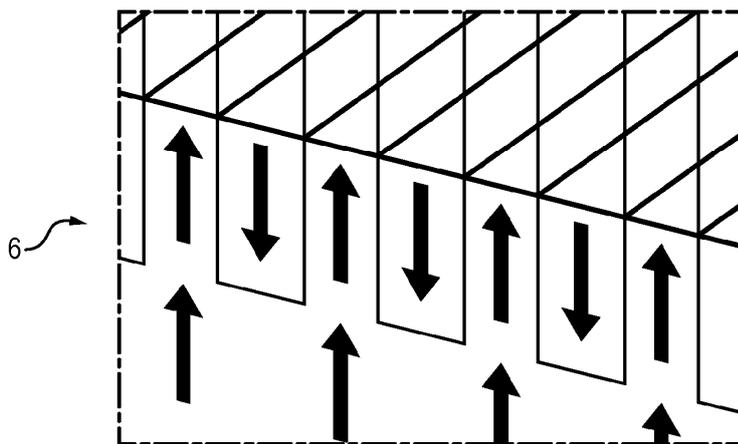


FIG. 4A

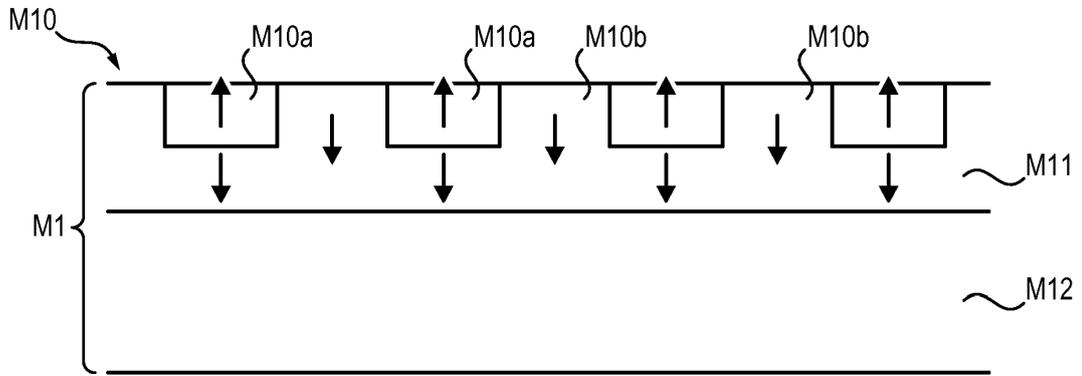
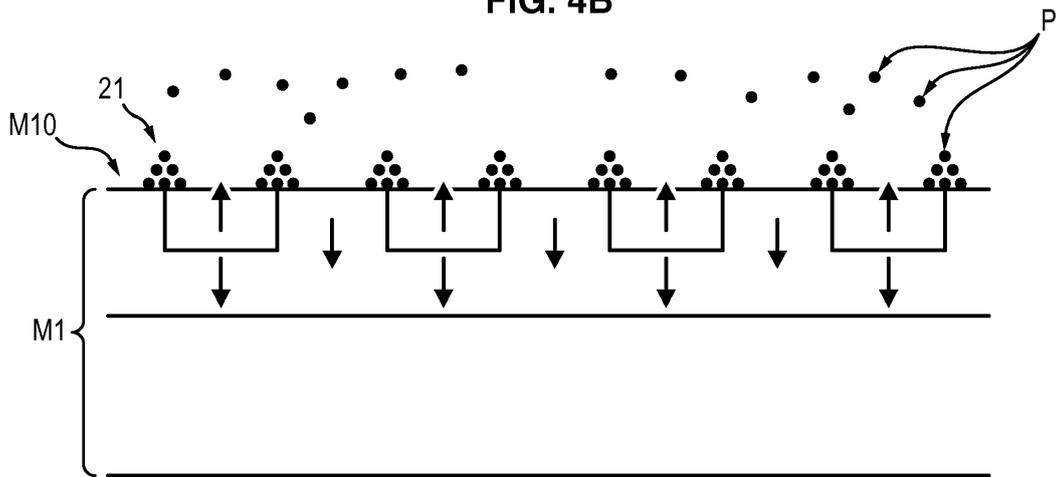


FIG. 4B



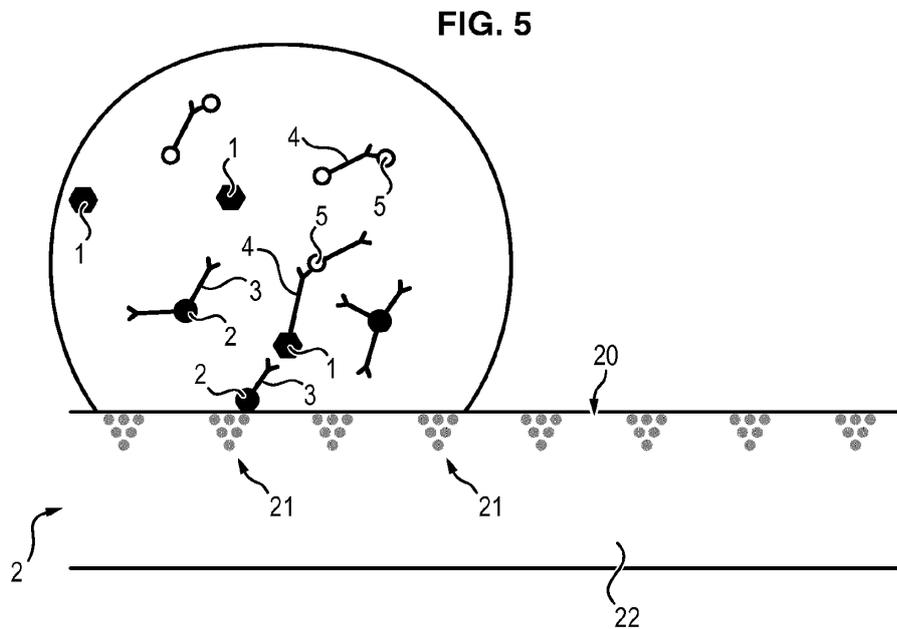
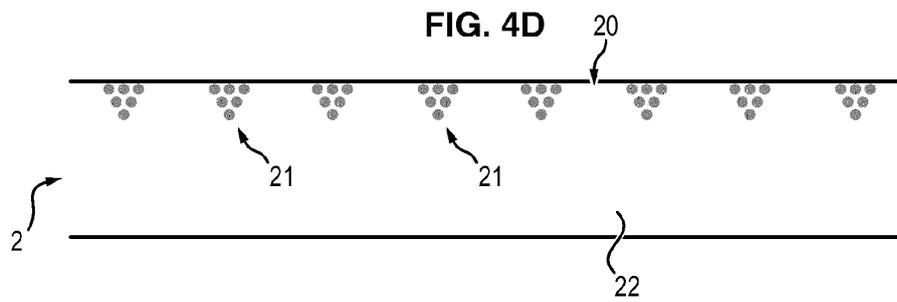
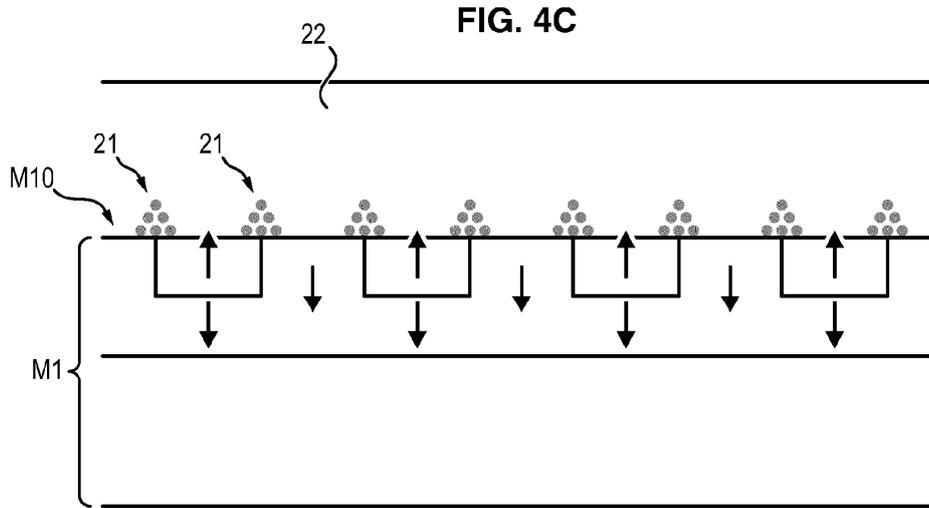


FIG. 6

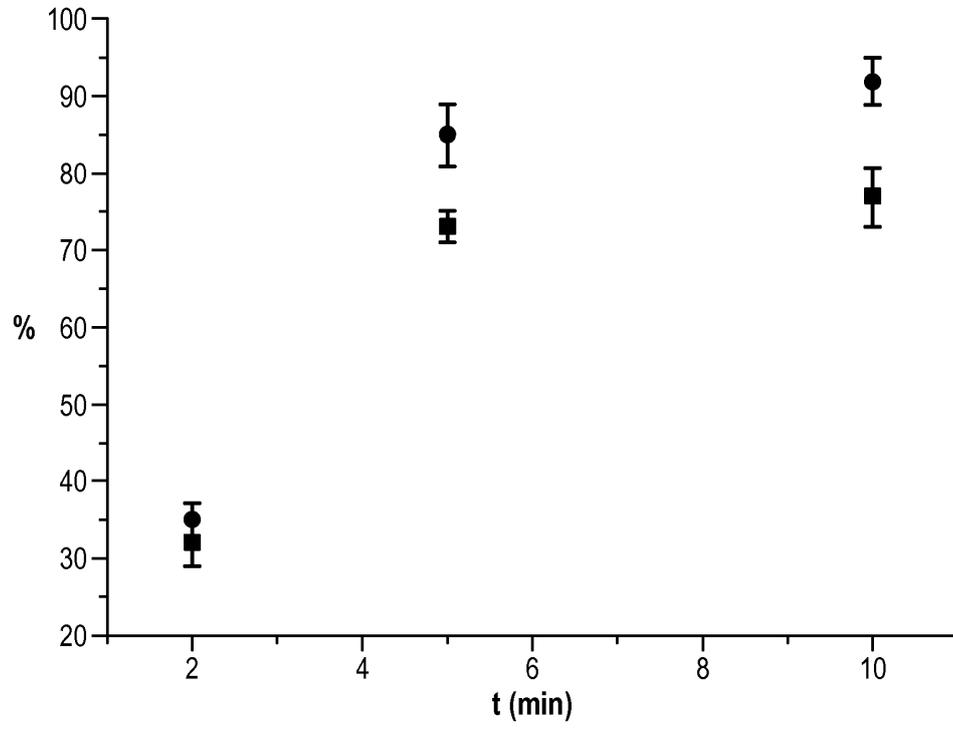


FIG. 7A

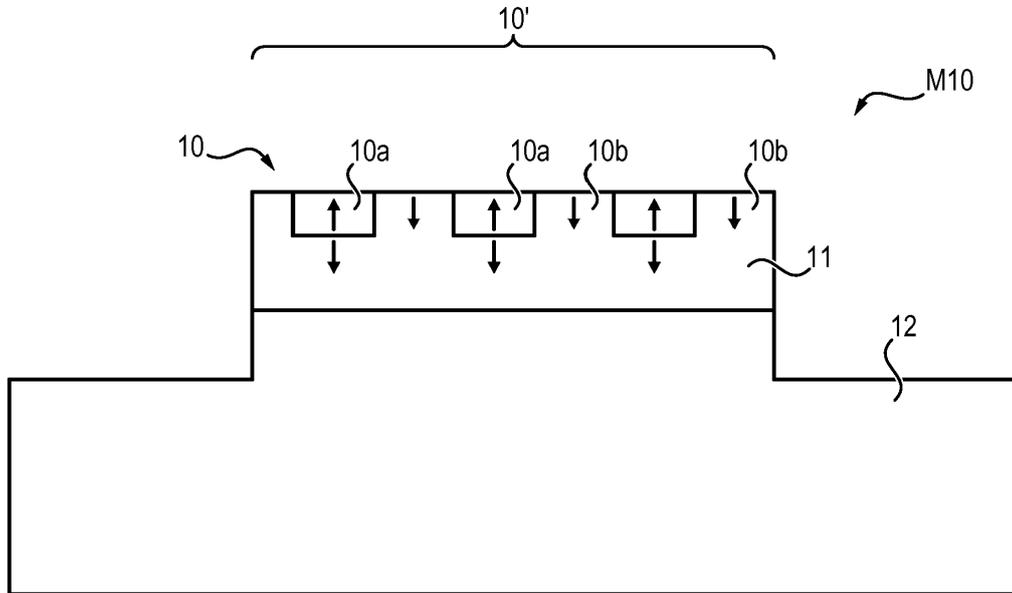


FIG. 7B

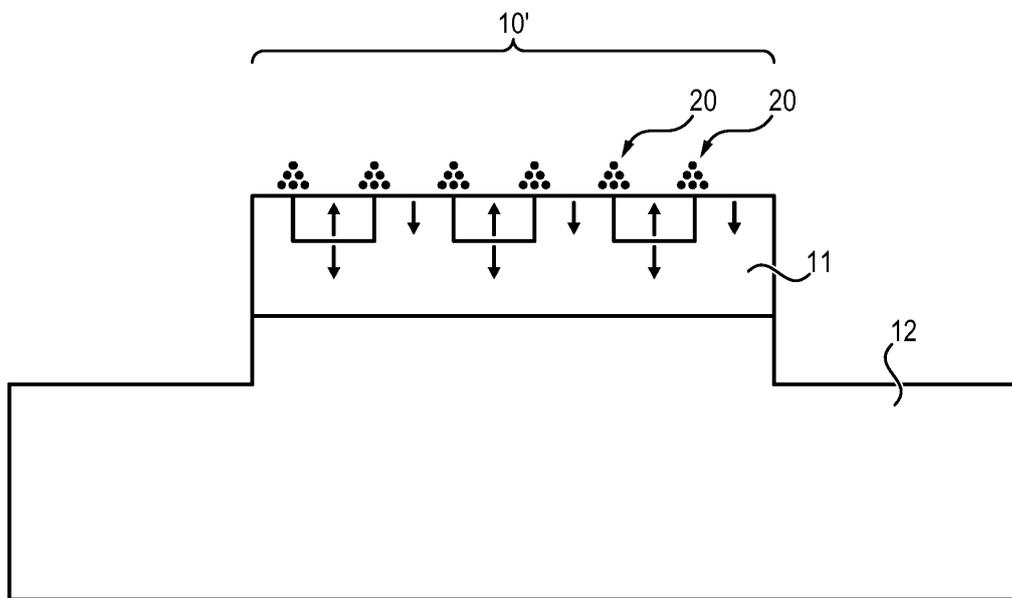


FIG. 7C

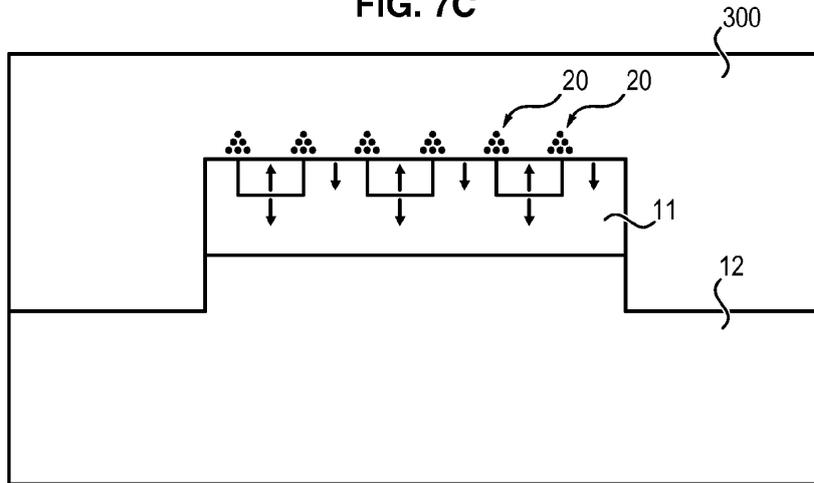


FIG. 7D

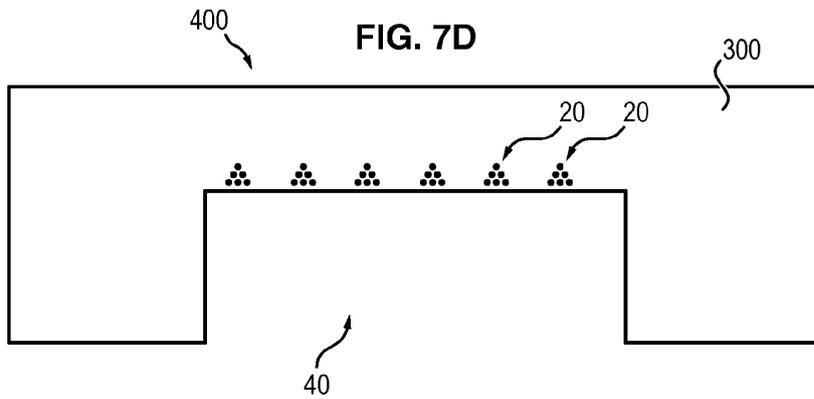


FIG. 7E

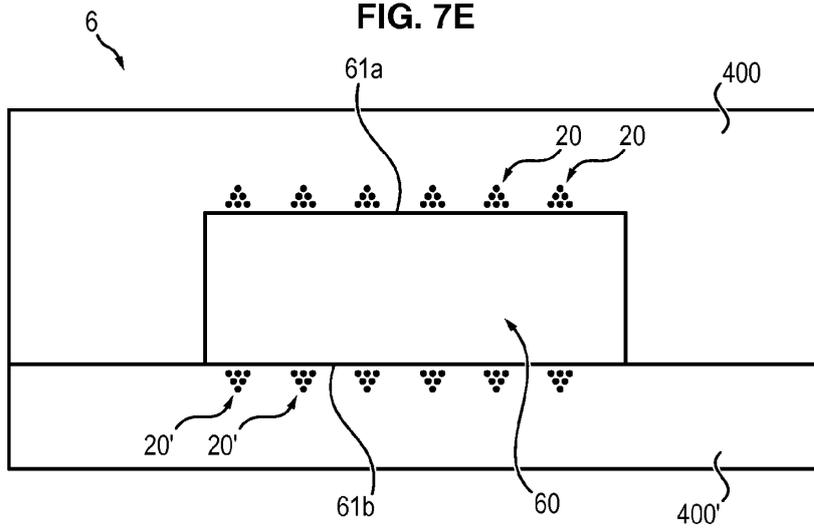


FIG. 8

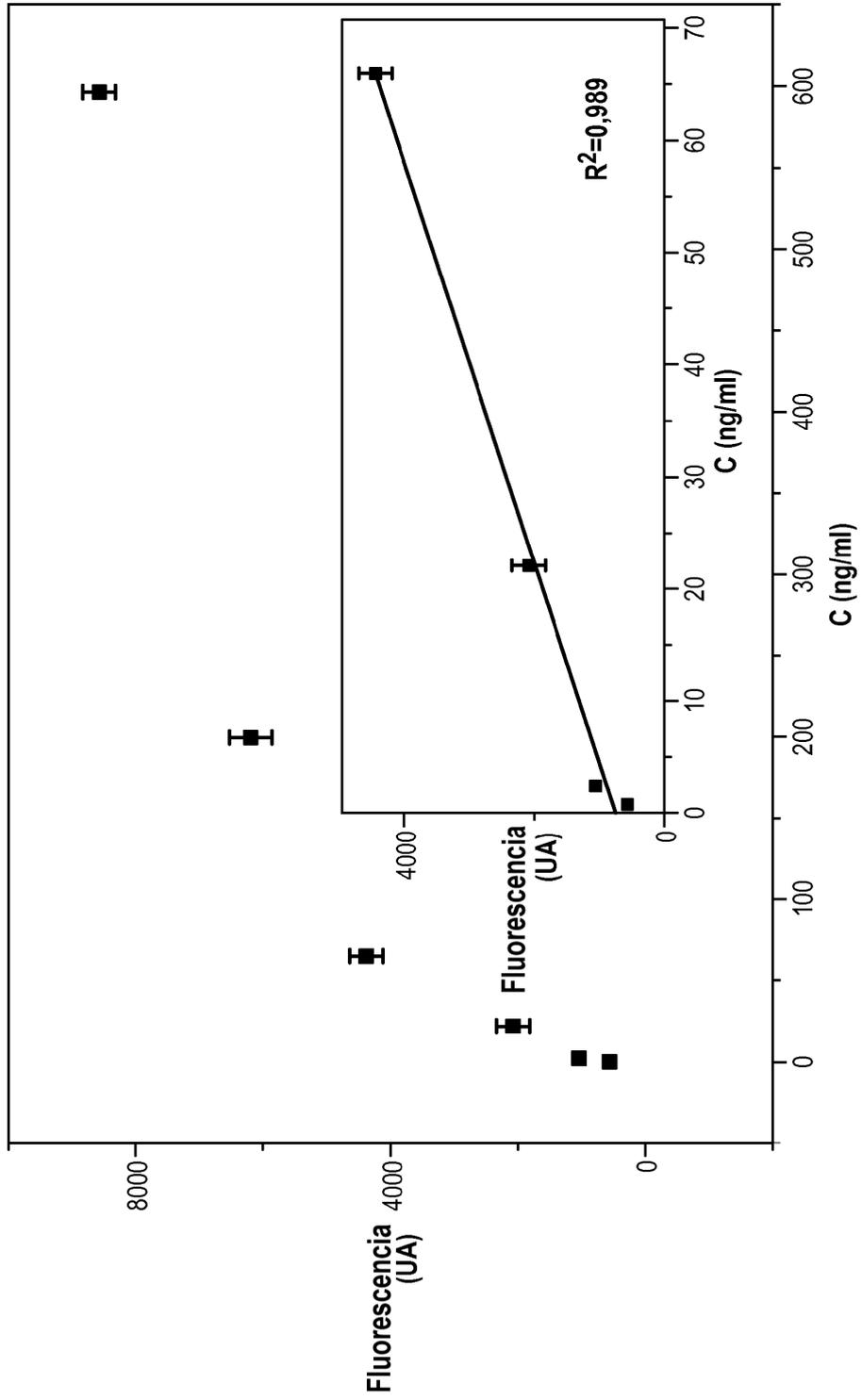


FIG. 9

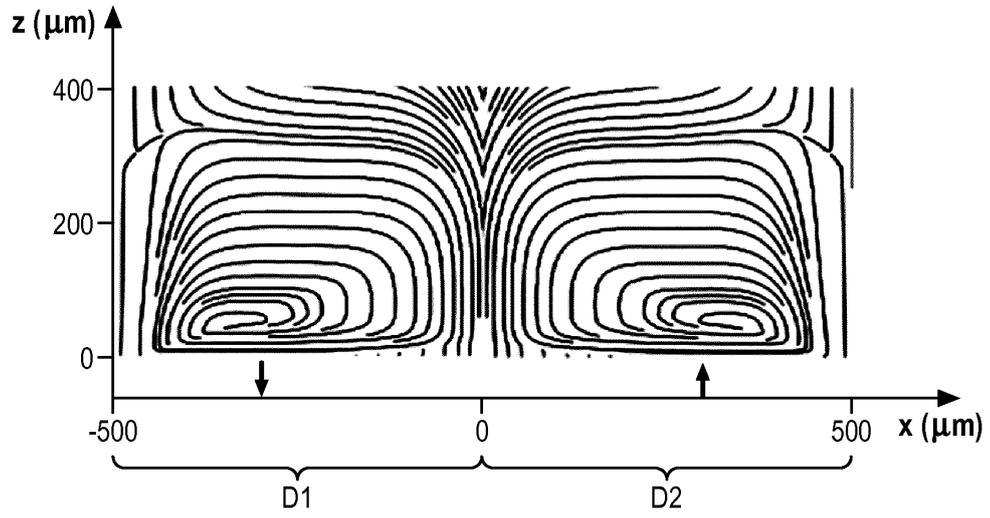


FIG. 10A

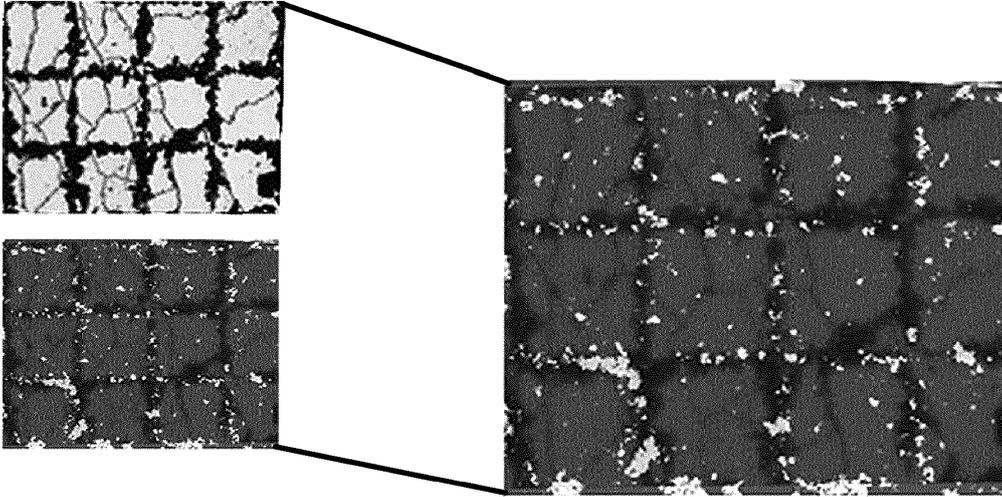


FIG. 10B

