(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 729 415**

(51) Int. CI.:

B01L 3/00 (2006.01)
B01J 19/00 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2009 PCT/CH2009/000412**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **01.07.2010 WO10072011**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2009 E 09795681 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 2367633**

(54) Título: **Dispositivo de ensayo y método para realizar ensayos biológicos**

(30) Prioridad:

23.12.2008 US 140328 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.11.2019

(73) Titular/es:

MYCARTIS N.V. (100.0%)
Industriepark-Zwijnaarde 7C
9052 Zwijnaarde, BE

(72) Inventor/es:

DEMIERRE, NICOLAS;
NADER, DONZEL;
GIL, JOSÉ y
RENAUD, PHILIPPE

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

Dispositivo de ensayo y método para realizar ensayos biológicos

Campo técnico

La invención se refiere a la tecnología de ensayo en la industria de las ciencias de la vida y en particular a la multiplexación aplicada en diagnósticos, investigación genómica y biología molecular. La invención utiliza técnicas y procesos de tecnología de microfabricación, así como de la tecnología de semi-conductor.

Antecedentes de la invención

Los ensayos biológicos permiten la detección de moléculas diana en una muestra biológica. Típicamente, la detección de moléculas diana se lleva a cabo mediante el uso de superficies sólidas (por ejemplo, micro-matrices o pocillos de fondo) o estructuras de nanoportador o estructuras de microportador que están funcionalizadas con moléculas de detección (ligandos) diseñados para unirse a objetivos específicos.

Un desafío de las tecnologías de ensayos biológicos es la aceleración de la transferencia de masa que tiene lugar durante un ensayo. El problema de la transferencia de masa se exacerba aún más en los ensayos multiplexados, donde se busca múltiples moléculas diana simultáneamente en una única muestra biológica, ya que la densidad relativa de cada sonda es menor que en un solo ensayo.

Para superar las limitaciones de la transferencia de masa, se han descrito diferentes configuraciones, tales como realizar los ensayos multiplexados en un microcanal, reduciendo así la distancia de difusión entre las dianas y las sondas. Por ejemplo, J.K.-K. Ng et al (2007), Anal. Chem Acta 582, páginas 295-303, describen un dispositivo de microfluido que comprende microperlas que están funcionalizadas con oligonucleótidos a través de la unión de biotina-estreptavidina. El dispositivo de microfluido consiste en una cámara amplia con una sección variable y con una presa para atrapar las microperlas en una disposición monocapa. Diferentes conjuntos de microperlas se introducen secuencialmente separados por perlas espaciadoras no funcionalizadas. Como puede verse en la figura 5a en el documento, las microperlas forman grandes grupos con límites indefinidos debido a la mezcla de partículas con partículas de los conjuntos espaciadores. Dado que las perlas no tienen una característica que las distinga unas de otras, tales como el tamaño, la forma o un código, los límites de los diferentes conjuntos son desconocidos y solo se revelan después del ensayo mediante la detección de la presencia del analito en la muestra. Por lo tanto, la configuración descrita por J.K.-K. Ng et al no es adecuada para ensayos multiplexados, ya que no es posible determinar de manera confiable la presencia o ausencia de varias dianas en una muestra. Por ejemplo, en ausencia de varios analitos en la muestra que corresponden a conjuntos consecutivos, no se registrará ninguna señal en una porción completa del microcanal. Por lo tanto, será difícil establecer a cuántos conjuntos corresponde realmente esta porción (por lo tanto, no habrá ninguna indicación sobre cuántos analitos están realmente ausentes). También será difícil o incluso imposible establecer la identidad de los analitos posteriores que reaccionan con los conjuntos consecutivos, ya que la posición en la secuencia de estos conjuntos no se puede establecer de manera confiable.

Los documentos de patente europea EP1712282A2, y de patente internacional WO00/061198A1 y WO04/025560A1 describen configuraciones que tienen elementos de microportadores colocados dentro de microcanales, de manera que su movimiento está restringido en el microcanal. Los ensayos se realizan mediante fluidos que fluyen a su través. Este tipo de configuración es eficaz para la transferencia de masa, ya que las distancias de difusión son pequeñas y el movimiento de la muestra en relación con los microportadores lleva las moléculas diana a la proximidad de las moléculas receptoras. Estos tipos de configuraciones también reducen el coste mediante la reducción de la cantidad de reactivos que se necesitan.

Sin embargo, en los documentos de patente europea EP1712282A2 e internacional WO00/061198A1, el orden de los microportadores en el microcanal es muy importante ya que define la identidad de los microportadores. En el documento de patente internacional WO2004025560A1, los microportadores están codificados de modo que su orden en el microcanal no es tan crítico como en el documento de patente europea EP1712282A2. Aun así, la divulgación del documento de patente internacional WO2004025560A1 solo describe configuraciones donde los microportadores están estrictamente alineados uno detrás del otro para cumplir con los requisitos del mecanismo de descodificación propuesto que requiere una ubicación específica de los códigos de los microportadores para permitir su identificación.

Los documentos de patente europea EP1712282A2, e internacional WO00/061198A1 y WO04/025560A1 describen configuraciones que no son fáciles de preparar en la práctica ya que requieren una introducción muy controlada de los microportadores en un espacio confinado, ya sea para controlar su orden o para alinearlos para el propósito de la descodificación. Para lograr tales configuraciones, se requieren métodos especializados y configuraciones específicas que involucren técnicas de microscopía, micromanipulación (uso de fuerzas controladas microscópicamente) y/o de microfabricación.

De hecho, los microportadores necesitan ser introducidos en el microcanal mediante algún proceso que implique o una micromanipulación intrincada de microportadores individuales, tal como se describe en el documento de patente internacional WO0061198A1 o, cuando la posición exacta de cada microportador no necesita ser controlada, algún

tipo de mecanismo de embudo que los guíe desde un cierto volumen a un pequeño microcanal, tal como se describe en el documento de patente internacional WO04/025560A1. El mecanismo de embudo es más sencillo de construir en la práctica, pero es sensible a la obstrucción al formar arcos en la entrada del microcanal 1 (figuras 14 y 15). Además para el enfoque de embudo, el documento de patente internacional WO04/025560A1 sugiere la producción de varillas de ensayo mediante un enfoque de sándwich en donde las perlas se colocan en una placa inferior que tiene surcos. Posteriormente, una placa superior se coloca en la parte superior y se une a la placa inferior.

Una consecuencia práctica del nivel de sofisticación requerido para preparar las configuraciones descritas en la técnica anterior es que reduce la posibilidad de ser utilizadas para producir una configuración flexible para usos de investigación por parte de un técnico de laboratorio. Por ejemplo, sería muy difícil permitir la preparación de configuraciones personalizadas por parte de un técnico de laboratorio que quisiera utilizar sus propios procedimientos de recubrimiento bioquímico en microportadores (por ejemplo, para probar sondas biológicas en desarrollo) y luego introducirlas en la configuración para realizar ensayos biológicos.

Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de dispositivos y métodos de ensayo que mejoren la transferencia de masa en ensayos de multiplexación biológica basados en microportadores y que simplifiquen el procedimiento general para preparar la configuración, ejecutar el ensayo biológico y realizar las lecturas necesarias.

Divulgación de la invención

Por lo tanto, es un objeto general de la invención proporcionar un dispositivo y un método que permita una transferencia de masa mejorada y una simplificación del procedimiento para la preparación y realización de ensayos biológicos multiplexados, en particular un dispositivo y un método para ensayos multiplexados.

Un dispositivo de ensayo de la presente invención es como se define en la reivindicación 1 y comprende un microcanal tal como una cámara de reacción y al menos dos conjuntos de microportadores codificados individualmente (es decir micropartículas que tienen ligandos unidos a su superficie). Los al menos dos conjuntos de microportadores tienen diferente funcionalización. La forma y tamaño de los microportadores con relación a la sección transversal del microcanal permite tener, a lo largo de toda la longitud del microcanal, al menos dos de cualquiera de los microportadores dispuestos uno al lado del otro sin tocarse uno con otro y sin tocar el perímetro del microcanal cuando viajan en la dirección longitudinal del microcanal, o sea durante el llenado.

Preferiblemente, los microportadores se pueden observar dentro del microcanal. La configuración también comprende algunos medios para restringir el movimiento longitudinal de dichos microportadores en dicho microcanal al tiempo que deja que fluyan los fluidos. La muestra biológica, que típicamente comprende una o más moléculas diana, se hace pasar a través de los microportadores confinados o inmovilizados, de modo que los microportadores no sigan el flujo de la muestra biológica. El movimiento de la muestra en relación con los microportadores lleva las moléculas diana a la proximidad de las moléculas receptoras, lo que aumenta las posibilidades de unión y, por lo tanto, reduce el tiempo de incubación necesario para realizar la transferencia de masas. Para distinguir los diversos conjuntos independientemente de la realización e independientemente de su posición, los microportadores están codificados, de manera que el código es indicativo de su función.

Un aspecto importante de la invención reside en la forma relativa y el tamaño de los microportadores en relación con la sección transversal del microcanal, con el fin de facilitar la preparación de la configuración. La técnica existente descrita en los documentos de patente europea EP1712282A2, e internacional WO00/061198A1 y WO04/025560A1 requiere un control estricto de la disposición de los microportadores en el canal de microfluido que no es fácil de lograr ya que la manipulación de objetos de tan pequeño tamaño (es decir, en el rango de micrones) no es trivial y requiere métodos especializados y configuraciones específicas que incluyen técnicas de microscopía, micromanipulación (uso de fuerzas controladas microscópicamente) y/o de microfabricación.

En la presente invención, los microportadores tienen una libertad de movimiento mucho mayor dentro del microcanal. El tamaño y la forma de los microportadores de la invención es tal que al menos dos microportadores se pueden colocar uno al lado del otro sin tocarse y sin tocar el perímetro del microcanal, a lo largo de toda la longitud del microcanal que sirve como cámara de reacción y, en particular, en su entrada. Esto significa que los microportadores que se estén moviendo en la dirección longitudinal del microcanal a diferentes velocidades podrían pasarse unos a otros hasta el punto donde se restringe su movimiento longitudinal. Los dos o más microportadores (i) están en una configuración tal que los dos o más microportadores caben dentro del microcanal e (ii) interseccionan la sección transversal en esa posición dada, e (iii) sus superficies proyectadas a lo largo de la dirección longitudinal, en esa posición dada, no se solapan y están adjuntas en la superficie de la sección transversal, en esa posición dada. Esta característica es clave para facilitar la construcción práctica de la configuración, lo que es particularmente importante cuando la configuración se prepara en un entorno de investigación justo antes de realizar un ensayo, lo que permite flexibilidad en la preparación de mezclas de conjuntos de microportadores. El uso de un microcanal que es relativamente mucho más ancho que el tamaño de los microportadores tiene el efecto de disminuir la probabilidad de que se formen arcos en la entrada del microcanal que obstruirían la entrada. Esto permite además usar una entrada ampliada en lugar de un embudo estrecho para cargar el microcanal. En una realización el microcanal está conectado a al menos una extremidad agrandada y comprende una entrada. Una segunda ventaja consiste en reducir las posibilidades de bloquear una gran parte de los microportadores si hay obstáculos dentro del microcanal. Los

obstáculos podrían ser elementos no deseados tales como escombros (polvo) o burbujas de aire en el microcanal o podrían ser características incorporadas que podrían ser necesarias para facilitar la microfabricación del canal de microfluido, por ejemplo, pilares para garantizar la rigidez adecuada de los microcanales cuando se utilizan polímeros blandos tales como PDMS.

La invención proporciona además un método como se define en la reivindicación 11, para realizar un ensayo basado en microportadores y adecuado para la multiplexación que comprende los pasos de

a) proporcionar un dispositivo de ensayo como se describió anteriormente,

b) al menos parcialmente llenar dicho microcanal con dichos al menos dos conjuntos de microportadores codificados;

c) restringir el movimiento de dichos microportadores en la dirección longitudinal de dicho microcanal al tiempo que se deja que fluyan los fluidos;

d) hacer fluir una muestra que comprende potencialmente una o más moléculas diana a través de dicho microcanal que comprende dichos microportadores;

e) identificar los conjuntos de microportadores; y

f) detectar una reacción entre el ligando y la molécula diana y correlacionar la presencia o ausencia de una reacción con la identidad de un conjunto específico para inferir la presencia o ausencia de una molécula diana en la muestra.

En soluciones tradicionales, tales como el uso de múltiples pozos, la transferencia de masa se mejora utilizando técnicas básicas de agitación, por lo que tanto la muestra como los elementos de microportadores se agitan al azar. A micro escala, donde los flujos son laminares, esta técnica solo incrementa marginalmente el movimiento relativo de los microportadores con respecto a la muestra, lo que es un elemento clave para garantizar una transferencia de masa eficiente. La presente invención desacopla los movimientos de la muestra y los microportadores. Además, la configuración de la cámara de reacción alargada y el volumen limitado alrededor de los microportadores garantizan que la muestra pase cerca de un número máximo de microportadores. La ventaja lograda del ensayo y el método aquí divulgado es acelerar la transferencia de masa al reducir la dependencia en la difusión para poner en contacto las moléculas de interés con los receptores potenciales. Otras ventajas incluyen la simplicidad del mecanismo, que se basa en las propiedades de los microcanales y las disposiciones geométricas para mejorar la transferencia de masa. La configuración también permite manipulaciones fluidas flexibles con requisitos mínimos para el manejo de los microportadores, por ejemplo, si se requieren pasos adicionales para la realización de ensayos complejos. Se necesita poca adaptación de la configuración si se desea mover el fluido hacia adelante y hacia atrás, por ejemplo, si la velocidad del fluido no se puede controlar de manera confiable o si la muestra se diluye, es posible que deba pasarse varias veces en contacto con los microportadores para asegurar la correcta captura de las moléculas de interés.

La invención es adecuada para ensayos multiplexados, ya que permite la asociación de varias funciones a varios conjuntos de microportadores y su uso simultáneo en un ensayo, al mismo tiempo que puede discriminar las diversas reacciones, siempre que la reacción genere una señal que se localice conjuntamente en el microportador. Esto se hace trabajando con microportadores codificados que son identificables y, por lo tanto, permiten determinar qué función desempeñan.

Además, la configuración de los microfluidos reduce la cantidad de muestra necesaria para llevar a cabo el ensayo biológico. También facilita la ejecución de los pasos de ensayo adicionales necesarios al permitir que reactivos adicionales o soluciones de lavado pasen por el microcanal sin tener que realizar ninguna manipulación en particular en los microportadores.

La invención también simplifica las manipulaciones generales requeridas para obtener los resultados del ensayo en comparación con los enfoques tradicionales basados en microportadores, en los que los microportadores deben recogerse desde la cámara de reacción y trasladarse a un dispositivo de lectura. En una realización, la identificación del conjunto de microportadores se lleva a cabo mediante el análisis de una imagen capturada usando una matriz de sensores, por ejemplo con sensores seleccionados de un fotosensor CCD o un fotosensor C-MOS. Indudablemente, en aquellas realizaciones en las que el microcanal es al menos parcialmente transparente, los microportadores se pueden observar directamente dentro del microcanal mediante medios ópticos para identificar los conjuntos y realizar la lectura biológica. Esta configuración también permite la posibilidad de información cinética al observar los microportadores a medida que se produce la reacción.

Además, la invención también simplifica la preparación del dispositivo de ensayo al facilitar la manipulación y reducir el nivel de experiencia requerido para introducir los microportadores en el microcanal, permitiendo así el uso de configuraciones personalizadas que se preparan justo antes de realizar el ensayo (por ejemplo, en entornos de investigación).

La invención puede utilizarse predominantemente en la industria de las ciencias de la vida, y en particular en diagnóstico, investigación genómica y biología molecular.

Breve descripción de los dibujos

La invención se comprenderá mejor y otros objetos distintos de los expuestos anteriormente se harán evidentes cuando se considere la siguiente descripción detallada de la misma. Dicha descripción hace referencia a los dibujos adjuntos, en donde:

La figura 1 representa una realización de ejemplo de un microcanal 1 como cámara de reacción (mostrada en negrita) con su entrada 14 que se conecta a un extremo ampliado 6 y a una entrada 5, su salida 16 se conecta a un medio de detención 4 (en forma de estructura del filtro) y a una salida 15. La figura 1.1 representa una vista de alzado, mientras que la figura 1.2 muestra una vista de la sección transversal a través de la línea AA de la figura 1.1

La figura 2 representa una realización de ejemplo de un microcanal que tiene una entrada 14 con una extremidad ampliada 6 y dos entradas 5 y 5'. La figura 2.1 representa una vista de alzado del microcanal 1 con la sección 6 ampliada y dos entradas 5 y 5', mientras que la figura 2.2 muestra una vista de la sección transversal a través de la línea AA de la figura 2.1.

La figura 3 representa una realización de ejemplo de un microcanal 1 que tiene una entrada 14 con un extremo ampliado 6 y una entrada 5. La figura también muestra los flujos laminares y un vórtice laminar 8 en el pocillo 7. La figura 3.1 muestra una vista de alzado del microcanal 1 y su sección ampliada 6 en un extremo del microcanal 1. La figura 3.2 representa una vista de la sección transversal a través de la línea AA de la figura 3.1 y muestra la entrada 5 y el pocillo 7 que da acceso al microcanal 1, así como al flujo 9 que forma un vórtice 8.

La figura 4 muestra una realización de ejemplo donde los microportadores 2 tienen forma de disco (es decir, una forma en forma de oblea con una cara frontal circular) y están en un microcanal 1 con una sección transversal rectangular. El microcanal 1 tiene dos paredes laterales 101, una base 102 y una cubierta 103. La sección transversal del microcanal 1 es tal que los microportadores 2 tienen una disposición de monocapa y tienen restringidos sus movimientos de rotación. La figura 4.1 muestra una vista de alzado mientras que la figura 4.2 muestra una vista de la sección transversal a través de la línea AA de la figura 4.1. La figura 4.3 muestra una representación 3-D. En el caso ilustrado, la disposición de monocapa no está estrictamente en un plano (la posición vertical de los microportadores 2 puede variar ligeramente como se muestra en la figura 4.2) pero los microportadores 2 no pueden ir uno encima del otro. Diferentes patrones de llenado de los microportadores 2 ilustran diferentes conjuntos.

La figura 5 ilustra el uso de un sensor 10 de tipo matriz, por ejemplo, un fotosensor CCD o un fotosensor C-MOS, para capturar una imagen de campo amplio de la disposición de monocapa de los microportadores 2 en el interior del canal de microfluido 1.

La figura 6 muestra una realización de ejemplo donde los microportadores 2 tienen forma de disco y están en un microcanal 1 con una sección transversal rectangular. Ilustra cómo los microportadores pueden tener un movimiento relativamente libre (en un plano 2D en este ejemplo) hasta que alcanzan el punto donde se restringe su movimiento longitudinal. Esto les permite pasarse unos a otros y reduce el riesgo de bloquear un gran número de microportadores en caso de la presencia de un obstáculo. La figura 6.1 muestra una vista de alzado mientras que la figura 6.2 muestra una vista de la sección transversal a través de la línea AA de la figura 6.1. La figura 6.3 muestra una representación tridimensional.

La figura 7 muestra una realización de ejemplo de un microportador 2 que tiene forma de disco y un código en forma de un patrón de orificios horadados 21 a través del microportador 2. El microportador 2 presenta una marca de orientación de triángulo 20 que se utiliza para determinar si el microportador 2 está al revés y también sirve como punto de partida del patrón de códificación. El microportador 2 tiene los elementos de codificación en la periferia dejando así una porción significativa, alrededor del centro del microportador 2, de la superficie para una región dedicada uniforme y plana adecuada para la lectura biológica.

La figura 8 muestra dos imágenes tomadas por una cámara CCD que ilustran la lectura biológica de los microportadores 2 en un ensayo de multiplex sencillo. Dos conjuntos de microportadores 2 se introdujeron en el microcanal: un primer conjunto de microportadores 11 (código con un orificio) funcionalizados con una sonda de ADN P1 (5′ - CAA CCC CAG CTA ATA TTA TT - 3') y un segundo conjunto de microportadores 12 (código con tres orificios) funcionalizados con otra sonda de ADN P2 (5' - TGG GTA AGT TAG GGC GAT GG - 3'). A continuación, se enjuagó con una solución que contenía ADN diana T1 marcado con fluorescencia (5' Cy5 - AAT AAT ATT AGC TGG GGT TG - 3') complementario con la sonda P1 y solo los microportadores 11 funcionalizados con la sonda de ADN P1 reaccionaron (véase la diferencia entre el campo claro (luz blanca) en la figura 8.1 y la luz fluorescente en la figura 8.2).

La figura 9 ilustra cómo se puede realizar la lectura biológica a lo largo del tiempo mientras se realiza el ensayo para proporcionar información sobre la cinética de la reacción. Esta figura también muestra que el dispositivo es muy eficiente en términos de transferencia de masa, ya que es capaz de detectar reacciones de hibridación en unos pocos segundos (realizadas a una concentración diana de 200 nM). La foto fue tomada por una cámara CCD bajo luz fluorescente.

La figura 10 muestra otra realización de ejemplo en la que microportadores 2 codificados que tienen forma de disco (como la descrita anteriormente para la figura 7) están en un microcanal 1 con una sección transversal rectangular. La sección transversal del microcanal 1 es tal que los microportadores 2 forman una disposición de monocapa (no pueden ir uno encima del otro) y tienen restringidos sus movimientos de rotación para que queden esencialmente planos dentro del microcanal.

La figura 11 ilustra un microprocesador 13 para la multiplexación. Dicho microprocesador comprende varios microcanales 1 que contiene varios conjuntos de microportadores 2 funcionalizados. Los microcanales 1 se conectan a una entrada 5 y a una salida 15. Los microportadores 2 tienen forma de disco y están codificados (tal como se describió anteriormente para la figura 10).

La figura 12 ilustra varios ejemplos de microportadores con la forma de una oblea. La cara frontal tiene la forma de un disco (izquierda), de un cuadrado (centro) o de un hexágono (derecha).

La figura 13 muestra una realización de ejemplo donde los microportadores 2 tienen forma de disco y están codificados con un patrón de orificios horadados 21 y una marca de orientación en forma de L 20. La figura 13.1 muestra una imagen de campo brillante (luz blanca) de los microportadores. La figura 13.2 muestra una imagen fluorescente que expone los microportadores que han reaccionado después de fluir la muestra 9. Ambas imágenes fueron tomadas aquí después de fluir la muestra 9.

La figura 14 muestra cómo se pueden formar arcos en un embudo que guía a los microportadores 2 a un microcanal estrecho 1 y, por lo tanto, obstruir la entrada 14 del microcanal 1.

La figura 15 muestra una imagen de un arco de microportadores 2 que se forma en una construcción de embudo, que obstruyen la entrada del microcanal 1.

La figura 16 muestra varios ejemplos no limitativos de formas que son rectangulares o "próximas a rectangular". Ilustran secciones transversales preferidas para los microcanales 1 o para los microportadores 2 cuando están en forma de oblea.

La figura 17 muestra dos imágenes de una realización de ejemplo. Un microprocesador 13 fabricado utilizando técnicas de moldeo PDMS y unido a un portaobjetos de vidrio de microscopio (como se describe en Fundamentals and Applicacions of Microfluidics by Nam-Trung Nguyen y Steve Wereley, ISBN: 9781580533430, capítulo 3) comprende un microcanal 1 que se conecta, en un extremo, a una entrada 5 y, en el otro extremo, a una salida 15. Un medio de detención 4 que consiste en una estructura de filtro hecha de pilares rectangulares se construye a la salida del microcanal 1. Además, los pilares cilíndricos 17 están construidos en el microcanal 1 para ayudar a estabilizar la altura del microcanal (es decir, evitar que se comprima) cuando se aplican presiones negativas.

La figura 18 muestra una imagen de una oblea que comprende micropartículas de silicio que aún no se han liberado. Las micropartículas tienen una forma de disco y están codificadas por un patrón de orificios horadados 21. Los microportadores tienen un diámetro de 50 micras e incluyen una marca 20 de orientación en forma de L.

Formas de llevar a cabo la invención

Dentro del alcance de la presente invención, se aplican las siguientes definiciones:

'Multiplexación" se refiere la realización en paralelo de varios ensayos, típicamente en un gran número de compuestos o moléculas, con la capacidad de discriminar los resultados de cada ensayo individualmente. Estos ensayos pueden ser, por ejemplo, de naturaleza biológica y/o química y típicamente implican la detección de varias moléculas diana y varias moléculas de captura que sirven como agentes para detectar esas moléculas diana. Dichas moléculas de captura se unen típicamente como ligandos sobre sustratos portadores. El número de ensayos que se realizan en paralelo en un ensayo multiplexado a menudo se conoce como el "nivel" de multiplexado y puede variar desde unos pocos (2 o 3) hasta varios cientos de miles para los niveles más altos de multiplexado. Los últimos son generalmente ensayos de hibridación de ácidos nucleicos típicamente realizados hoy en día en micromatrices, pero que pueden realizarse mediante el dispositivo de ensayo divulgado en este documento.

"Ensayo único" se refiere a la realización de un ensayo único, donde solo una molécula de captura busca detectar una molécula diana.

"Cámara de reacción" se refiere a un espacio donde tiene lugar la reacción biológica y/o química entre una molécula diana y una molécula o un ligando de captura.

"Microcanal" o "canal de microfluido" se refiere a un canal cerrado, es decir, un paso alargado para fluidos, con un tamaño microscópico de sección transversal, es decir, la dimensión más grande (de la sección transversal) que es típicamente de 1 a 500 micrómetros, preferiblemente de 10 a 500 micrómetros, más preferiblemente de 20 a 300 micrómetros, incluso más preferiblemente de 30 a 300 micrómetros. Un microcanal tiene una dirección longitudinal, que no es necesariamente una línea recta, y que corresponde a la dirección en la que se dirigen los fluidos dentro del microcanal, es decir, esencialmente a la dirección correspondiente a la adición vectorial de los vectores de velocidad

de un fluido que pasa por el microcanal, asumiendo un régimen de flujo laminar. Un microcanal tiene, en un extremo, una entrada 14 y, en el otro extremo, una salida 16, que son aberturas en el microcanal que, por ejemplo, dejan que los fluidos que entren en el microcanal, respectivamente, dejen el microcanal. La sección transversal de un microcanal a menudo es constante en la mayor parte de su longitud, pero esta sección puede variar y, por lo general, puede agrandarse al menos cerca de la entrada 14 o cerca de la salida 16 para conectarse a una entrada 5, a una salida 15, a uno o más de otros microcanales o a otro componente de microfluido (tal como un mecanismo de válvula). Un microcanal puede extenderse de modo que la línea formada por la dirección longitudinal tenga cualquier forma o longitud y se extienda tridimensionalmente (es decir, la línea formada por la extensión en la dirección longitudinal no se queda en un plano).

Cuando se hace referencia a la "sección transversal", se entiende la sección transversal perpendicular al eje longitudinal.

El término "perímetro" se refiere al perímetro interno del microcanal o la circunferencia de la sección transversal.

"Funcionalizado" se refiere a una partícula o micropartícula que tiene uno o más, pero preferiblemente uno, ligandos unido a su superficie, que pueden servir como molécula de captura o de receptor para una molécula diana determinada (analito). El término "molécula" debe entenderse ampliamente y puede incluir varias moléculas, partículas o células. Por ejemplo, la "molécula" diana puede ser una partícula de virus y/o la "molécula" de captura (ligando) puede ser un grupo de fragmentos de unión a un antígeno. En otro ejemplo, la “molécula” diana puede ser un ácido nucleico tal como un fragmento de ADN, de ARN o ADNss y la “molécula” captura otro ácido nucleico tal como un fragmento de ADN, ARN o ADNss que está diseñado para hibridarse con el anterior. También puede ser que para capturar específicamente una molécula diana sean necesarias diferentes moléculas de captura. Dentro del alcance de la presente invención, los ejemplos mencionados se calificarán como una "molécula de captura" o "molécula diana", respectivamente. Los ligandos y las moléculas diana pueden ser naturales, sintéticos o semisintéticos.

El término "función" se refiere a la capacidad de unirse y/o reaccionar con una molécula diana determinada y, por lo tanto, se refiere a la presencia de un ligando específico.

Los términos "ligando", "molécula de captura" y "molécula receptora" se usan aquí en forma sinónima. Lo mismo se aplica a los términos "molécula diana" y "analito", aunque el analito puede comprender varias moléculas diana.

Las "micropartículas" se refieren a cualquier tipo de partículas de tamaño microscópico, típicamente con una dimensión mayor de 100 nm a 300 micrómetros, preferiblemente de 1 µm a 200 µm.

Los "microportadores" como se usan en este documento son micropartículas que están funcionalizadas para analizar y/o reaccionar con un analito en una muestra. El término "microportador funcionalizado" se usa simultáneamente en este documento. Al describir aspectos que no están vinculados a su función, tales como aspectos geométricos o aspectos de microfabricación, “microportadores” y “micropartículas” se pueden considerar de manera equivalente en este documento.

Un “conjunto” o “conjunto de microportadores” se refiere a uno o más microportadores con la misma funcionalización. Un conjunto puede ser solo un microportador o más de un microportador. Los microportadores de un conjunto pueden transportar más de una molécula de captura para capturar dos o más moléculas diana, pero esto todavía se conoce como una función. Dos conjuntos diferentes de microportadores, que se distinguen entre sí, pueden tener la misma funcionalización.

El término "lectura biológica" se refiere a la detección de si un ligando unido a un microportador se ha unido o reaccionado con un analito diana. La lectura biológica también puede proporcionar información cuantitativa que es indicativa de la cantidad de analito diana que ha reaccionado.

Un "código", como se usa en este documento, es cualquier atributo o característica de una micropartícula o microportador que se distingue por observación o detección y que se usa para identificar la micropartícula o microportador o para asociar la micropartícula o microportador a una población específica (por ejemplo, la población de microportadores que tienen una función determinada). Un código en un microportador puede determinarse independientemente de su posición e independientemente de la realización de un ensayo, es decir, no requiere la presencia de un analito diana para ser revelado. Típicamente, un código se caracteriza por la respuesta óptica o magnética de la micropartícula o microportador en observación. Esta respuesta podría definirse para la micropartícula o microportador en su totalidad (por ejemplo, el color del microportador) o podría estar modulada espacialmente en o sobre la micropartícula o microportador para dar como resultado un diseño con patrón (por ejemplo, un código de barras obtenido por la modulación del color sobre el microportador). Los ejemplos de códigos incluyen, pero no están limitados a, color, forma, tamaño, patrones impresos o grabados, configuración de orificios, patrones holográficos, firmas magnéticas, composición química, modificación de la transmisión de luz o características de reflexión, emisión de puntos cuánticos u objetos extraños detectables distintivos (por ejemplo, oligonucleótidos u otros polímeros) unidos a la superficie.

Los términos "microportadores codificados" y "micropartículas codificadas" respectivamente se refieren aquí a microportadores, respectivamente micropartículas, que tienen un código. Los microportadores de la invención se codifican individualmente, es decir, cada microportador lleva su propio código, incluso si varios microportadores (típicamente los microportadores de un conjunto) pueden llevar un código con un mismo valor (es decir, los microportadores no se distinguen solo por su código). Los diferentes conjuntos de microportadores codificados de la invención se pueden distinguir y/o identificar independientemente de la posición de los microportadores en el microcanal e independientemente de la realización de un ensayo.

Dispuesto "uno al lado del otro" o permaneciendo "uno al lado del otro", como se usa en este documento, se refiere a una propiedad geométrica que pone en relación la geometría de dos o más micropartículas con la geometría del microcanal. Los dos o más microportadores se dice que están dispuestos uno al lado del otro" en una posición dada en el microcanal cuando (i) están en una configuración tal que los dos o más microportadores encajan dentro del microcanal e (ii) interseccionan la sección transversal en esa posición dada e (iii) sus superficies proyectadas a lo largo de la dirección longitudinal (en esa posición dada) no se solapan y están adjuntas en la superficie de la sección transversal (en esa posición dada). En general, en un microcanal que no tiene una sección transversal constante en toda su longitud, es posible que una o más micropartículas puedan estar dispuestas una al lado de la otra en algunas posiciones pero no en otras (aunque esta regla general no se aplica al microcanal 1 de la invención, que requiere poder tener los microportadores colocados uno al lado del otro en toda su longitud). Dependiendo de la geometría de las micropartículas, es posible que dos o más micropartículas puedan estar una al lado de la otra en una posición dada en el microcanal solo cuando están en ciertas orientaciones. Cuando estén colocadas una al lado de la otra, las micropartículas pueden estar en contacto entre sí o tener una distancia entre ellas.

La "forma de una oblea" se refiere aquí a una forma particular de una micropartícula donde la altura es notablemente menor (por ejemplo, al menos por un factor de dos) que ambas la anchura y la longitud, y la micropartícula tiene dos superficies esencialmente paralelas y esencialmente planas (caras frontales) en la parte superior e inferior (véase la figura 12). Una forma de "disco" se refiere a una forma en forma de una oblea con una cara frontal circular.

El microcanal

El microcanal 1 de la invención es preferiblemente recto, es decir, la dirección longitudinal se extiende a lo largo de una línea recta, pero también puede tener un contorno en serpentina, es decir, la dirección longitudinal se extiende para formar una línea con pistas paralelas conectadas con arcos, para limitar la huella. El microcanal 1 es preferiblemente esencialmente plano pero también puede extenderse tridimensionalmente.

La longitud del canal de microfluido 1 puede variar dependiendo de su sección transversal y de la huella deseada, por lo general, para encajar en el microprocesador de microfluido 13 en el que está típicamente comprendido. Típicamente, variará de 1 mm a 500 centímetros, preferiblemente de 5 mm a 200 cm. El ancho y la altura del microcanal es preferiblemente de 500 nm a 300 micrómetros. Por ejemplo, un microcanal 1 con un contorno en serpentina y una sección transversal pequeña (por ejemplo, menos de 100 micrones), puede alcanzar una longitud relativamente larga, tal como cientos de centímetros en una huella relativamente pequeña (pocos centímetros cuadrados). Por ejemplo, en un centímetro cuadrado es posible colocar un microcanal 1 de serpentina de 100 cm de largo que tiene una sección de 50 µm (suponiendo que la mitad de la superficie esté ocupada por el microcanal 1 y que la otra mitad esté espaciada). En una realización muy preferida, el microcanal 1 es sustancialmente recto y tiene una longitud de 2 mm a 10 mm, una anchura de 200 micras a 600 mm y una altura de 10 micras a 20 micras.

El microcanal 1 de la invención tiene una entrada 14 y una salida 16 que permiten que los fluidos 9 entren y, respectivamente, salgan del microcanal 1. La entrada 14 también se usa para introducir los microportadores 2 dentro del microcanal 1 y está típicamente conectada a un pozo de entrada 5, preferiblemente a través de una extremidad ampliada 6. El microcanal 1 de la invención termina preferiblemente en un medio de detención 4 como se describe a continuación y típicamente se prolonga por otro canal de microfluido (que no sirve como cámara de reacción) que conduce los fluidos 9 a una salida 15.

El microcanal 1 tiene preferiblemente una sección transversal rectangular o casi rectangular (véase la figura 16), trapezoidal o similar a un paralelogramo. El microcanal tiene típicamente dos paredes laterales 101, una base 102 y una cubierta 103. Las paredes laterales son preferiblemente, pero no necesariamente, rectas y colocadas en un ángulo cercano a 90 grados con respecto a la base (cara inferior) y la cubierta (cara superior), respectivamente. Las paredes laterales pueden estar curvadas de forma cóncava o convexa o pueden conectarse a la base o la cubierta con un ángulo que no sea recto, por ejemplo, 45 grados o 60 grados. Normalmente, la altura del microcanal es notablemente menor (por ejemplo, al menos por un factor de dos) que su anchura. En otra realización, la base 102 y/o la cubierta 103 están ligeramente curvadas o estructuradas con ranuras o protuberancias, por ejemplo para facilitar el flujo de fluidos 9.

El microcanal 1 de la invención, que sirve como cámara de reacción 1, está diseñado de tal manera que puede contener al menos dos conjuntos de microportadores 2, tal como dos microportadores 2 cualquiera que pueden estar uno al lado del otro sin tocarse y sin tocar el perímetro en toda su longitud, especialmente en su entrada 14. En una realización, el microcanal 1 tiene al menos una dimensión de su sección transversal que es mayor que la suma de la extensión más grande de la superficie proyectada más grande de cualquiera de los dos microportadores 2. Por

ejemplo, en un microcanal 1 con una sección transversal rectangular o casi rectangular y microtransportadores 2 en forma de oblea, dicha dimensión puede ser el ancho del microcanal 1 que es mayor que la suma de los anchos de cualquiera de los dos microportadores 2. De este modo, el microcanal 1 puede tener una anchura tal que dos micropartículas se puedan disponer una al lado de la otra sin inhibir el movimiento de las micropartículas en la dirección longitudinal del microcanal 1, por ejemplo, durante el llenado. Más preferiblemente, el ancho es tal que las micropartículas puedan pasar sin tocarse entre sí y sin tocar el perímetro del microcanal 1 lo que, debido a la fricción, también puede conducir al bloqueo. En una realización preferida, la sección transversal del microcanal 1 es preferiblemente constante o esencialmente constante en toda la longitud del microcanal 1. En otra realización, el microcanal 1 está conectado a una extremidad ampliada 6, donde la sección transversal se ensancha, típicamente en la entrada 14, para facilitar la introducción de los microportadores. En una realización preferida, la extremidad ampliada 6 en la entrada 14 de un microcanal rectangular o esencialmente rectangular se realiza aumentando la distancia de las paredes laterales 101 al eje longitudinal mientras la altura del microcanal (es decir, la distancia entre la base y la cubierta) preferiblemente permanece esencialmente constante.

En una realización preferida, el microcanal 1 está hecho de o comprende silicio, SU-8 (un fotoprotector basado en epoxi), poliimida (PI), polidimetilsiloxano (PDMS), silicona u otros elastómeros termoplásticos (TPE), polimetilmetacrilato (PMMA), Teflon (PTFE), elastómeros termoplásticos (TPE), Victrex PEEK™, policarbonato, cloruro de polivinilo (PVC), polipropileno (PP), polietileno (PE), poliestireno (PS), etileno-propileno fluorado (FEP), (co)polímero de olefina cíclica (COP o COC) u otros polímeros termoplásticos, cuarzo, vidrio o metales plateables tales como el níquel, plata u oro, lo más preferible de polímeros transparentes. Lo más preferible, el microcanal está hecho de (co)polímero de olefina cíclica.

Preferiblemente, el microcanal 1 es transparente en al menos un lado. De este modo, las micropartículas pueden observarse fácilmente a través de medios acordes para la inspección óptica, por ejemplo, un microscopio. Esto permite una fácil identificación de los conjuntos de microportadores 2 que están codificados con técnicas ópticas cuando se colocan dentro del microcanal 1, y la determinación de la lectura biológica mediante técnicas convencionales basadas en la respuesta óptica utilizada en la técnica para esa determinación. Los materiales adecuados para proporcionar transparencia son, por ejemplo, SU-8, PDMS o silicona.

El microcanal 1 puede fabricarse utilizando técnicas convencionales de fotolitografía y/o estampado y/o moldeo por inyección que se describen ampliamente en la bibliografía (por ejemplo, Fundamentals of microfabrication de Marc J. Madou, ISBN: 0849308267, 9780849308260, Fundamentals and Applications of Microfluidics de Nam-Trung Nguyen y Steve Wereley, ISBN: 9781580533430, capítulo 3). Por ejemplo, el microcanal 1 puede producirse grabando un canal en un sustrato mediante métodos conocidos y luego sellándolo con una placa, por ejemplo, hecha de vidrio o con un segundo canal que también se grabó en un sustrato. Las técnicas de microfabricación también se pueden usar para producir micropartículas, por ejemplo para producir micropartículas de silicio en una oblea como se describe en el documento de patente europea EP1276555B1.

A las escalas que se consideran, los flujos son laminares. Con el fin de garantizar que las moléculas diana de interés en la muestra pasen cerca de un máximo de microportadores 2, el microcanal 1 debe diseñarse de tal manera que los microportadores 2 dejen abierta una sección lo más pequeña posible a su alrededor, lo que permite que la muestra 9 fluya a través. El caudal estará limitado, por ejemplo, por la sección que queda abierta alrededor de los microportadores, por la longitud del microcanal, por las fuerzas que mueven los fluidos (por ejemplo, la presión que se aplica) y por las propiedades del fluido de la muestra (viscosidad, tamaño de moléculas que transporta la muestra, etc.).

Microportadores y conjuntos de microportadores.

El microcanal 1 contiene simultáneamente al menos dos conjuntos de microportadores 2, pero también puede comprender tres, cuatro, cinco, diez o cientos o más conjuntos de microportadores. Para niveles más altos de multiplexación (por ejemplo, para ensayos de hibridación de ácidos nucleicos), el microcanal puede contener cientos de miles de conjuntos. Esto se puede lograr, por ejemplo, con microcanales 1 largos y anchos acoplados a pequeños microportadores 2.

Los tamaños, formas y materiales, así como la distinción entre micropartículas y microportadores se describen en la sección de definiciones.

Las micropartículas o microportadores 2 de la invención pueden fabricarse a partir de o comprender cualquier material utilizado habitualmente en la tecnología de detección y diagnóstico de alto rendimiento. Los ejemplos no limitantes de estos materiales incluyen el látex, poliestireno, dextranos reticulados, polimetilestireno, policarbonato, polipropileno, celulosa, poliacrilamida, polidimetilacrilamida, etileno-propileno fluorado, así como materiales comúnmente utilizados en la microfabricación o microfresado tales como vidrio, SiO_2, silicio, PMMA (polimetilmetacrilato), oro, plata, aluminio, acero u otros metales o materiales fotosensibles a base de epoxi, tales como el SU-8, y también otros polímeros tales como metilestireno o dimetilacrilamida. Las micropartículas pueden ser de cualquier forma y tamaño. Preferiblemente, los microportadores 2 están hechos de silicio.

Los microportadores 2 de la invención están codificados de tal manera que su función se puede determinar leyendo el código.

Las micropartículas y los microportadores 2 tienen preferiblemente una forma esférica o la forma de una oblea, lo que significa que su altura es notablemente menor (por ejemplo, al menos por un factor de dos) que tanto su anchura como su longitud y que tienen dos superficies esencialmente paralelas y esencialmente planas (caras frontales) en la parte superior e inferior.

Por lo tanto, cuando los microportadores 2 con la forma de una oblea se introducen en un microcanal 1 con una sección rectangular o casi rectangular como se describió anteriormente, se colocan planos en cualquiera de sus caras frontales y se pueden detectar fácilmente por medios ópticos. La figura 13 muestra realizaciones de ejemplo de microportadores 2 en forma de oblea. La superficie principal puede tener cualquier forma; los ejemplos no limitativos son un cuadrado, un rectángulo, un círculo, un triángulo o un hexágono (figura 12, derecha).

En una realización preferida, los microportadores 2 tienen una forma similar a un disco con la cara frontal en forma de un círculo, y están codificados por un patrón de orificios horadados 21. Los microportadores 2 pueden tener una marca que indica la orientación de arriba y abajo. De este modo, los microportadores 2 preferiblemente también incluyen una marca de orientación asimétrica 20 tal como un triángulo o una señal en forma de L. Esta combinación de código y forma permite una fácil identificación a través de técnicas de descodificación de imágenes.

En otra realización, los microportadores 2 tienen propiedades magnéticas que, por ejemplo, son adecuadas para inmovilizarlos dentro del microcanal.

En una realización, los microportadores 2 tienen un código en la forma de una configuración de agujeros horadados 21 colocados en el anillo externo que ocupan menos de la mitad del disco. Los microportadores 2 de cada conjunto están típicamente funcionalizados de manera idéntica. Los microportadores 2 pueden tener diferentes tamaños y formas entre sí. Los microportadores 2 están codificados de modo que los distintos conjuntos se distinguen entre sí por al menos un atributo o característica observable, es decir, el código. Aunque todos los microportadores 2 están codificados individualmente, los microportadores 2 de un conjunto dado preferiblemente comparten un mismo código. A medida que se utilizan microportadores 2 codificados, se pueden introducir en secuencia aleatoria en lugar de de manera controlada.

Los microportadores 2 sirven como soportes para ensayos químicos y biológicos. En esta capacidad, los microportadores 2 pueden contener uno o más ligandos unidos a su superficie y pueden ponerse en contacto con analitos diana para determinar la presencia o ausencia de analitos particulares de interés, o pueden servir como soportes para reacciones químicas combinatorias realizadas en el ligando unido. En una realización preferida, cada microportador tiene un ligando unido a su superficie. Debe entenderse que el término "un ligando" como se usa en este documento no pretende referirse numéricamente a una sola molécula sino a un tipo de ligando. Se puede unir un gran espectro de funcionalidades químicas y biológicas como ligandos a las micropartículas de la invención, incluyendo anticuerpos y otras proteínas, así como ácidos nucleicos tales como fragmentos de ADN, ARN o ADNss o aptámeros diseñados para unirse a moléculas específicas de interés. Estas funcionalidades incluyen todas las funcionalidades que se utilizan habitualmente en la tecnología de detección y los diagnósticos de alto rendimiento. Además, los microportadores 2 pueden funcionalizarse de diversas maneras para permitir la unión de un reactivo inicial. Los ejemplos de analitos diana para los ligandos unidos a los microportadores 2 incluyen antígenos, anticuerpos, receptores, haptenos, enzimas, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, fármacos, hormonas, patógenos, toxinas, células o cualquier otro producto químico o molécula de interés.

Medios para restringir el movimiento longitudinal de los microprocesadores

La invención proporciona un medio para aumentar la velocidad del flujo en relación con la de los microportadores 2 para mejorar las posibilidades de contacto entre las moléculas de interés 3 en el fluido 9 y los receptores 8 unidos a los microportadores 2. Por lo tanto, es importante restringir el movimiento de los microportadores 2 en la dirección del flujo, que es en la dirección longitudinal mientras se deja que fluyan los fluidos 9. La presencia de un medio de restricción proporciona una configuración esencialmente estática para realizar el ensayo y la lectura en el mismo lugar permitiendo la lectura cinética además de una transferencia de masa más rápida. El movimiento de los microportadores 2 perpendicular al flujo puede ocurrir, e incluso puede tener un impacto positivo en la velocidad de transferencia de masa, si el movimiento de los microportadores 2 es lo suficientemente rápido, ya que aumenta el tamaño virtual de la superficie de captura (esto es un forma de agitación que se puede lograr, por ejemplo, a través del golpeteo, vibración o sonicación).

La restricción del movimiento longitudinal de los microportadores se puede hacer de varias maneras. Por ejemplo, se puede usar al final de la cámara de reacción 1 al menos un medio de detención 4 que permite que los fluidos 9 fluyan pero bloquea el paso de las micropartículas 2. Los ejemplos no limitativos de dichos medios de detención 4 incluyen una rejilla, un alambre, un filtro de malla, una construcción de vertedero, uno o más pilares, una reducción de la sección del microcanal, fuerzas electrostáticas, en particular una o más micropartículas retenidas usando fuerzas electrostáticas, fuerzas dielectroforéticas, en particular una o más micropartículas retenidas usando fuerzas dielectroforéticas, una partícula magnética, etc. Las soluciones basadas en la compresión parcial de los microcanales

1 no rígidos (es decir, la contracción de la geometría del microcanal, por ejemplo, en el caso de los microcanales hechos de polímero blando tal como PDMS o parafina) también se pueden usar como medios de detención 4. Los medios de detención 4 pueden ser fijos o desmontables. Los medios de detención desmontables, que significa, por ejemplo, partículas magnéticas, permiten una fácil extracción de las micropartículas 2 en dirección del flujo 9 para el reemplazo o análisis de las micropartículas. Los medios de detención fijos 4, tales como una rejilla, pueden eliminarse con un láser para eliminar las micropartículas 2, por ejemplo, para analizarlas.

En un ejemplo no cubierto por la invención, si los microportadores 2 tienen propiedades magnéticas, los microportadores 2 pueden inmovilizarse aplicando un campo magnético. Por lo tanto, la presencia de un medio de detención 4 puede no ser necesaria. En un ejemplo alternativo no cubierto por la invención, los microportadores 2 se inmovilizan utilizando fuerzas dielectroforéticas.

Gracias al movimiento restringido de los microportadores, la configuración también facilita los pasos de lavado, el lavado de reactivos adicionales así como la lectura biológica, que se realiza preferiblemente en un modo estático.

Diseño del microcanal en relación con los microprocesadores.

Según la presente invención, el microcanal 1 tiene una sección transversal que permite que al menos dos de los microportadores 2 estén dispuestos uno al lado del otro en toda la longitud del microcanal 1, especialmente en la entrada 14, sin tocarse entre sí y sin tocar el perímetro. Téngase en cuenta que, estrictamente hablando, el microcanal 1 de la invención, que sirve como una cámara de reacción 1, termina en cualquier medio de detención que pueda estar integrado en el microcanal (por ejemplo, un filtro o estructura de malla o la reducción de la sección, etc.). Esto significa que cualquier porción de microfluido que contenga un medio de detención 4 no se considera parte del microcanal 1 de la invención y, por lo tanto, no se requiere que permita que dos o más microportadores 2 estén dispuestos uno al lado del otro. Para mayor claridad, cuando un microcanal continúa después de los medios de detención 4, esta parte se considera como otro microcanal (que no sirve como cámara de reacción) conectado al microcanal 1 de la invención (que sirve como cámara de reacción), por ejemplo para permitir que los fluidos salgan a través de una salida (véase la figura 1).

El hecho de que la sección transversal del microcanal 1 y la forma de los microportadores 2 permitan que al menos dos microportadores estén uno al lado del otro sin tocarse entre sí y sin tocar el perímetro no significa que no deban tocarse entre sí o tocar el perimetro. Solo significa que las geometrías respectivas del microcanal 1 y los microportadores 2 no obligan a los microportadores 2 a tocarse entre sí o al perímetro cuando están uno al lado del otro, aunque aún pueden hacerlo cuando se mueven libremente dentro del microcanal 1 o a medida que se asientan después de haber tenido su movimiento longitudinal restringido.

La capacidad de estar dispuestos uno al lado del otro sin tocarse y sin tocar el perímetro del microcanal 1 significa que los microportadores 2 pueden pasarse entre sí si se mueven a diferentes velocidades en la dirección longitudinal del microcanal 1, sin estar sujetos a fricción contra las paredes del microcanal 1 o entre sí. Esta configuración reduce las posibilidades de obstruir la entrada 14 al microcanal 1 ya que es mucho más difícil formar arcos cuando dos microportadores 2 pueden estar uno al lado del otro en la entrada 14 y notablemente más difícil en las realizaciones preferidas donde se permite que más de dos microportadores estén situados uno al lado del otro. También permite que los microportadores 2 se pasen entre sí si uno de ellos está obstruido por un obstáculo. Los obstáculos pueden ser residuos que estarían presentes en el microcanal 1, por ejemplo, cuando el método se realiza en un entorno de laboratorio de investigación (a diferencia de un entorno de fábrica controlado) justo antes de realizar un ensayo. Los obstáculos también pueden ser construcciones, tales como pilares, que se construyen en el canal de microfluido 1 para facilitar la fabricación del microcanal 1 o para garantizar su rigidez, por ejemplo, en el caso de que los microcanales se construyan utilizando polímeros blandos tales como PDMS. La grabación del dispositivo que comprende el canal de microfluido 1 también ayuda durante la introducción de los microportadores 2. Cuando se usan micropartículas más pesadas, tales como las micropartículas de silicio, la grabación es más eficiente cuando se realiza en frecuencias bajas, generalmente por debajo de 5 Herz.

En una realización más preferida, más de dos microportadores 2 pueden estar dispuestos uno al lado del otro en el microcanal 1 para reducir aún más la sensibilidad a los obstáculos (por ejemplo, polvos) o la formación de arcos, típicamente de 3 (tres) a 50 (cincuenta) microportadores, más preferiblemente de 3 (tres) a 12 (doce).

En realizaciones preferidas, los microportadores 2 tienen una forma que minimiza la superficie de contacto entre ellos cuando están en el microcanal 1 para reducir la fricción. Por lo general, las formas con superficies curvas, tales como las esferas o formas similares a discos, son preferidas en comparación con las superficies con bordes (tales como las formas cúbicas o poligonales).

En una realización preferida, los microportadores 2 tienen una forma similar a un disco lo que ofrece el beneficio adicional de ser fácilmente identificables en una imagen. También se pueden considerar otras formas que presentan superficies curvas que pueden entrar en contacto con otros microportadores 2, tales como microportadores 2 en forma de oblea con una cara frontal que tiene una forma ovalada, elipsoide o casi circular.

La disposición de monocapa

En una realización mucho más preferida, la forma de los microportadores 2 y la sección transversal del microcanal 1 se elige de manera que los microportadores 2 formen una disposición de monocapa y dejen abierta una sección mínima alrededor de ellos para que la muestra 9 fluya a través de ellos. La "disposición de monocapa", como se usa en este documento, se refiere a una configuración espacial donde existe un punto desde donde todos los microportadores 2 pueden observarse en línea directa sin ocultar u ocluir entre sí cualquier parte que sea esencial para su identificación (es decir, para determinar el código). En el caso de un microcanal 1 que es plano (es decir, con una dirección longitudinal que se extiende esencialmente horizontalmente), esto se traduce en la incapacidad de los microportadores 2 para ir uno encima del otro o para superponerse cuando están dentro del microcanal 1. Siempre que el microcanal 1 sea trasparente en al menos un lado, la disposición de monocapa es mucho más preferida, ya que facilitará la lectura biológica y la identificación de los microportadores por medios ópticos simples directamente dentro de la cámara de reacción 1.

Combinado con el hecho de que al menos dos microtransportadores 2 pueden estar uno al lado del otro como lo proporciona la invención, esta configuración forma una disposición de monocapa casi bidimensional al tiempo que minimiza la sección alrededor de los microcanales para que la muestra 9 fluya a través (véase, por ejemplo, la figura 4). Como se ilustra en la figura 4.2, esto no implica necesariamente una alineación estricta de los microportadores 2 en un solo plano. Preferiblemente, más de dos microportadores 2 se pueden colocar uno al lado del otro, típicamente de 3 (tres) a 50 (cincuenta) microportadores 2, más preferiblemente de 3 (tres) a 12 (doce). Esta disposición consumirá más muestra de fluido 9 que la alineación estricta de los microportadores 2 uno detrás de otro como se ve en la técnica anterior, pero será mucho más fácil de preparar.

Preferiblemente, la sección del microcanal 1 es constante en el área donde se produce la reacción en los microportadores 2 para facilitar la uniformidad de las condiciones de flujo.

Orientación e identificación de los microportadores

Cuando se trabaja con los microportadores 2 codificados junto a la disposición de monocapa, es además ventajoso elegir la forma de los microportadores 2, la forma y el material del microcanal 1 y el mecanismo de descodificación de tal manera que los códigos se puedan leer sin tener que manipular activamente a los microportadores 2 para posicionarlos y/o orientarlos adecuadamente al observarlos directamente en el microcanal 1. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante el uso de mecanismos de codificación que no requieran ninguna orientación o posición particular, tal como el tamaño o el color de todo el microportador 2, que puede ser, por ejemplo, esférico (por lo tanto, no requiriendo ninguna orientación particular).

Alternativamente, la forma de los microportadores puede ser tal que su rotación esté pasivamente restringida, es decir, restringida sin requerir ninguna fuerza externa distinta de las resultantes de las restricciones geométricas, cuando está dentro del microcanal 1, de manera que cualquier código se presente adecuadamente a un dispositivo de observación/detección.

Una realización de ejemplo de este concepto es diseñar microportadores 2 con la forma de una oblea que tiene un código presente en una o ambas caras y colocarlos dentro de un microcanal 1 con una sección transversal rectangular o casi rectangular, que preferiblemente está hecha de material transparente (véase la figura 8) en al menos en la base 102 o en la cubierta 103. La altura del microcanal 1 es preferiblemente menor que la altura de dos microportadores, lo que tiene el efecto de que los microportadores 2 no pueden ir uno encima del otro. De esta manera, los microportadores forman una disposición de monocapa y solo pueden estar al revés, pero siempre presentan esencialmente una de las superficies planas a cualquier dispositivo sensor que se coloca para observar el plano del microcanal 1 (como en la figura 5). Esta restricción adicional sobre la forma de los microportadores 2 en realidad no hace que su carga sea mucho más difícil cuando se realiza a través de una entrada vertical 5 con un fluido 9 que es aspirado hacia el microcanal 1 (como se muestra en las figuras 2 y 3) gracias al uso de un microcanal 1 que es relativamente ancho en comparación con el tamaño del microportador 2, como se proporciona por la invención. Las realizaciones de ejemplo de tal microcanal 1 se pueden ver en las figuras 4 a 6.

Si algún código está presente en una cara de los microportadores 2, es fácilmente observable para todos los microportadores que tienen la cara derecha presentada al dispositivo (estadísticamente la mitad de ellos). Además, si el código está presente o visible desde ambos lados, entonces todos los microportadores 2 pueden descodificarse sin necesidad de ninguna otra manipulación activa para orientarlos.

Una realización preferida de este concepto consiste en utilizar códigos que atraviesen los microportadores 2 para que el código pueda leerse e interpretarse desde ambos lados. Téngase en cuenta que, si el esquema de codificación tiene un patrón (en lugar de ser una característica no localizada de toda la cara, tal como el color, el tamaño, etc.), es posible que deba combinarse con una marca que indique la orientación (es decir, una marca con una asimetría, tal como una marca en forma de L o un triángulo. La figura 7 muestra una imagen de un ejemplo de realización de un código de este tipo creado mediante el uso de orificios horadadores 21 en un microportador en forma de oblea (un microportador tipo disco en la figura). Dicho esquema de codificación permite además identificar los microportadores independientemente de la realización del ensayo e independientemente de su posición dentro del microcanal.

Como la orientación y la posición de los microportadores 2 en el plano no están controladas, el método preferido para detectar y descodificar dichos microportadores 2 en forma de oblea es capturar una imagen o varias imágenes de la cámara de reacción 1 utilizando un tipo de sensor de matriz (por ejemplo, una matriz de sensores fotoeléctricos CCD o C-MOS) como se ilustra en la figura 5 o un sistema de escaneo rápido que construye la imagen y luego realiza una operación analítica en la imagen para detectar la posición del microportador 2 e interpretar su código. Esta operación analítica incluye típicamente un algoritmo de reconocimiento de forma, tal como el algoritmo de Hough, para detectar la posición de los microportadores 2 y una "rotación virtual" del microportador 2 para interpretar su código independientemente de su orientación. La operación analítica en la imagen también es típicamente capaz de reducir o eliminar el efecto de la presencia de residuos o burbujas de aire en la cámara de reacción 1. Se puede usar una "imagen" tomada por una cámara CCD (o C-MOS) con un microscopio para detectar y descodificar tales microportadores 2 y esta misma cámara también se puede usar para leer la señal fluorescente para la lectura biológica (como se muestra en la figura 8).

Introducción de los microprocesadores en el microcanal

El microcanal 1 de la invención tiene una entrada 14 que permite la introducción de los microportadores 2 en el interior del microcanal 1. Un método clásico para introducir las micropartículas 2 en el microcanal 1 es tenerlas en una suspensión en una solución tamponada que se transfiere a través de una entrada 5, conectada a la entrada 14, en el microcanal 1.

El microcanal 1 tiene preferiblemente, junto a su entrada 14, una sección ampliada 6 conectada a uno o más pocillos verticales 7 que sirven como entrada 5 para introducir las micropartículas 2 en el microcanal 1 (véase las figuras 2, 3). La sección ampliada 6 forma un embudo que permite guiar a los microportadores 2 y los fluidos 9 desde la entrada 5 al microcanal 1.

Como se explicó anteriormente, el microcanal 1 de la invención tiene una sección transversal relacionada con la forma de los microportadores 2 que permite tener al menos dos microportadores 2 situados uno al lado del otro en el microcanal 1 en toda su longitud, particularmente en la entrada 14, reduciendo así las posibilidades de obstruir la entrada 14 con la formación de arcos.

Un problema común que se encuentra cuando se introducen las micropartículas 2 en suspensión en los microcanales 1 es que, cuando el flujo 9 se detiene (por ejemplo, al cambiar de una solución a otra), las micropartículas restantes 2 tienden a sedimentarse en el fondo del pozo 7, posiblemente en áreas donde puedan quedar atrapadas en vórtices laminares 8 (véase la figura 3). Esto hace que sean difíciles de mover de forma controlada y aumenta el riesgo de que se mezclen diferentes conjuntos de microportadores 2, lo que no tiene ninguna importancia si los microportadores 2 están codificados individualmente, pero que sería problemático si se debieran introducir los microportadores 2 de cada conjunto de manera controlada en el microcanal 1 tal como lo requiere la técnica actual. Típicamente, se da tiempo a las micropartículas 2 para que se asienten completamente y se sitúen en la parte inferior de la entrada 5. Luego se mueven al microcanal 1 bajo las acciones combinadas de la aspiración de la solución amortiguadora y de las fuerzas de gravedad que actúan sobre las micropartículas 2 inclinando el dispositivo. Este método es particularmente efectivo para micropartículas 2 pesadas tales como las micropartículas de silicio. La agitación y el sacudir pueden ayudar aún más al proceso.

Con el fin de superar el problema de las micropartículas 2 que se asientan en lugares donde no pueden ser retiradas, en una realización de la invención, además del pozo 7, hay un segundo pozo 7' usado como entrada 5' para un flujo de lavado 9'. De este modo, se puede lograr un flujo de enjuague 9' continuo (o microimpulsado) a través del microcanal 1 mientras que se introducen las micropartículas 2 para evitar la sedimentación de estas últimas (véase la figura 2). Cuando las micropartículas 2 son pesadas, tales como las de silicio, esto generalmente no es necesario ya que las fuerzas de la gravedad que actúan sobre las micropartículas 2 cuando se inclina el dispositivo son suficientes para moverlas en la dirección deseada.

También se recomienda enjuagar con un fluido limpio 9 (es decir, sin micropartículas en suspensión) la entrada de micropartículas 5 después de la introducción de las micropartículas para asegurar que no queden partículas en el pozo 7 o en la extremidad ampliada 6 del microcanal 1. Esto también se puede combinar con una inspección óptica de la extremidad ampliada 6 del microcanal 1 para aumentar aún más la fiabilidad del procedimiento.

Método

En un segundo aspecto, la invención proporciona un método para realizar un ensayo multiplexado basado en microportadores que comprende los pasos de

a) proporcionar un dispositivo de ensayo que comprende un microcanal 1 como cámara de reacción y proporcionar al menos dos conjuntos de microportadores 2 codificados, en donde el código de dichos microportadores 2 es indicativo de la función y en donde la forma y tamaño de dichos microportadores 2 en relación con la sección transversal de dicho microcanal 1 permite tener, a lo largo de toda la longitud de dicho microcanal 1, al menos dos de cualquiera de dichos microportadores 2 situados uno al lado del otro;

b) llenar al menos parcialmente dicho microcanal 1 con dichos al menos dos conjuntos de microportadores 2 codificados;

c) restringir el movimiento de dichos microportadores 2 en la dirección longitudinal de dicho microcanal 1 mientras aún se dejan fluir los fluidos 9;

d) hacer fluir una muestra que comprende potencialmente una o más moléculas diana 3 a través de dicho microcanal 1 que comprende dichos microportadores 2;

e) identificar los conjuntos de microportadores 2; y

f) detectar una reacción entre el ligando y la molécula diana, es decir, realizar una lectura biológica, y correlacionar la presencia o ausencia de una reacción con la identidad de un conjunto específico para inferir la presencia o ausencia de una molécula diana 3 en la muestra. Esto típicamente se correlaciona con la identificación de los microportadores 2.

El microcanal 1, los microportadores 2 y los medios de restricción 4 son preferiblemente los descritos anteriormente. En consecuencia, el experto en la técnica reconocerá que los pasos (a) a (c) del método para realizar ensayos multiplexados descrito en este documento como un segundo aspecto de la invención, forman realmente un dispositivo de ensayo multiplexado del primer aspecto de la invención. Las descripciones de cada uno de estos dos aspectos de la invención pueden por lo tanto entenderse en el contexto del otro aspecto.

Para fines de multiplexación, el microcanal 1 se carga preferiblemente con diferentes conjuntos de microportadores 2, teniendo cada conjunto una funcionalización diferente. Todos los conjuntos están presentes en la cámara de reacción antes de que fluya la muestra y se someten al ensayo simultáneamente. Como se usa más de un conjunto de microportadores funcionalizados 2 y la posición de los microportadores no necesita ser controlada, los diversos conjuntos de microportadores 2 deben ser distinguibles entre sí, es decir, debe haber una manera de determinar la función de los microportadores 2 cuando están en la cámara de reacción 1, independientemente de su posición dentro del microcanal 1. Esto se hace utilizando microportadores 2 codificados en donde el código es indicativo de la función. Ejemplos de códigos fueron descritos anteriormente. Para las técnicas de multiplexación, también es deseable que los microportadores se puedan distinguir y/o identificar incluso en ausencia de una señal producida por un analito, es decir, independientemente de la realización del ensayo (es decir, la técnica no debe basarse en la presencia de analito para revelar a qué conjunto pertenece un microportador) ya que existen realizaciones en las que los conjuntos pueden no revelarse en caso de ausencia de la diana correspondiente, lo que dificulta el control de calidad y también limita significativamente el número de conjuntos diferentes que se pueden usar (es decir, el nivel de multiplexación) porque entonces existe la necesidad de confiar en métodos en los que la reacción debe ser diferenciable para cada conjunto (en el caso de lecturas fluorescentes, esto generalmente se realiza mediante el uso de diferentes fluoróforos, pero el nivel de multiplexación se ve entonces limitado por sus características espectrales y, en la práctica, esto se traduce en un máximo típico de 5 o 6 conjuntos diferentes de microportadores que se pueden usar simultáneamente). Esto se puede lograr mediante el uso de técnicas de codificación físicas. Por ejemplo, los microportadores pueden ser codificados individualmente o producidos de otra manera con un atributo que es distintivo en la observación, tal como el código o atributo que es indicativo de la función.

En una realización, los microportadores 2 tienen la forma de una oblea y la sección transversal del microcanal (1) es rectangular.

En una realización preferida de los ejemplos de códigos descritos anteriormente en la descripción del primer aspecto, los microportadores 2 del método tienen una forma similar a un disco y, aún más preferiblemente, tienen un código que comprende orificios horadados 21, que también incluyen preferiblemente una marca de orientación 20. Por consiguiente, el microcanal 1 tiene preferiblemente una forma plana con una sección transversal rectangular y los microportadores 2 están dispuestos en una monocapa dentro del microcanal 1 (como en la figura 6).

El paso (b) se puede lograr haciendo fluir un fluido <[1]> 9 que comprende microportadores 2 en suspensión a través de una entrada 5 que se conecta a la entrada 14 del canal de microfluido 1, preferiblemente a través de una sección ampliada 6. Como se explicó anteriormente, la implementación práctica de esta etapa se ve facilitada por el hecho de que la sección transversal del microcanal 1 es tal que al menos dos microportadores puedan estar uno al lado del otro en el canal de microfluido 1 en toda su longitud. El paso (b) también puede ir acompañado de un golpeteo del dispositivo de ensayo que comprende el microcanal. Esto facilitaría el hecho de que los microportadores puedan pasarse entre sí, según lo permita la geometría de la configuración, en el caso de que un microportador sea bloqueado por un obstáculo.

Para el paso (b), es preferible permitir que se coloquen más que solo dos microportadores uno al lado del otro sin tocar las paredes del microcanal. En tal realización, la forma y tamaño de los microportadores 2 en relación a la sección transversal del microcanal 1 permite tener, en toda la longitud del microcanal 1, al menos tres de cualquiera de los microportadores 2 situados uno al lado del otro.

Por lo general, el permitir de 3 (tres) a 50 (cincuenta) microportadores uno al lado del otro facilitaría la preparación de la configuración, ya que permite reducir los riesgos de obstrucción de la entrada del microcanal y también lidiar con obstáculos o escombros que puedan estar en el microcanal.

El paso (c) se implementa mediante el uso de un medio de restricción como se describe en la descripción de los medios de restricción anterior. Los microportadores 2 tienen su movimiento en dirección longitudinal restringido o están inmovilizados dentro del microcanal 1 mientras aún se permite que los fluidos fluyan.

En el paso (d), la muestra que posiblemente comprende la(s) molécula(s) de interés se desplaza a través del microcanal 1 y, de este modo, entra en contacto cercano con los microportadores 2. Esto se puede hacer usando varias técnicas que incluyen presión, potencial eléctrico (flujo electro-osmótico), capilaridad, gravedad o fuerzas centrífugas. En una realización preferida, el microcanal 1 está conectado en un extremo a una o más entradas 5 (como se explicó anteriormente) y en el otro extremo a una o más salidas, lo que permite que los fluidos se muevan aplicando un diferencial de presión entre la una o más entradas y la una o más salidas, creando así un flujo impulsado por presión (PDF). Se pueden aplicar presiones positivas y/o negativas (succión) a una o más entradas y/o salidas mediante el uso de mecanismos de bombeo o neumáticos. Así, en una realización, los fluidos 9 se mueven aplicando una presión positiva en una entrada conectada al microcanal y/o una presión negativa (succión) en una salida conectada al microcanal. Los fluidos 9 pueden fluir de manera continua o en forma de parada de flujo (es decir, una secuencia de fluidos en movimiento 9 y fluidos estáticos 9 en el microcanal).

La velocidad a la que debe fluir la muestra 9 y, por lo tanto, el momento en que una molécula de interés pasa cerca de un microportador 2, puede optimizarse en función de la velocidad de difusión de las moléculas diana 3 y la concentración de microportadores 2 recubiertos con receptores 10 para la molécula diana 3.

Dado que los microportadores 2 tienen su movimiento longitudinal restringido en la cámara de reacción, es fácil realizar pasos de ensayo adicionales, si es necesario. Esto se puede hacer simplemente haciendo fluir varios fluidos 9 de forma secuencial o simultánea, por ejemplo, para realizar un lavado o adición de nuevos reactivos, sin requerir ninguna manipulación particular de los microportadores 2.

En una realización, la muestra 9 se mueve hacia atrás y hacia adelante dentro del microcanal 1. Preferiblemente, este movimiento está optimizado para ocurrir en una distancia correspondiente a la distancia promedio entre dos microportadores 2 que tienen ligandos 10 para la misma molécula diana 3. Una realización en donde la muestra 9 se mueve hacia adelante y hacia atrás puede lograrse utilizando medios de detención 4 basados en fuerzas que actúan sobre las micropartículas 2 (tales como las fuerzas magnéticas) o utilizando medios de detención 4 "activables" cerca de la entrada 14 del microcanal 1 (tal como la compresión de una parte del microcanal 1) para permitir la introducción de los microportadores 2 antes de activar los medios de detención 4.

En una realización adicional, la muestra 9 se recircula a lo largo de todo el microcanal 1 proporcionando una conexión fluida desde la salida a la entrada y un medio para activar los fluidos, tales como una bomba peristáltica.

La recirculación o el movimiento hacia adelante y hacia atrás de la muestra 9 es útil en situaciones en donde es difícil controlar la velocidad de la muestra 9 y/o en el caso de muestras 9 muy diluidas.

El paso de identificación (e) se puede realizar antes, durante o después del flujo de la muestra (paso d). También se puede realizar simultáneamente con o después de la detección de la reacción (paso f), en particular cuando los microportadores 2 son identificables independientemente de la realización del ensayo, por ejemplo, combinando los métodos que se utilizan para ambos objetivos, por ejemplo mediante el uso de métodos ópticos similares, tales como la captura y el análisis de imágenes, tanto para identificar los conjuntos como para detectar las reacciones. La identificación se logra utilizando microportadores 2 codificados como ya se describió anteriormente en varios pasajes. Aunque su posición en el microcanal 1 no está controlada, los diferentes conjuntos de microportadores 2 de la invención pueden identificarse y/o distinguirse cuando se encuentran en el microcanal 1 basado en características intrínsecas que no necesitan ser reveladas por la presencia de moléculas diana, es decir, independientemente de la realización del ensayo e independientemente de su posición dentro del microcanal 1, por ejemplo, mediante un código en forma de orificios o por la forma de los microportadores.

El paso de detección (f) se puede realizar durante el flujo de la muestra (paso d) para obtener información cinética sobre el progreso de la reacción a medida que avanza el ensayo o después del paso (d) para la lectura de punto final. También es posible realizar la identificación de los diversos conjuntos antes del flujo de la muestra (etapa d). La etapa de detección puede, por ejemplo, implicar la observación de los microportadores (por ejemplo, detección óptica) o la identificación de los microportadores (por ejemplo, detección magnética), uno por uno o varios simultáneamente, por ejemplo, mediante técnicas de observación de campo amplio. Los microportadores 2 del método divulgado en este documento son preferiblemente los microportadores 2 descritos anteriormente.

Además de realizar el ensayo, se realiza una lectura biológica para determinar qué microportadores 2 han reaccionado y, opcionalmente, en qué grado (véase el paso f). En una realización preferida, el microcanal 1 está diseñado para permitir la observación de los microportadores 2 directamente dentro del microcanal 1 permitiendo que las señales observables atraviesen al menos un lado en la parte que contiene los microportadores 2. En una realización muy

preferida, el microcanal 1 es transparente en al menos un lado y en una porción para permitir la observación óptica. Alternativa o adicionalmente, el microcanal 1 también puede ser permeable a campos magnéticos o radiación electromagnética y permitir que la detección magnética o electromagnética de los microportadores identifique los diversos conjuntos y/o realice una lectura biológica (por ejemplo, utilizando etiquetas magnéticas).

En una realización preferida, los microportadores 2 tienen una disposición de monocapa y el microcanal 1 es transparente en al menos un lado permitiendo la observación óptica directa simple de todos los microportadores 1 individualmente. Si los microportadores no están en una disposición de monocapa, se pueden usar técnicas ópticas confocales más complejas siempre que los microportadores sean (semi) transparentes.

La lectura biológica se realiza típicamente generando una señal observable, preferiblemente una señal observable ópticamente, cuando se produce la unión, por ejemplo, por una respuesta luminométrica o una respuesta magnética u otro tipo de emisión electromagnética, típicamente utilizando una molécula marcada complementaria. La reacción se puede indicar mediante una emisión colorimétrica, quimioluminométrica, de puntos cuánticos y/o una respuesta fluorométrica. La lectura biológica también puede proporcionar información cuantitativa (es decir, información sobre la cantidad de analito presente en la muestra) al medir la intensidad de la señal generada por la reacción. Dado que se usan varios conjuntos de microportadores en una cámara de reacción, es necesario que el mecanismo de generación de señal se coloque en el microportador y no se libere en la mayor parte de la solución. Normalmente, la reacción se revela utilizando una molécula complementaria que se une al complejo formado por el ligando y la molécula diana (si esta última está presente en la muestra). Alternativamente, podemos tener un complejo que comprende un fluoróforo y un extintor unidos a la superficie del microportador y una reacción que está diseñada para escindir el extintor mientras deja el fluoróforo atado a la superficie, por lo tanto generando una señal en la superficie del microportador. La lectura biológica también puede involucrar técnicas de detección sin etiquetas, conocidas en la técnica, por ejemplo, Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR) o métodos eléctricos (por ejemplo, cambios en la conductividad).

Como se ilustra en la figura 5, un método preferido consiste en preparar una configuración en donde los microportadores 2 estén en una disposición de monocapa y colocar un sensor, preferiblemente un sensor óptico, para observar los microportadores 2 directamente en el área donde ocurre la reacción, es decir, dentro de la cámara de reacción 1, preferiblemente sin mover los microportadores 2. El sensor podría ser un sensor de campo amplio que observe/detecte varios microportadores 2 a la vez (por ejemplo, una matriz de sensores fotoeléctricos CCD o CMOS acoplada con los medios ópticos necesarios, tales como lentes y objetivos para formar una configuración similar a un microscopio) o un sensor de campo estrecho (por ejemplo, un fotodiodo, un fotomultiplicador o un escáner confocal, o un sensor magnético) que observe/detecte un microportador de uno en uno. Para los sensores ópticos, el microcanal 1 debe ser transparente en al menos el lado desde el cual se observan los microportadores. Preferiblemente, se utiliza un sensor de campo amplio para "capturar" una imagen o una serie de imágenes de los microportadores 2 dentro de la cámara de reacción 1 y revelar las reacciones a través del procesamiento de imágenes. Esta técnica se puede combinar con la detección de los códigos para identificar los conjuntos de microportadores siempre que el mecanismo de codificación se base en el contraste óptico que se puede detectar con una óptica similar (por ejemplo, utilizando un mecanismo de codificación basado en orificios horadados). También se puede usar un sensor de campo estrecho, pero se debe mover para pasar por todos los microportadores 2 y generar una señal que se pueda analizar para revelar las reacciones. Como la posición de los microportadores 2 es relativamente libre dentro del microcanal 1, el sensor de campo estrecho se puede usar de una manera en la que se construye una imagen escaneando la cámara de reacción 1. Alternativamente, se pueden usar varios sensores de campo estrecho para observar varias zonas del microcanal 1 simultáneamente. También es posible combinar el uso de un sensor de campo ancho para la identificación de los microportadores 2 junto con un sensor de campo estrecho para la detección de la reacción.

En las realizaciones donde los microportadores 2 se observan directamente en la cámara de reacción 1, los medios de detención 4 no necesitan retirarse y los microportadores 2 no necesitan liberarse para fines de detección; sin embargo, el microcanal 1 es preferiblemente trasparente al menos en un lado y/o al menos en una porción lo que permite la observación óptica de los microportadores 2. Esta realización también permite la lectura cinética de la reacción. De hecho, es posible observar las indicaciones biológicas a medida que avanza el ensayo y, por lo tanto, obtener información en tiempo sobre la cinética de la reacción (véase la figura 9). Alternativamente a los sensores ópticos, otros tipos de sensores, tales como sensores magnéticos o sensores espectrométricos también podrían usarse, si el ensayo está diseñado para cambiar la firma magnética o el espectro de emisión de los microportadores 2 cuando ocurre una reacción. Esto se puede lograr, por ejemplo, utilizando "etiquetas magnéticas" unidas a anticuerpos complementarios de la misma manera que se usan las etiquetas fluorescentes.

Otra alternativa consiste en liberar o mover, al final del ensayo, los microportadores 2 a través de otra porción del microcanal 1 (una parte de observación o ventana) y leer las señales biológicas a medida que pasan, similar a lo que se hace en la *Clasificación de células por Activación Fluorescente* [FACS] o, alternativamente, recuperar los microportadores 2 a través de un pozo de salida y colocarlos en otro dispositivo para observación, por ejemplo, en un portaobjetos de microscopio colocado en un microscopio de fluorescencia. Este método permite solo la lectura biológica de punto final, pero no permite la lectura cinética. De nuevo, aquí se puede usar un sensor de campo amplio (tal como una matriz de sensores fotoeléctricos CCD o C-MOS) o un sensor de campo estrecho (tal como un fotodiodo). Esto también se puede combinar con la detección del código para identificar los conjuntos de microportadores 2. Para

dicho propósito, la restricción del movimiento longitudinal debe eliminarse como se explicó anteriormente, por ejemplo, eliminando los medios de detención 4 o eliminando el campo magnético.

En el paso (f), la observación de la lectura biológica se correlaciona con la identidad de un microportador 2 como se observa en el paso (e). Esta correlación de dos observaciones (es decir, la observación de la identidad y la observación de la señal biológica) puede realizarse, por ejemplo, combinando las dos observaciones en una (es decir, utilizando una misma señal o una misma imagen óptica) o utilizando la posición de los microportadores para correlacionar las dos observaciones (es decir, mediante el uso de dos señales o imágenes ópticas que corresponden a la misma posición espacial donde está presente el microportador 2). La disposición estática de los microportadores 2 facilita esta correlación ya que las dos observaciones se pueden separar en el tiempo, por ejemplo, cuando se realiza la etapa de identificación (e) antes de fluir la muestra (etapa d). En una realización preferida, el paso de identificación (e) se realiza esencialmente simultáneamente con el paso de lectura biológica (f) para asegurar que cualquier movimiento involuntario de los microportadores 2 no impida correlacionar la identidad de los microportadores 2 con su señal biológica. Esto se puede lograr, por ejemplo, tomando dos imágenes con una cámara CCD o C-MOS simultáneamente o en un período muy corto de tiempo después o durante el flujo de la muestra (etapa d). La primera imagen, típicamente una imagen de campo brillante, se usa para identificar los microportadores 2, mientras que la segunda imagen, típicamente una imagen fluorescente, se usa para realizar la lectura biológica. Alternativamente, la identificación y la lectura biológica pueden basarse en una observación única (por ejemplo, una misma imagen). Lo último es aplicable a las realizaciones donde los microportadores 2 se liberan en un área de observación y se observan a medida que pasan.

Microprocesador

En otro aspecto, la invención proporciona un microprocesador 13 para la multiplexación. Dicho microprocesador 13 comprende el dispositivo de ensayo descrito en el primer aspecto de la invención. Un microprocesador de ejemplo 13 se muestra en la figura 11. Dicho microprocesador 13 puede usarse, por ejemplo, para fines de diagnóstico. En una realización muy preferida, los microportadores 2 pueden observarse sin la necesidad de liberar los microportadores 2 del microcanal 1.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se fabricó una configuración que contenía un microcanal conectado a un pozo de entrada y a un pozo de salida y que comprendía una estructura de filtro así como pilares centrales estabilizadores (véase la figura 17) usando técnicas de moldeo de PDMS y se unió a un portaobjetos de microscopio (como se describe en Fundamentals and Applications of Microfluidics por Nam-Trung Nguyen y Steve Wereley, ISBN: 9781580533430, capítulo 3).

Se produjeron microportadores de silicio con forma de disco con un patrón de orificios horadados en la periferia (para servir como código). Esto se hizo en un ambiente de sala limpia usando técnicas de microfabricación basadas en obleas que permiten producir varios millones de microportadores con un diámetro de 50 micrómetros y un espesor de 10 micrómetros. El flujo del proceso se componía de los siguientes pasos:

1) Proporcionar una oblea SOI (silicona-en-aislamiento) (10,2 cm (4 pulgadas) de diámetro, 380 µm de espesor de sustrato de oblea, 1 µm de grosor de BOX, 10 µm de la capa del dispositivo);

2) Delinear la forma de los microportadores y su código (véase la figura 18) utilizando técnicas tradicionales de fotolitografía (recubrimiento por rotación de una resistencia protectora fotosensible, iluminación UV a través de una máscara, revelado, grabado del silicio de la capa del dispositivo a través de todo, y finalmente eliminación de la resistencia);

3) Preparar el despegue de los microportadores mediante el despegue de la capa BOX de la oblea;

4) Depositar una capa de óxido de un espesor de aproximadamente 110 nm por PECVD (deposición química de vapor mejorada por plasma) en la parte superior de los microportadores. Esta capa es necesaria para garantizar una señal fluorescente adecuada en las partículas de silicio (Bras, M., et al., Optimisation of a silicon/silicon dioxide for a fluorescence DNA microarray. Biosensors & bioelectronics, 2004. 20(4): páginas 797-806; Volle, J.N., et al., Enhanced sensitivity detection of protein immobiization by fluorescent interference on oxidized silicon. Biosensors and Bioelectronics, 2003. 19(5): páginas 457-464);

5) Liberar los microportadores del sustrato sumergiendo la oblea en una solución líquida, tal como acetona, con sonicación.

Este procedimiento se repitió para producir dos conjuntos de microportadores con varios códigos diferentes.

Aproximadamente 300,000 microportadores de cada código se funcionalizaron después con aminas primarias en la superficie por reacción con (3-aminopropil)trietoxisilano al 10% v/v en 1 ml de acetona a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Los microportadores se sedimentaron y se resuspendieron en 1 ml de tampón de borato 10 mM,

y NaCl 150 mM, pH 8,2, que contenía 0,1% de Tween-20 (BBST). Los grupos amino en la superficie de los microportadores se activaron al agregar 800 µL de glutaraldehído al 10% v/v en BBST. Los microportadores se agitaron en esta solución a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la etapa de activación, los microportadores se lavaron en 1 ml de BBST 3 veces.

Después de eso, se recubrieron dos conjuntos de microportadores con sondas biológicas P1 (5' - CAA CCC CAG CTA ATA TTA TT - 3') y P2 (5′ - TGG GTA AGT TAG GGC GAT GG - 3'), respectivamente, al agregar una solución de oligonucleótido (P1 o P2) modificado con amino (5'-o 3'-) 500 nM en BBST. Los microportadores se agitaron entonces en esta solución a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de los pasos de lavado como se describió anteriormente con BBST, los grupos funcionales que no reaccionaron se bloquearon mediante reacción con glicina 35 mM en BBST a temperatura ambiente durante 15 minutos. Los microportadores se lavaron con BBST dos veces y luego se almacenaron en el mismo tampón.

Se preparó una suspensión de mezcla maestra de los dos conjuntos de microportadores mezclando a conciencia 10 µl de la suspensión de microportadores de cada conjunto preparada anteriormente. La mezcla de los dos conjuntos de microportadores funcionalizados se cargó luego en el microcanal pipeteando la suspensión de mezcla maestra en la entrada y aplicando presión negativa en la salida para aspirar la suspensión de mezcla maestra de microportadores en el microcanal. El microcanal de PDMS se preparó previamente con etanol para mejorar el comportamiento hidrófilo.

Se preparó una solución de muestra de las dianas T1 (5' Cy5-AAT AAT ATT AGC TGG GGT TG - 3') complementaria con P1 proporcionando una solución de oligonucleótido T1, 200 nM, marcado con fluoróforo Cy5 en el extremo 5' en 5 × SSPE (que contenía tampón fosfato 125 mM, NaCl 745 mM, y EDTA 5 mM pH 7,4).

Después de eliminar cualquier exceso de solución del pozo de entrada, esta solución de muestra se agregó al pozo de entrada y se lavó a presión través del canal a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de lavar la secuencia diana T1, el exceso de solución se eliminó del pozo de entrada y los microportadores se lavaron con lavado a presión 2 × SSC (citrato de sodio 15 mM, NaCl 150 mM, pH 7) a temperatura ambiente durante 1 minuto. La señal de fluorescencia en los dos conjuntos de microportadores se observó, a través de la capa de vidrio, en un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axiovert 135) con el conjunto de filtros Cy5. La figura 8 muestra los resultados del experimento como se capturó por una cámara CCD enfriada (cámara ORCA C4742-80-12AG de Hamamatsu).

Si bien se muestran y describen las realizaciones actualmente preferidas y los ejemplos de la invención, debe entenderse claramente que la invención no se limita a ellos, sino que puede realizarse de otra manera y practicarse de manera diversa dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de ensayo que comprende una cámara de reacción y al menos dos conjuntos de microportadores (2) codificados individualmente

en donde los al menos dos conjuntos de microportadores tienen una funcionalidad diferente,

en donde la cámara de reacción es un microcanal (1); y

en donde los microportadores (2) tienen una forma relacionada con la sección transversal del microcanal (1) que permite tener, en toda la longitud del microcanal (1), al menos dos de cualquiera de los microportadores (2) dispuestos uno al lado del otro sin tocarse y sin tocar el perímetro del microcanal (1) de manera que los microportadores que se estén moviendo en la dirección longitudinal del canal a velocidades diferentes serían capaces de pasarse el uno al otro hasta el punto en que su movimiento longitudinal está restringido, los dos o más microportadores (i) están en una configuración tal que los dos o más microportadores encajan dentro del microcanal y (ii) interseccionan la sección transversal en esa posición dada e (iii) sus superficies proyectadas a lo largo de la dirección longitudinal, en esa posición dada, no se superponen y están adjuntas en la superficie de la sección transversal, en esa posición dada; y

en donde el dispositivo (1) comprende un medio (4) para restringir el movimiento de los microportadores (2) en la dirección longitudinal del microcanal (1) mientras se deja que fluyan los fluidos a través de él; y

en donde el código de los microportadores es indicativo de su función.

2. El dispositivo de ensayo de la reivindicación 1, en donde el microcanal (1) es transparente al menos en un lado y/o al menos en una parte lo que permite la observación óptica de los microportadores (2).

3. El dispositivo de ensayo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la sección transversal del microcanal (1) es rectangular o casi rectangular.

4. El dispositivo de ensayo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los microportadores (2) tienen una forma relacionada con la sección transversal del microcanal (1) que permite tener, en toda la longitud del microcanal (1), al menos tres de cualquiera de los microportadores (2) dispuestos uno al lado del otro sin tocarse entre sí y sin tocar el perímetro del microcanal (1).

5. El dispositivo de ensayo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los microportadores (2) están restringidos a una configuración de monocapa dentro del microcanal (1).

6. El dispositivo de ensayo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los microportadores (2) tienen la forma de una oblea.

7. El dispositivo de ensayo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los microportadores (2) tienen un código en la forma de una configuración de orificios horadados (21).

8. El dispositivo de ensayo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los medios (4) para restringir el movimiento de los microportadores (2) son una construcción de vertedero, uno o más pilares, una reducción de la sección transversal del microcanal, una rejilla, un filtro de malla, una o más micropartículas retenidas usando fuerzas dielectroforéticas, o una o más micropartículas magnéticas retenidas en un campo magnético.

9. El dispositivo de ensayo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los microportadores (2) se inmovilizan a través de un campo magnético o mediante el uso de fuerzas dielectroforéticas.

10. El dispositivo de ensayo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el movimiento de rotación de los microportadores (2) dentro del microcanal (1) está restringido en al menos una dirección por la forma de los microportadores (2) con relación a la sección transversal del microcanal (1).

11. Un método para realizar un ensayo multiplexado basado en microportadores que comprende los pasos de

a) proporcionar un dispositivo de ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10;

b) llenar al menos parcialmente dicho microcanal (1) con dichos al menos dos conjuntos de microportadores codificados (2);

c) restringir el movimiento de dichos microportadores (2) en la dirección longitudinal del microcanal (1) mientras se permite que fluyan los fluidos;

d) hacer fluir una muestra (9) a través de dicho microcanal (1) que comprende dichos microportadores (2);

e) identificar los conjuntos de microportadores (2); y

f) realizar una lectura biológica en correlación con la identidad de los microportadores (2).

12. El método según la reivindicación 11, en donde el paso (e) se realiza observando los microportadores (2) directamente en la cámara de reacción (1).

13. El método según la reivindicación 11 o 12, en donde el paso (f) se realiza simultáneamente con el paso (d) y proporciona resultados a lo largo del tiempo.

14. El método según la reivindicación 11 o 12, en donde el microcanal (1) es trasparente en al menos un lado y al menos una porción, y el paso (f) se realiza usando una matriz de sensores ópticos acoplada con medios ópticos, en donde el sensor es un foto-sensor CCD o C-MOS.

15. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en donde los microportadores (2) tienen una forma relacionada con la sección transversal del microcanal (1) que restringe su movimiento de rotación.

16. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en donde el paso (e) se realiza antes del paso (d) y/o simultáneamente con el paso (f).

17. Un microprocesador para ensayos multiplexados que comprende al menos un dispositivo de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

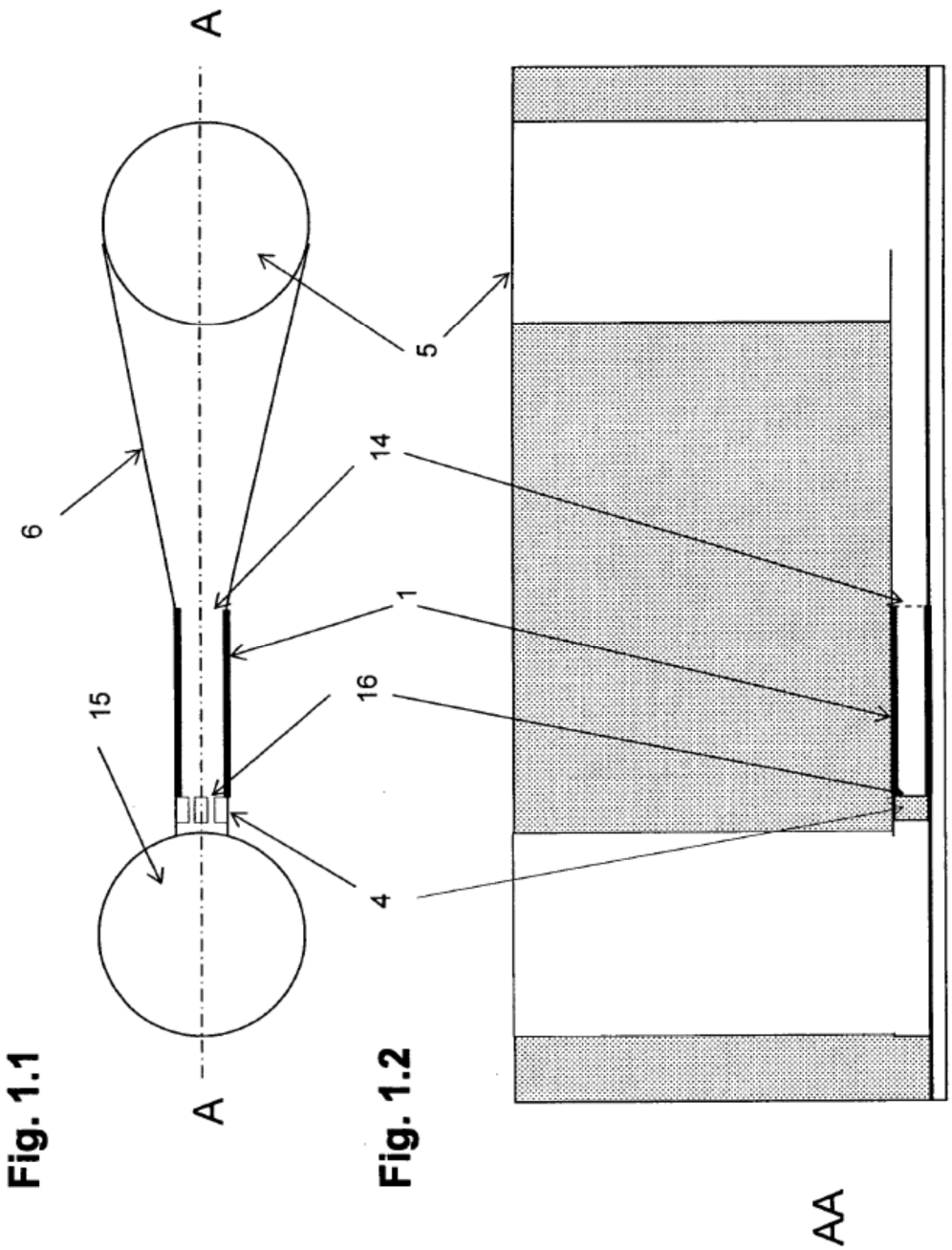


Fig. 1.1

Fig. 1.2

Fig. 1

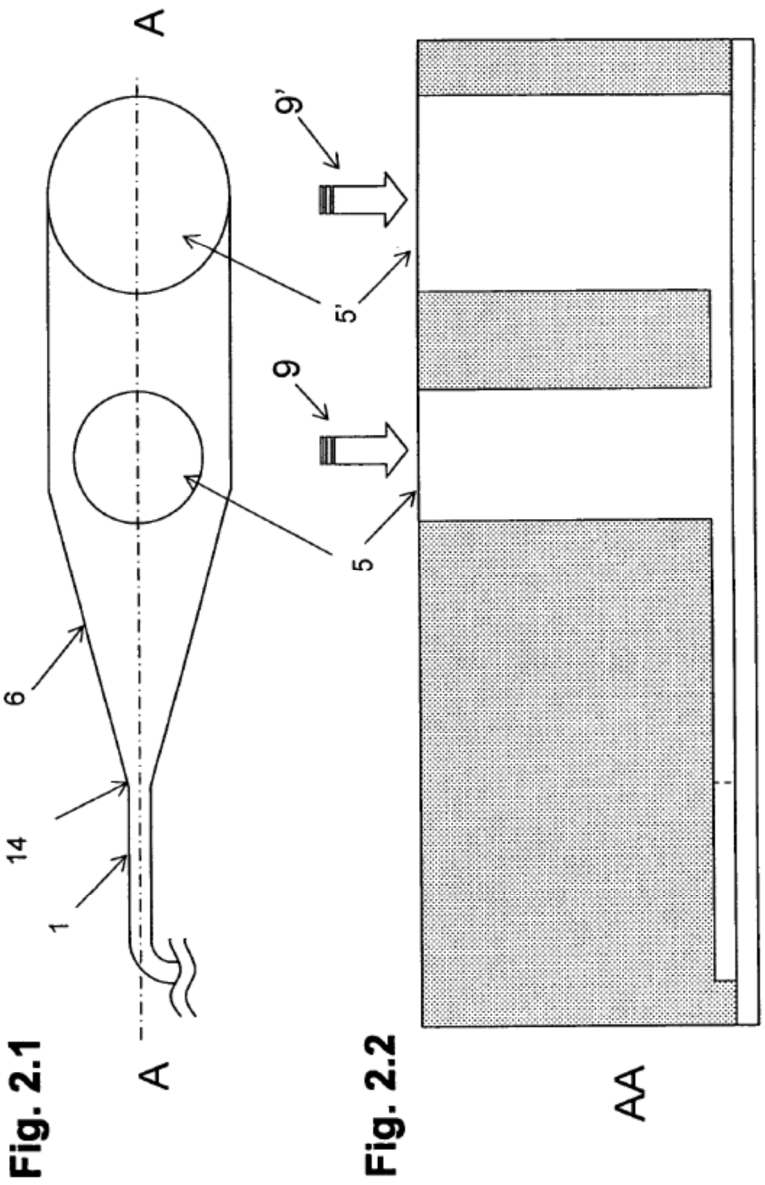


Fig. 2.1

Fig. 2.2

Fig. 2

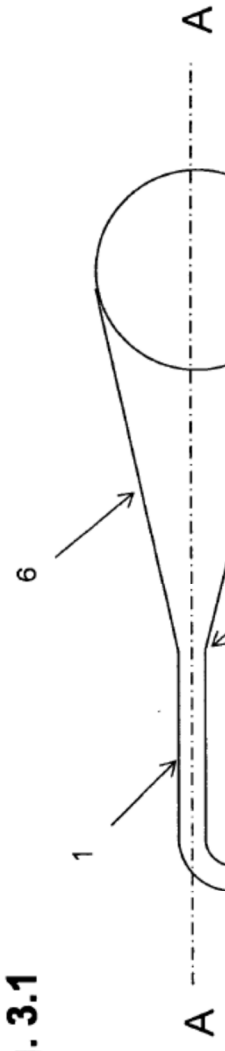


Fig. 3.1

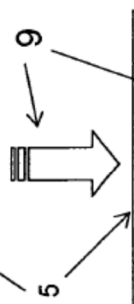


Fig. 3.2

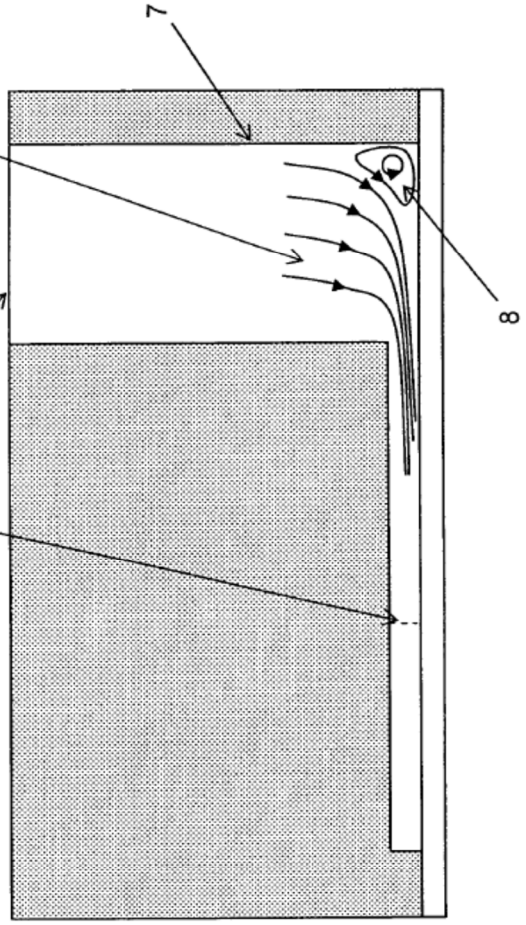


Fig. 3

Fig. 4

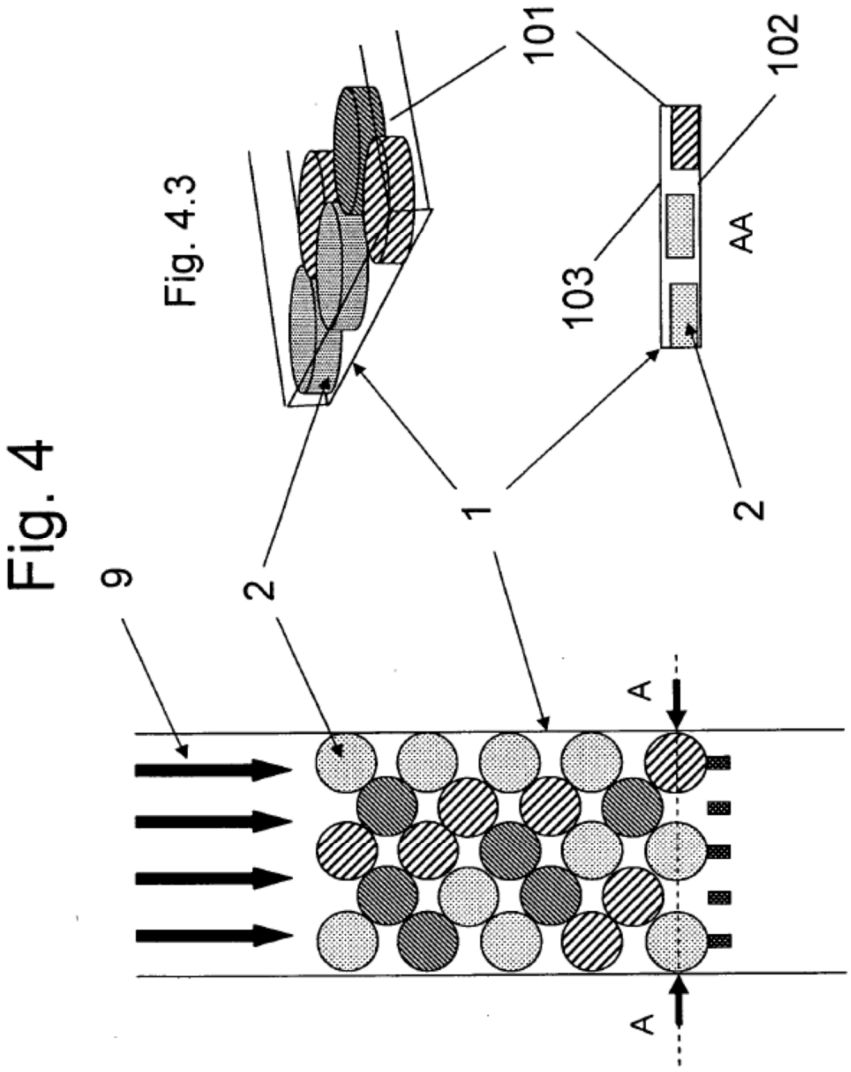


Fig. 5

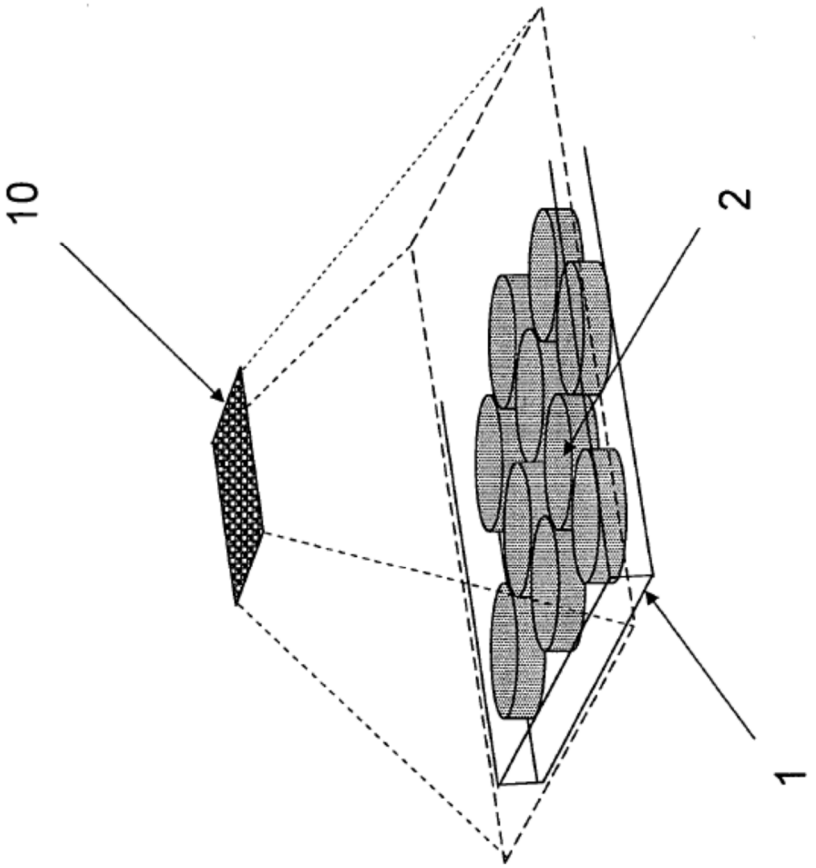


Fig. 6

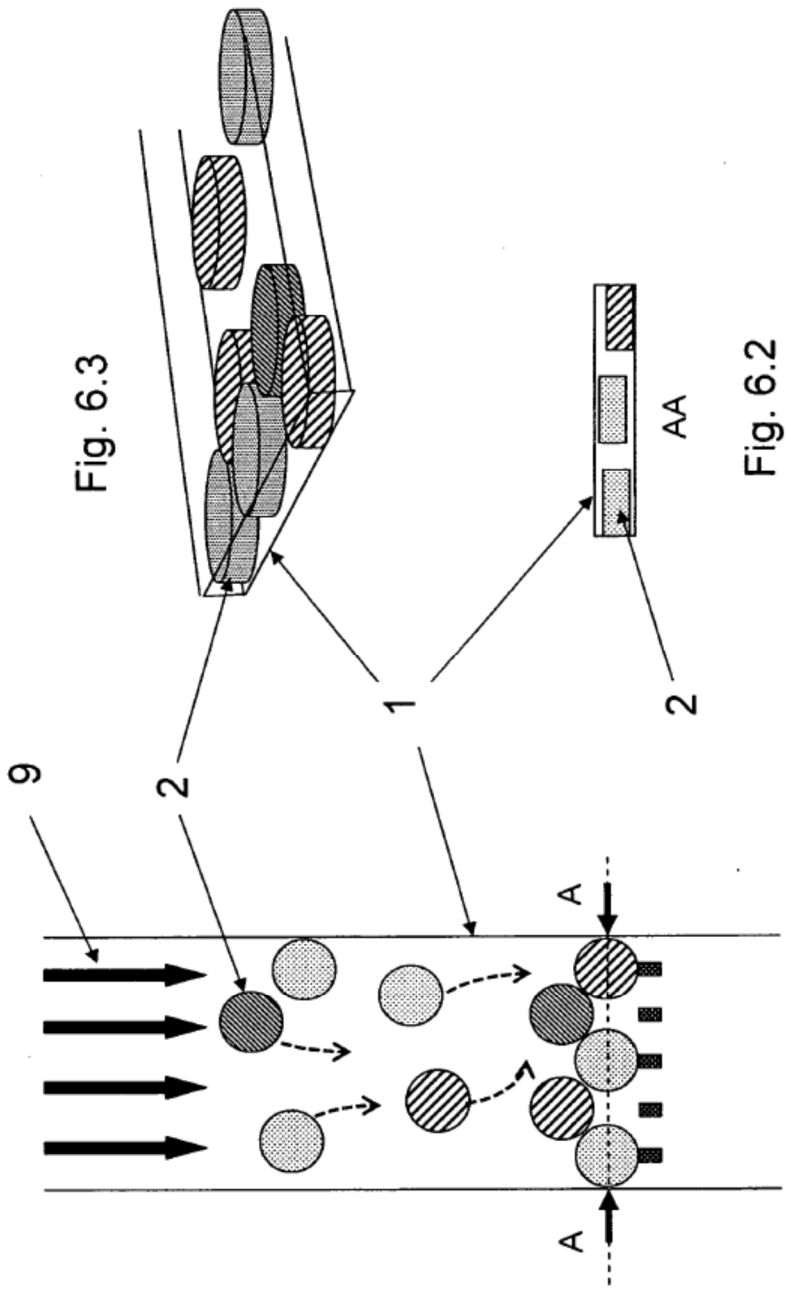


Fig. 6.1

Fig. 6.2

Fig. 6.3

Fig. 7

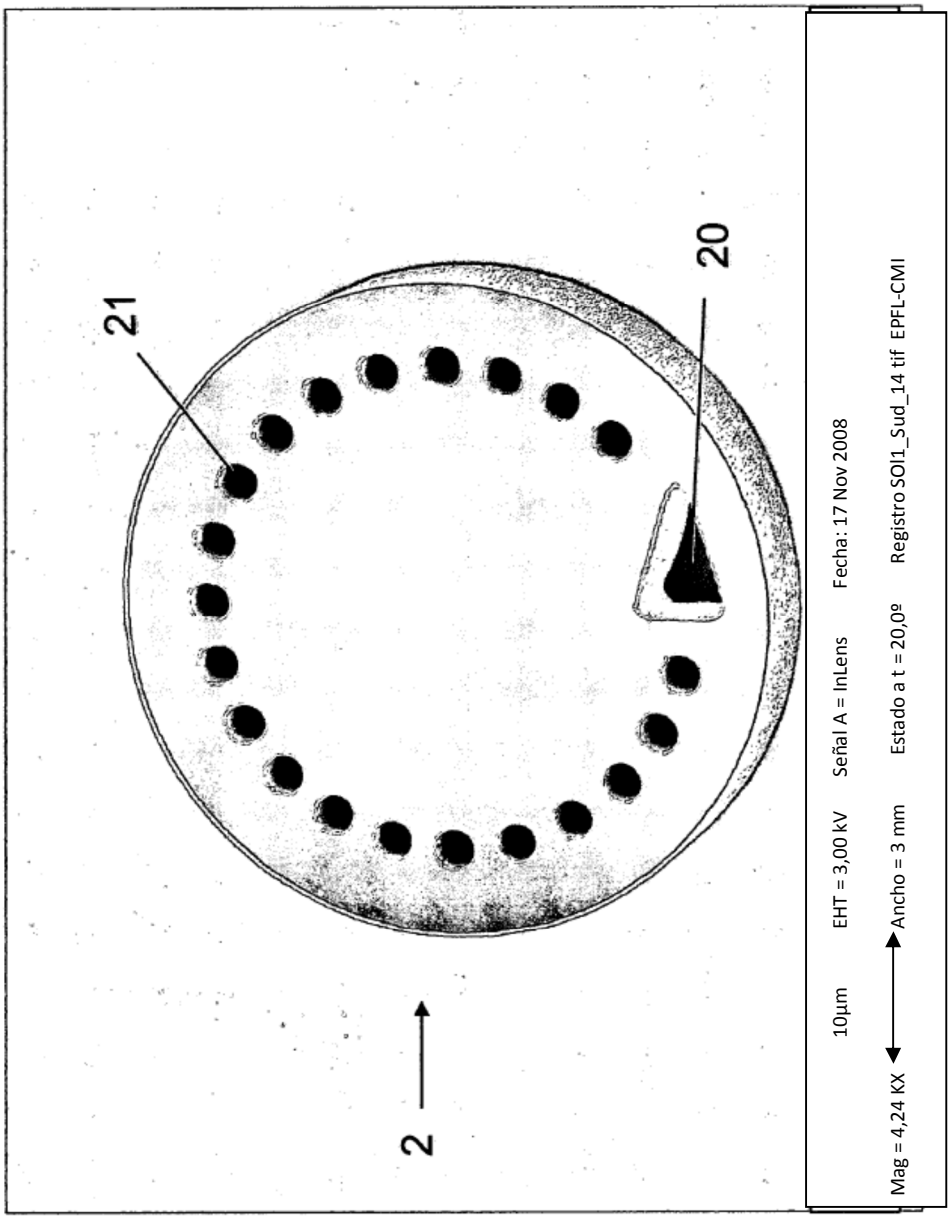

21
20
2
10µm
EHT = 3,00 kV
Señal A = InLens
Fecha: 17 Nov 2008
Mag = 4,24 KX
Ancho = 3 mm
Estado a t = 20,0º
Registro SOI1_Sud_14 tif EPFL-CMI

Fig. 8

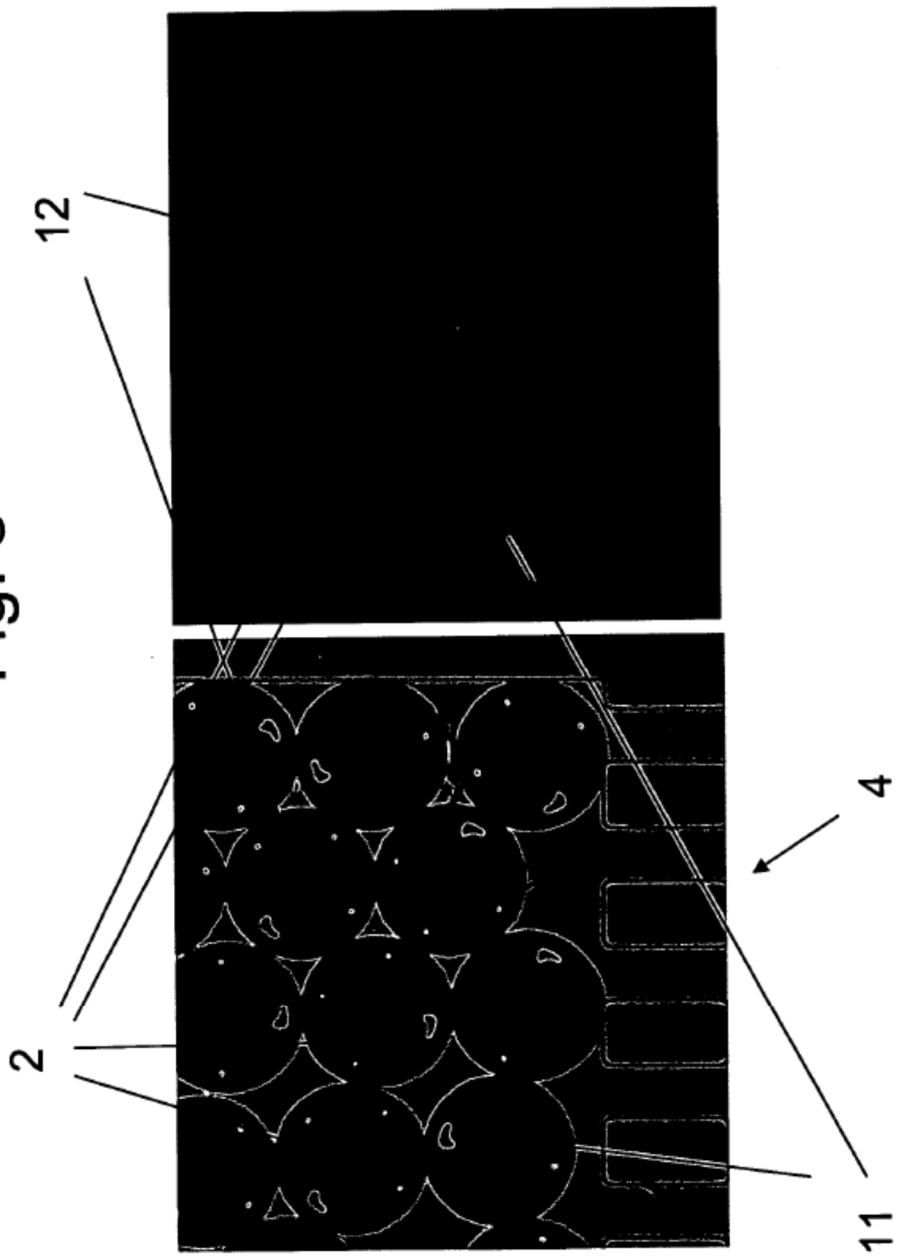


Fig. 9

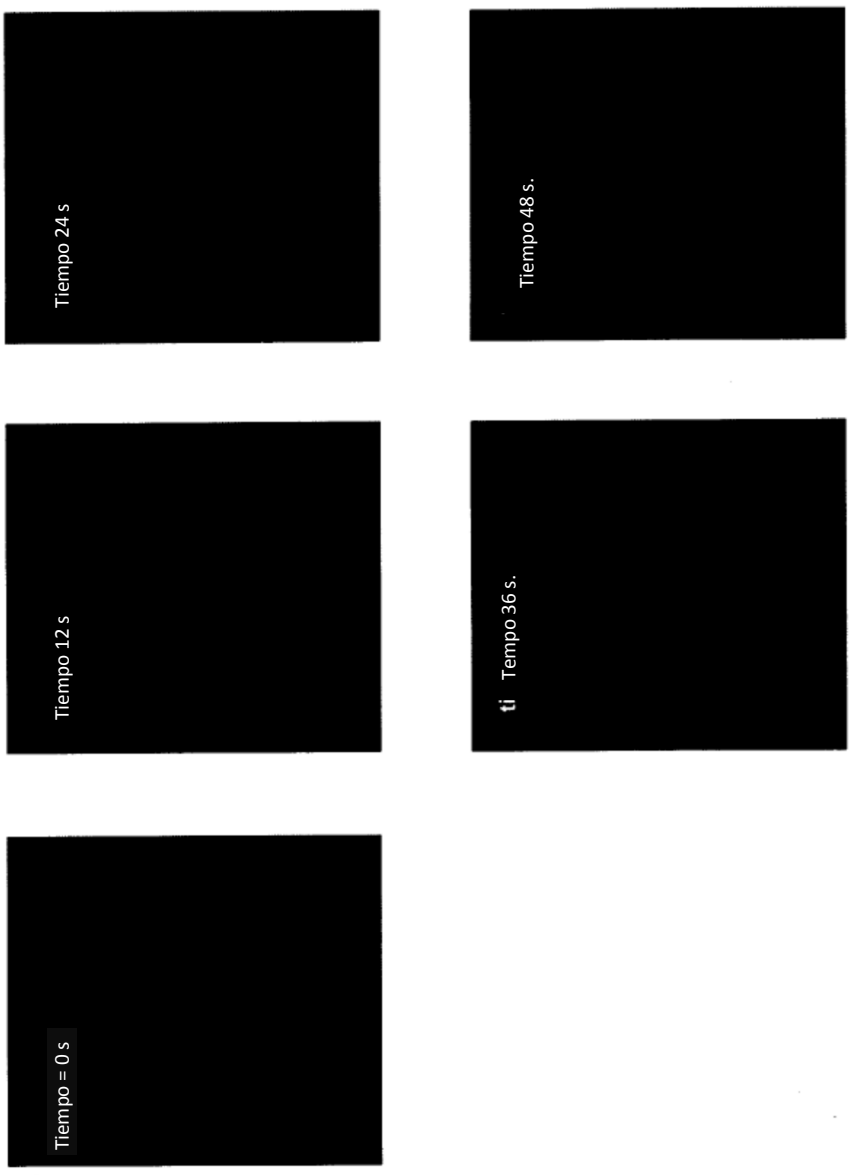


Fig. 10

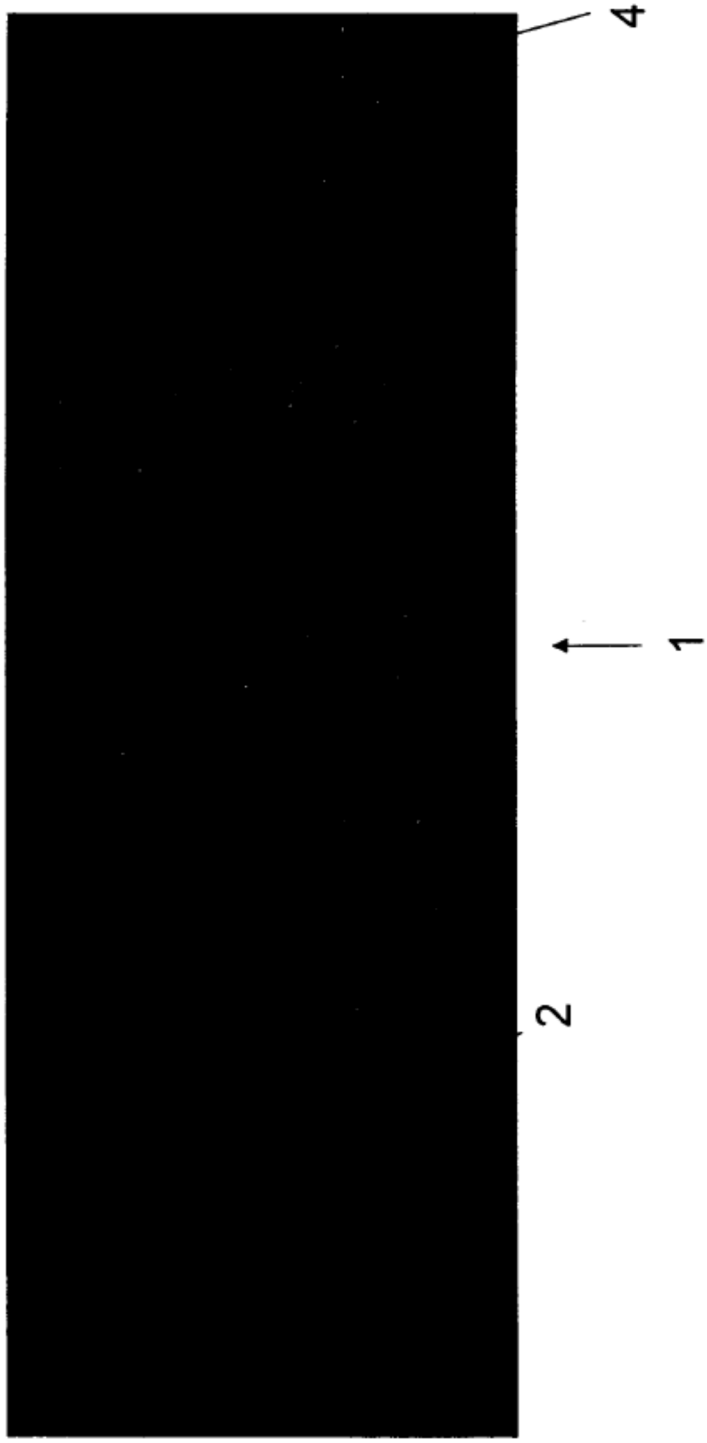


Fig. 11

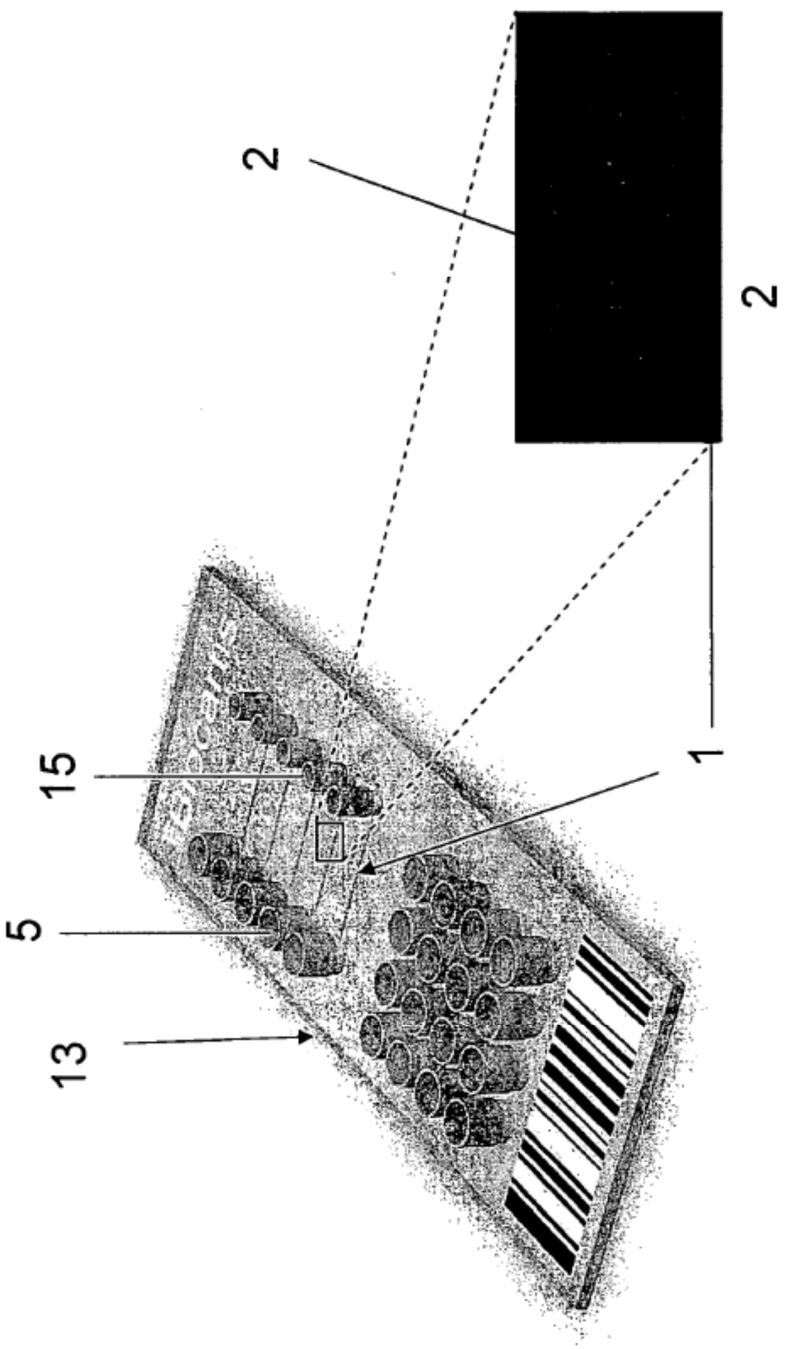


Fig. 12

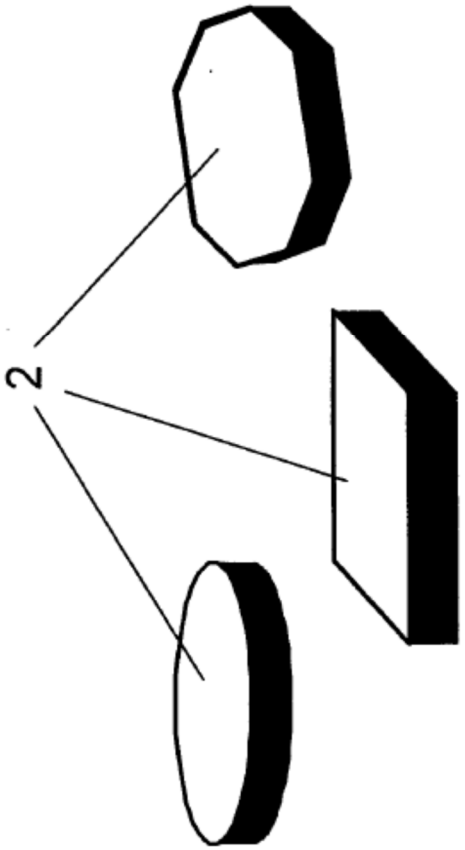


Fig. 13

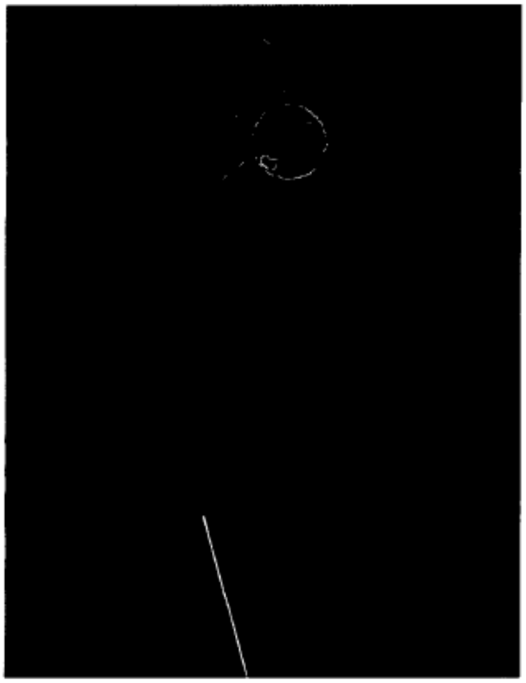


Fig. 13.2

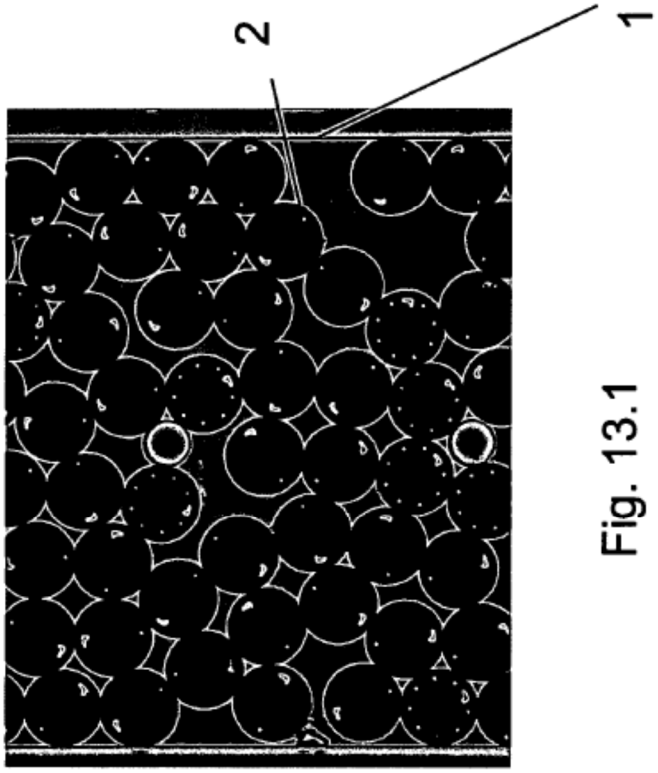


Fig. 13.1

Fig. 14

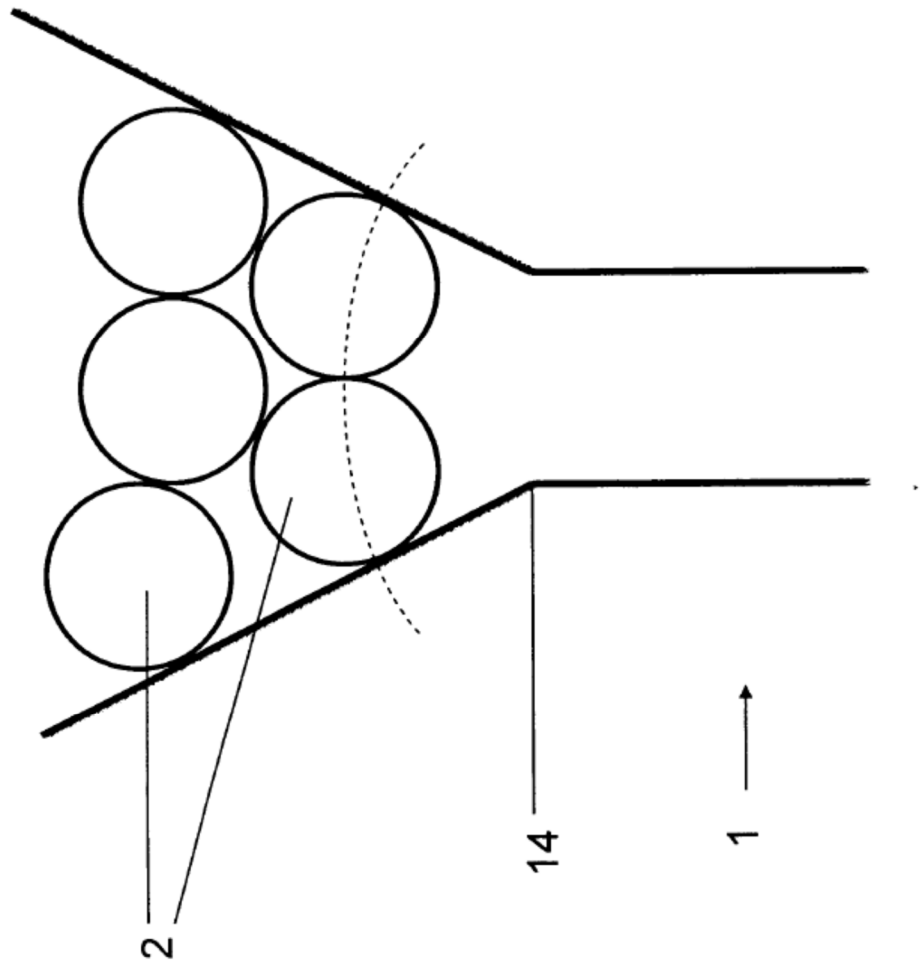


Fig. 15

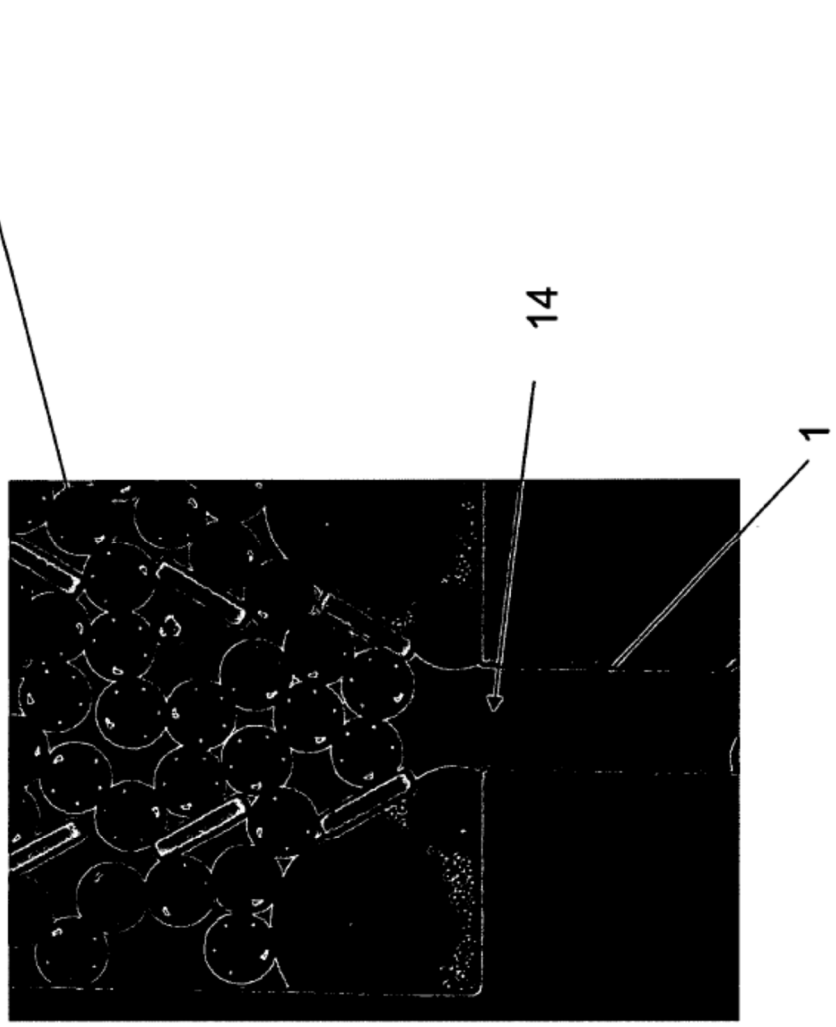


Fig. 16

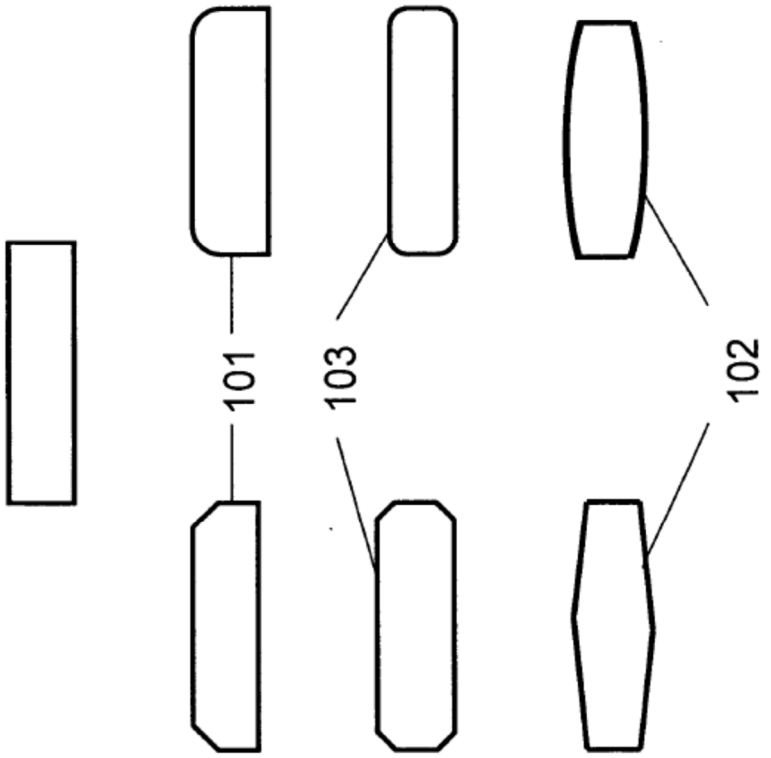


Fig. 17

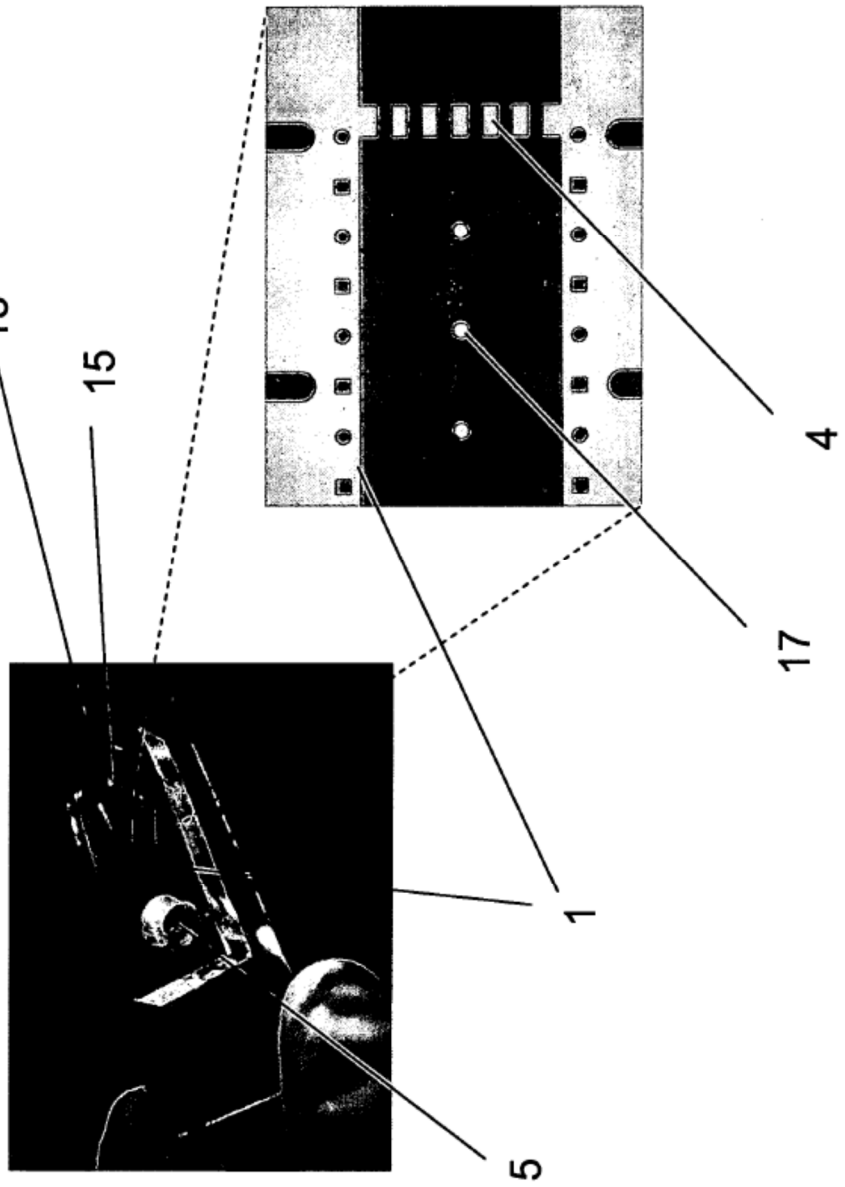
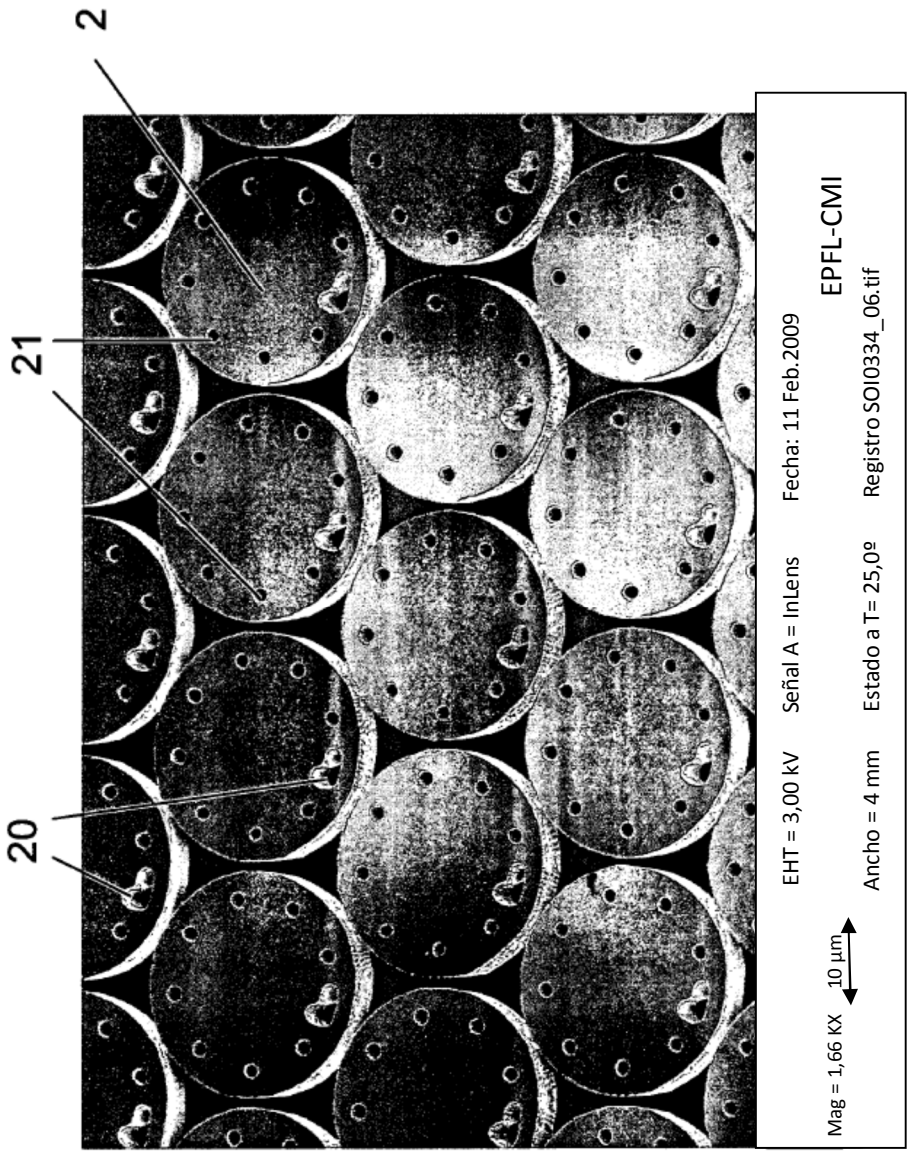


Fig. 18


2
21
20
EHT = 3,00 kV
Señal A = InLens
Fecha: 11 Feb.2009
EPFL-CMI
Ancho = 4 mm
Estado a T= 25,0º
Registro SOI0334_06.tif
Mag = 1,66 KX
10 µm