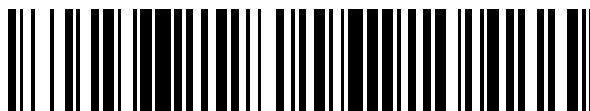


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 228**

51 Int. Cl.:

**B01L 3/00** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.07.2013 PCT/EP2013/064635**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2014 WO14009446**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2013 E 13737588 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 2872890**

54 Título: **Un método para realizar ensayos biológicos y/o químicos**

30 Prioridad:

**11.07.2012 EP 12175954**

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

**17.07.2020**

73 Titular/es:

**MYCARTIS NV (100.0%)  
Industriepark-Zwijnaarde 7C  
9052 Zwijnaarde, BE**

72 Inventor/es:

**TORNAY, RAPHAËL;  
DEMIERRE, NICOLAS;  
DE GIL, JOSÉ;  
MULLER, ROBIN y  
FALCONNET, DIDIER**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 774 228 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Un método para realizar ensayos biológicos y/o químicos

5 La presente invención se refiere a la tecnología de ensayos en la industria de la ciencia de la vida y en particular a la multiplexación aplicada a la diagnosis, la investigación del genoma y a la biología molecular. La presente invención se refiere en particular a un método para realizar ensayos biológicos y/o químicos.

Dentro del campo de la presente invención, un microportador o una micropartícula se refieren a cualquier tipo de partícula, respectivamente a cualquier tipo de portador, de tamaño microscópico, estando típicamente la dimensión mayor comprendida entre 100 nm y 300 micrómetros, preferiblemente entre 1 µm a 200 µm.

10 De acuerdo con la presente invención, el término microportador se refiere a una micropartícula funcionalizada, o diseñada para ser funcionalizada, esto es, que contiene, o está diseñada para contener, uno o más ligandos de unidades funcionales unidos a una superficie de microportadores o impregnados en su volumen. Un espectro grande de moléculas químicas y biológicas puede estar unido como ligandos a un microportador. Un microportador puede tener múltiples funciones y/o ligandos. Como se ha utilizado aquí, el término unidad funcional define cualesquiera especies que modifican, se unen a, sobresalen de, revisten o se unen de forma covalente o no covalente a la superficie de dicho microportador o están impregnadas en su volumen. Estas funciones incluyen todas las funciones que son utilizadas de forma rutinaria en la tecnología y diagnosis de cribado de alta producción.

20 El término microcanal o canal de microfluídico se refiere a un canal cerrado, es decir, un paso alargado para fluidos, con una sección transversal de tamaño microscópico, es decir con la dimensión más pequeña de la sección transversal estando típicamente comprendida entre aproximadamente 1 y aproximadamente 500 micrómetros, preferiblemente aproximadamente 10 y aproximadamente 300 micrómetros. Un canal microfluídico tiene una dirección longitudinal, que no es necesariamente una línea recta, y que se corresponde con la dirección en la que los fluidos están fluyendo dentro del canal microfluídico, es decir, preferiblemente esencialmente con la dirección correspondiente al vector de velocidad media de fluido, asumiendo un régimen de flujo laminar.

25 El descubrimiento o tamizado de fármacos y la secuenciación de ADN comúnmente implican la realización de ensayos sobre números muy grandes de compuestos o moléculas. Estos ensayos típicamente incluyen, por ejemplo, librerías químicas de tamizado para compuestos de interés o moléculas objetivo particulares, o ensayos para interacciones químicas y biológicas de interés entre moléculas. Estos ensayos a menudo requieren llevar a cabo miles de reacciones químicas y/o biológicas individuales.

30 Surgen numerosos problemas prácticos a partir de la manipulación de un número tan grande de reacciones individuales. El problema más significativo es probablemente la necesidad de etiquetar y rastrear cada reacción individual.

35 Un método convencional de rastrear la identidad de las reacciones se consigue separando físicamente cada reacción en una placa microtituladora (microdisposición). El uso de una placa microtituladora, sin embargo implica varias desventajas como, en particular, una limitación física al tamaño de la placa microtituladora utilizada, y de este modo al número de diferentes reacciones que pueden ser realizadas en la placa.

40 A la luz de las limitaciones en el uso de la microdisposición, actualmente son sustituidas de manera ventajosa por micropartículas codificadas funcionalizadas para realizar ensayos químicos y/o biológicos. Cada micropartícula codificada funcionalizada está provista de un código que identifica de forma única el ligando(s) particular unido a su superficie. El uso de tales micropartículas codificadas funcionalizadas permite el procesamiento aleatorio, lo que significa que miles de micropartículas codificadas funcionalizadas de forma única pueden ser todas mezcladas y sometidas a un ensayo de forma simultánea. Ejemplos de micropartículas codificadas funcionalizadas se describen en la Solicitud de Patente Internacional WO 00/63695.

45 El solicitante propuso en su Solicitud de Patente Internacional WO 2010/072011 un dispositivo de ensayo que tiene al menos un microcanal con una entrada y una salida, sirviendo el microcanal como una cámara de reacción en la que una pluralidad de micropartículas o microportadores codificados funcionalizados 10 (Fig. 1) pueden estar empaquetados. El canal microfluídico está provisto de medios de restricción o de detención que actúan como filtro que permite que una solución líquida que contiene reactivos químicos y/o biológicos fluya a través a la vez que se bloquean los microportadores 10 dentro de microcanal. Las micropartículas 10 están diseñadas de manera que su tamaño y forma con relación a la sección transversal del microcanal evitan cualquier superposición de microportadores adyacentes 10. De este modo, los microportadores 10 presentan una disposición de monocapa dentro de cada microcanal y están apiladas sobre los medios de restricción a lo largo de microcanal.

Aquellos microportadores codificados funcionalizados 10 que muestran una reacción de interés favorable entre sus ligandos y los reactivos químicos y/o biológicos que fluyen a través pueden entonces tener su código ópticamente rojo, lo que conduce a la identificación del ligando que produce la reacción favorable.

55 El código puede comprender un patrón distintivo de una pluralidad de orificios transversales 12 y también puede incluir una marca de orientación asimétrica tal como, por ejemplo, una señal con forma de L 14 (como se muestra en

la Fig. 1) o un triángulo. Esta marca de orientación asimétrica permite la distinción entre la superficie superior 16 y la superficie inferior 18 del microportador 1.

Con el dispositivo de ensayo descrito en el documento WO 2010/072011, las micropartículas son introducidas dentro de microcanal desde la entrada e inmovilizadas sobre los medios de restricción. Después, una muestra biológica (que comprende una o más moléculas objetivo) es hecha fluir en el microcanal (que comprende uno o más conjuntos de microportadores) alrededor de las micropartículas y después a través de los medios de restricción hacia la salida, estando los microportadores todavía bloqueados por los medios de restricción. La detección de una reacción de interés puede estar basada en la lectura continua de la intensidad de fluorescencia de cada microportador codificador presente en un canal microfluídico. En otras palabras, la presencia de una molécula objetivo en el ensayo producirá una señal fluorescente predeterminada.

Sin embargo, después de que las micropartículas 10 hayan sido insertadas dentro del microcanal y estén apiladas sobre los medios de restricción, las micropartículas 10 pueden ser desplazadas de forma deslizante unas con relación a la otras en la dirección perpendicular al microcanal 20, es decir a la dirección Z (Fig. 2).

Después, cuando se realiza la abertura continua de la fluorescencia como se describe en el documento WO2010/072011A1, se ha observado que algunas o todas las micropartículas 22 pueden presentar una intensidad no homogénea sobre su superficie que emite luz de fluorescencia como respuesta a la unión de las moléculas objetivo (Fig. 3).

La Fig. 4 es una vista aumentada de una micropartícula 22 que presenta una intensidad no homogénea sobre su superficie. La micropartícula 22 presenta claramente una región 24 que tiene un nivel de gris inferior a una región circundante 26.

Esta intensidad no homogénea es debida a la transferencia de masa no homogénea en el microcanal que es principalmente la consecuencia de la disposición particular de microportadores 10 en la dirección Z dentro del microcanal 20. La transferencia de masa no homogénea dentro del microcanal 20 conduce a un flujo no uniforme de las moléculas objetivo sobre la superficie de las micropartículas.

La transferencia de masa no homogénea es problemática cuando afecta a la atribución del valor de fluorescencia en al microportador. En caso de que la no homogeneidad sea significativa, el valor de fluorescencia que es atribuido al microportador no reflejará la concentración correcta de moléculas objetivo dentro de la muestra analizada.

De este modo, la transferencia de masa no homogénea afecta a la fiabilidad de la señal medida. Valores incorrectos sobre una pluralidad de micropartículas pueden conducir a serias consecuencias sobre la fiabilidad del ensayo y por tanto sobre su utilidad en el campo de la diagnosis, investigación de genoma y biología molecular.

La presente invención tiene como objetivo remediar todas o parte de las desventajas mencionadas anteriormente.

Para conseguir este objetivo, la invención propone un método para realizar un ensayo químico y/o biológico como está definido la reivindicación 1 que comprende al menos las siguientes etapas sucesivas consistentes en:

a) proporcionar un dispositivo de ensayo que comprende al menos un microcanal que tiene al menos una entrada y al menos una salida, comprendiendo dicho dispositivo adicional medios de restricción diseñados para restringir el movimiento hacia la salida de las micropartículas introducidas en el microcanal a la vez que permite que un fluido fluya a través de los medios de restricción hacia la salida,

b) introducir una pluralidad de micropartículas en el microcanal a través de la entrada, teniendo cada micropartícula una forma relativa a la sección transversal del microcanal lo que evita la superposición de dos micropartículas adyacentes,

c) restringir el movimiento de dichas micropartículas en el microcanal hacia la salida utilizando medios de restricción,

d) hacer fluir una muestra de fluido a través del microcanal,

e) realizar una lectura biológica y/o química en cada micropartícula, comprendiendo el método además las etapas de:

f) mover las micropartículas en el microcanal mientras el movimiento las micropartículas hacia la salida está todavía restringido por dichos medios de restricción y,

g) repetir sucesivamente las etapas d) y e).

De este modo, en el método de acuerdo con la invención, las micropartículas son movidas entre dos lecturas sucesivas biológica y/o química con el fin de modificar al menos la disposición de las micropartículas unas con relación a las otras en la dirección perpendicular al microcanal, de manera que se reduce el efecto de transferencia de masa no homogénea como se ha descrito anteriormente.

- De hecho, cuando se realiza una primera lectura biológica y/o química, la distribución particular de la transferencia de masa se puede establecer dentro del microcanal dependiendo de disposición de las micropartículas dentro del microcanal, creando con ello patrones de flujo o de microportadores. Sin embargo, mover las partículas antes de realizar una segunda lectura biológica y/o química incluye un cambio en la distribución de transferencia de masa dentro de microcanal. De este modo, las ausencias de homogeneidad de intensidad debida a la transferencia de masa no homogénea son promediadas estadísticamente en el tiempo en todas las micropartículas lo que conduce a una intensidad homogénea recogida en cada micropartícula a lo largo del tiempo.
- Es posible entonces dar seguimiento de una manera fiable a una reacción cinética realizando lecturas en diferentes momentos del tiempo.
- De acuerdo con otra característica de la invención, las etapas f a g son repetidas al menos una vez después del final de la etapa g, permitiendo de este modo un cambio de la distribución de transferencia de masa varias veces durante las interacciones biológicas y químicas de las moléculas objetivo con las micropartículas.
- Preferiblemente, las etapas g a f son repetidas al menos a una frecuencia dada, permitiendo de este modo una redistribución regularmente aleatoria de micropartículas en el microcanal a través de todo el ensayo biológico y/o químico a lo largo del tiempo.
- En una realización particular de la invención, la frecuencia dada está comprendida entre 0,05 Hz y 1 Hz y de forma más preferida está comprendida entre 0,5 Hz y 2 Hz. De acuerdo con la invención, las etapas f y g son repetidas periódicamente a una frecuencia predeterminada comprendida entre 0,05 Hz a 5 Hz.
- De acuerdo con otra característica de la invención, la etapa f que consiste en mover las micropartículas dentro del microcanal es realizada durante un periodo dado que es lo suficientemente largo para inducir un cambio en la distribución de la transferencia de masa en el microcanal.
- Se ha de entender que este primer periodo debería estar determinado de tal manera que no aumentase el tiempo requerido para realizar un ensayo biológico y/o químico completo.
- En una realización de la invención, el primer periodo dado está comprendido dentro del rango de 0,5 a 5 segundos. Se ha encontrado que este periodo cumple con un buen compromiso entre el tiempo requerido para realizar el ensayo completo o y la necesidad de mover suficientemente las micropartículas para inducir un cambio en la distribución de transferencia de masa.
- De acuerdo con otra característica la invención, la etapa g es realizada durante un segundo periodo de tiempo.
- El segundo periodo dado asegura que todas las micropartículas tienen suficiente tiempo para interactuar con los reactivos y las moléculas objetivo presentes en la muestra de fluido y que es realizada la detección de la señal emitida desde las micropartículas. De este modo, este segundo periodo deseado es una característica clave para obtener una buena transferencia de masa de las moléculas objetivo sobre las micropartículas.
- En una realización de la invención, el segundo periodo dado está comprendido dentro del rango de 0,2 a 5 segundos.
- De acuerdo con la invención, la etapa f) consiste en mover las partículas hacia atrás y después hacia delante a lo largo del microcanal para redistribuir espacialmente y aleatoriamente las micropartículas unas con relación a otras a lo largo del microcanal, lo que conduce de este modo a modificar la distribución de la transferencia de masa que se puede haber acumulado dentro de microcanal.
- En una realización particular de la invención, las micropartículas son movidas hacia atrás aplicando una presión diferencial negativa de muestra fluida entre la entrada y la salida del microcanal y son movidas hacia delante aplicando una presión diferencial positiva de muestra de fluido entre la entrada y la salida de microcanal. En una realización, la presión diferencial negativa está comprendido entre -20 y -200 mbares. De acuerdo con la invención, la presión diferencial positiva está comprendida entre 20 y 200 mbares.
- En otra realización de la invención, las micropartículas son movidas hacia atrás aplicando un desplazamiento de la muestra de fluido mediante la actuación mecánica desde la salida hasta la entrada de microcanal y son movidas hacia delante aplicando un desplazamiento de la muestra de fluido mediante la actuación mecánica desde la entrada hasta la salida al microcanal. De manera ventajosa, la actuación de microcanal se obtiene conectando una bomba de jeringuilla al microcanal y moviendo el pistón de la jeringuilla.
- De acuerdo con la invención, en la etapa f) las micropartículas son movidas hacia la entrada del microcanal en una distancia que representa al menos 5 veces la dimensión de una micropartícula medida a lo largo de microcanal.
- Se ha encontrado que este valor corresponde con la distancia óptima sobre la cual las micropartículas deberían ser movidas para garantizar una redistribución aleatoria de las micropartículas unas con relación a las otras dentro del microcanal, lo que conduce a un cambio aleatorio de la distribución de transferencia de masa dentro de microcanal.

De acuerdo con una realización de la invención, una etapa f' es implementada entre la etapa f y la etapa g y consiste en mover las micropartículas hacia la salida hasta que su movimiento restringido por los medios de restricción.

5 El movimiento de las partículas hacia la salida hasta que su movimiento es restringido por los medios de restricción proporciona una configuración estática de las micropartículas durante la realización del ensayo y la lectura en la que las micropartículas están siempre situadas en la misma región dentro del microcanal.

10 Un dispositivo de ensayo está descrito en la presente memoria pero no está reivindicado actualmente para realizar el método de acuerdo con la invención y comprende al menos un microcanal que tiene al menos una entrada y una salida, estando dicho microcanal diseñado para alojar una pluralidad de micropartículas, caracterizado por que la entrada y la salida están conectadas a medios de aplicación de presión enlazados con medios de control para controlar los medios de aplicación de presión, de manera que se genera presión diferencial negativa y positiva entre la entrada y la salida.

El dispositivo de ensayo permite mover las micropartículas insertadas dentro del microcanal hacia atrás y hacia delante variando la presión diferencial aplicada en la entrada y en la salida del microcanal, permitiendo de este modo evitar o al menos reducir al efecto de transferencia de masa no homogénea en un ensayo biológico y/o químico.

15 La invención se puede entender mejor y otros detalles, características y ventajas de la invención aparecen en la lectura de la siguiente descripción hecha a modo de ejemplo no limitativo con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La Fig. 1 ilustra una vista en perspectiva de unos microportadores de acuerdo con la técnica anterior;

La Fig. 2 ilustra el posicionamiento de los microportadores unos con relación a los otros dentro del microcanal;

20 La Fig. 3 es una imagen de la fluorescencia obtenida con un método y un dispositivo de ensayo de acuerdo con la técnica anterior;

La Fig. 4 es una vista aumentada de la fluorescencia recogida a partir de un microportador;

La Fig. 5 es una vista en sección transversal de un dispositivo de ensayo;

25 Las Figs. 6A, 6B, 6C y 6D son vistas en diagrama de diferentes etapas del movimiento de las partículas dentro del microcanal con el método de acuerdo con la invención;

La Fig. 7 es una imagen de la fluorescencia obtenida con el método de acuerdo con la invención.

30 Se hace referencia a la Fig. 5 que representa un dispositivo de ensayo 19 que comprende varios microcanales 20 (solo uno es visible en la vista en sección transversal) formados en una placa 22 y dispuestos lado con lado entre sí. Cada microcanal 20 comprende una entrada 28 en comunicación de fluido con un pocillo de entrada 30 y una salida 32 en comunicación de fluido con un pocillo de salida 32.

Cada microcanal 20 termina con medios de restricción o de detención 34 que actúan como un filtro que permiten que una solución líquida fluya a través del mismo mientras bloquea los microportadores 10 dentro del microcanal 20.

Como se ha mencionado anteriormente, las micropartículas 10 presentan una disposición monocapa dentro de cada microcanal y son apiladas sobre los medios de restricción a lo largo del microcanal.

35 El dispositivo de ensayo comprende medios de detección 36 diseñados para detectar señales fluorescentes emitidas en la superficie de las micropartículas 10 en una dirección sustancialmente perpendicular al plano que es ópticamente transparente de manera que la señal se puede detectar desde el exterior del microcanal.

40 Una primera microbomba 38 está montada en la entrada del pocillo de entrada 30 y una segunda microbomba 40 está montada en la salida del pocillo de salida 32. Tanto la primera como la segunda microbombas 38, 40 están enlazadas con los medios de control 42 que controlan simultáneamente la primera y la segunda microbombas 38, 40 y de este modo la presión diferencial  $\Delta P$  aplicada al fluido dentro del microcanal 20 entre la entrada 28 y la salida 30.

De acuerdo con el método de la invención, la primera etapa consiste en proporcionar el dispositivo de ensayo 19 descrito anteriormente.

45 Una segunda etapa b, mostrada en la Fig. 6A, consiste en introducir una pluralidad de micropartículas 101, 102, 103, 104 dentro del pocillo de entrada y después en el microcanal. Para facilitar la introducción de las micropartículas 101, 102, 103, 104 dentro de microcanal, las micropartículas 101, 102, 103, 104 son puestas en solución de antemano, la cual es después introducida dentro del pocillo de entrada 30 y el microcanal 20.

50 Con el fin de que las micropartículas 101, 102, 103, 104 fluyan hacia la salida 30 del microcanal 20, los medios de control 42 controlan la primera y la segunda bombas 38, 40, de manera que se genera una presión diferencial positiva  $\Delta P$  entre la entrada 28 y la salida 30 del microcanal 20.

En una tercera etapa c, mostrado en la Fig. 6B, el movimiento de las micropartículas 101, 102, 103, 104 hacia la salida de microcanal 20 está restringido por los medios de restricción 34.

5 En una cuarta etapa d, una muestra de fluido es hecha fluir en el microcanal 20 desde la entrada 28 hacia la salida 30. La muestra de fluido comprende todos los reactivos, moléculas objetivo y/o no objetivo necesarios para realizar el ensayo biológico.

Una quinta etapa e consiste en recoger las señales de fluorescencia emitidas por las partículas utilizando los medios de detección 34.

10 Una sexta etapa f consiste en mover las micropartículas 101, 102, 103, 104 hacia atrás hacia la entrada en el microcanal 20, Fig. 6C, y después hacia delante hacia la salida 30 hasta que su movimiento sea restringido por los medios de restricción 34.

15 El movimiento hacia atrás (Fig. 6C) de las micropartículas 101, 102, 103, 104 está inducido por los medios de control 42 que controlan la primera y la segunda microbombas 38, 40, de manera que se cambia a la presión diferencial entre la entrada 28 y la salida 30 del microcanal 20 de positiva a negativa. El movimiento hacia delante de las micropartículas 101, 102, 103, 104 es inducido estableciendo una presión diferencial positiva entre la entrada 28 y la salida 30 del microcanal 20.

Las micropartículas 101, 102, 103, 104 son desplazadas hacia la entrada 28 del microcanal 20 en una distancia que representa al menos 5 veces la dimensión de las micropartículas medida a lo largo del microcanal, es decir 5 veces el diámetro de las micropartículas.

20 Las micropartículas 101, 102, 103, 104 son preferiblemente movidas hacia atrás durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 5 segundos con el fin de garantizar que todas las micropartículas 101, 102, 103, 104 tienen suficiente tiempo para moverse a lo largo del microcanal.

25 Como se representa en la Fig. 6D, las micropartículas 101, 102, 103, 104 tienen una disposición espacial diferente unas con relación a las otras a lo largo del microcanal 20 en comparación con la disposición observada en la Fig. 6B. Después, este cambio en la disposición espacial de las micropartículas 101, 102, 103, 104 permite un cambio en la distribución de transferencia de masa entre sucesivas lecturas biológicas y/o químicas.

En una última etapa g, el método de acuerdo con la invención consiste en repetir sucesivamente las etapas d y e durante un periodo de tiempo comprendido entre 0,2 y 5 segundos.

30 En el método de acuerdo con la invención, las etapas f y g son repetidas periódicamente a una frecuencia predeterminada comprendida entre 0,05 Hz y 5 Hz, con el fin de modificar de forma regular la distribución de transferencia de masa en el microcanal 20 durante un ensayo químico y/o biológico.

35 La Fig. 7 muestra una imagen de la fluorescencia emitida por las micropartículas 10. Las micropartículas que tienen ligandos unidos que han reaccionado con los reactivos químicos y/o biológicos en la misma solución de muestra presentan una intensidad homogénea en toda su superficie. De este modo, el método de acuerdo con la invención permite eliminar el efecto de transferencia de masa no homogénea en las señales de fluorescencia recogidas procedentes de las micropartículas.

Están configurados medios de control 42 que controlan la primera y la segunda microbombas 38, 40, de manera que cada microbomba 38, 40 aplica a la entrada 28 y a la salida 30 del microcanal 20 una presión  $P_{\text{entrada}}$  y  $P_{\text{salida}}$ , respectivamente, mayor que la presión atmosférica  $P_{\text{atm}}$ .

40 Además, la presión  $P_{\text{entrada}}$  y la presión  $P_{\text{salida}}$ , junto con la variación absoluta en la presión diferencial  $|\Delta P|$  entre la entrada 28 y la salida 30 del microcanal son tales que  $P_{\text{entrada}} - |\Delta P|$  y  $P_{\text{salida}} - |\Delta P|$  siempre son más elevadas que una presión predeterminada, de manera que se evita la formación de microburbujas dentro del microcanal 20 que podrían bloquear parcialmente el microcanal.

En una realización de la invención, la presión  $P_{\text{entrada}}$  y la presión  $P_{\text{salida}}$ , son establecidas en un mismo valor  $P_1$ .

45 Ejemplos no limitativos de medios de restricción 34 incluyen una rejilla, un cable, un filtro de malla, una construcción de presa, uno o más pilares que se extienden sustancialmente perpendicularmente a la placa, una reducción de la sección del microcanal. Una fuerza electrostática o dielectroforética o un campo magnético pueden ser utilizados para inmovilizar las micropartículas. Numerosos ejemplos de medios de restricción están indicados en la Solicitud de Patente WO 2010/072011 del solicitante.

50 También es posible mover hacia atrás las micropartículas 10 mediante medios distintos a variar la presión diferencial como se ha mencionado anteriormente. En particular, sería posible utilizar medios magnéticos que generan un campo magnético que interactúa con las micropartículas 10 sensibles a un campo magnético.

Las micropartículas 10 están preferiblemente conformadas con forma de disco y tienen un diámetro comprendido entre 1 y 200  $\mu\text{m}$ , por ejemplo 40  $\mu\text{m}$ . Las micropartículas también pueden tener una forma diferente tal como un

cuadrado un hexágono.

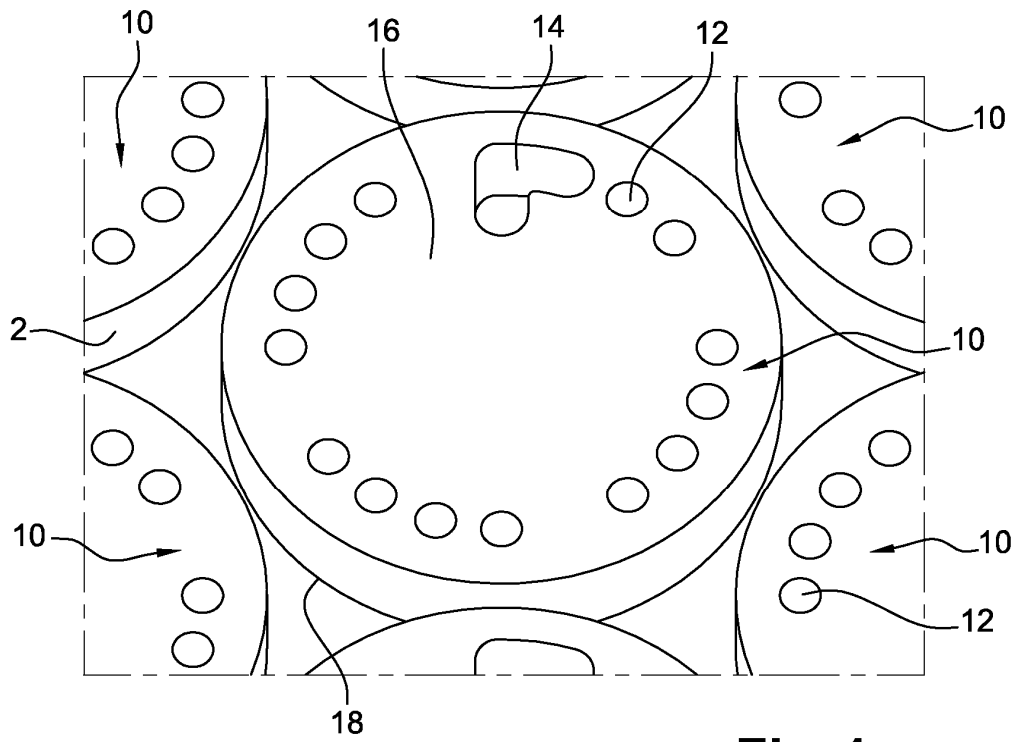
Otras realizaciones de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la consideración de la memoria y de la puesta en práctica de la invención descrita la presente memoria. Se ha de entender que la memoria y el ejemplo son considerados únicamente como ejemplo, siendo el verdadero alcance de la invención el definido por las siguientes reivindicaciones.

5

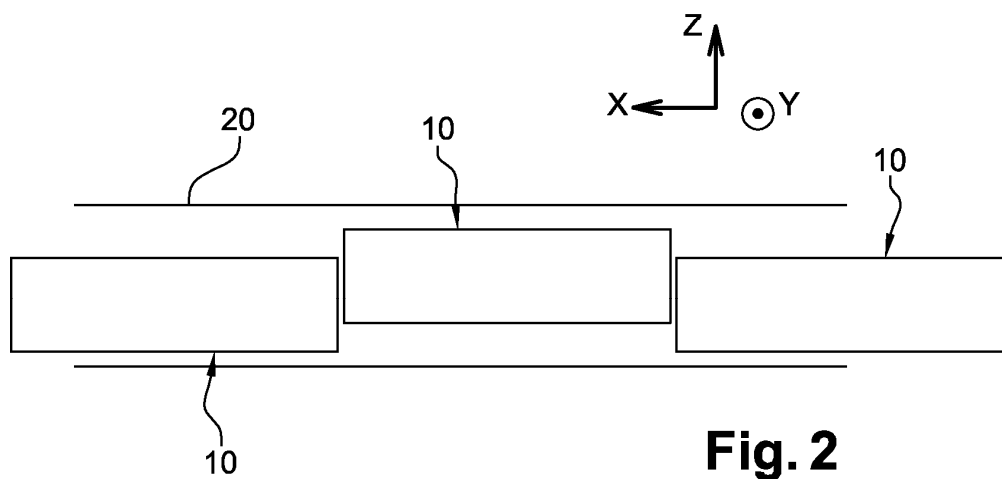
**REIVINDICACIONES**

1. Un método para realizar un ensayo químico y/o biológico que comprende al menos las siguientes etapas sucesivas consistentes en:
  - 5 a) proporcionar un dispositivo ensayo (19) que comprende al menos un microcanal (20) que tiene al menos una entrada (28) y al menos una salida (30), comprendiendo además dicho dispositivo de ensayo medios de restricción (34) diseñados para restringir el movimiento hacia la salida (30) de las micropartículas (10) introducidas en el microcanal mientras (20) permitiendo que un fluido fluya a través de los medios de restricción (34) hacia la salida (30),
  - 10 b) introducir una pluralidad de micropartículas (10) en el microcanal (20) por medio de la entrada (28), teniendo cada micropartícula (10) una forma relativa a la sección transversal del microcanal (20), que evita la superposición de dos micropartículas adyacentes (20),
  - c) restringir el movimiento de dichas micropartículas (10) en el microcanal (20) hacia la salida utilizando los medios de restricción (34),
  - 15 d) hacer fluir una muestra a través del microcanal (20) y,
  - e) realizar una lectura biológica y/o química sobre cada micropartícula (10),
  - f) a la vez que los medios de restricción (34) restringen el movimiento de las micropartículas (10) en una dirección hacia la salida (30), mover las partículas (101, 102, 103, 104) hacia atrás hacia la entrada a lo largo del microcanal (20) y hacia delante hacia la salida a lo largo del microcanal (20), mover hacia atrás y hacia delante de las micropartículas produciendo la redistribución espacialmente aleatoria de las micropartículas unas con relación a las otras a lo largo del microcanal (20), en donde las micropartículas (10) son movidas hacia la entrada (28) del microcanal (20) una distancia que representa al menos cinco veces la dimensión de una micropartícula (10) medida a lo largo del microcanal (20), y
  - 20 g) repetir sucesivamente las etapas d) y e),
  - 25 en donde las etapas f) y g) son repetidas periódicamente a una frecuencia predeterminada comprendida entre 0,05 Hz y 5 Hz.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha frecuencia está comprendida entre 0,05 Hz y 1 Hz.
- 30 3. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde la etapa f) es realizada durante un primer periodo dado.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho primer periodo está comprendido dentro de un rango de 1 a 5 segundos.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la etapa g) es realizada durante un segundo periodo dado.
- 35 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el segundo periodo está comprendido dentro de un rango de 0,5 a 5 segundos.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde durante la etapa f) las micropartículas (10) se mueven hacia atrás aplicando una presión diferencial negativa ( $\Delta P$ ) de muestra de fluido entre la entrada (28) y la salida (30) de microcanal (20) y son movidas hacia delante aplicando una presión diferencial positiva ( $\Delta P$ ) de muestra de fluido entre la entrada (28) y la salida (30) de microcanal (20).
- 40 8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además la etapa f' implementada entre la etapa f) y la etapa g) y que consiste en mover las micropartículas (10) hacia la salida (30) hasta que su movimiento es restringido por los medios de restricción (34).

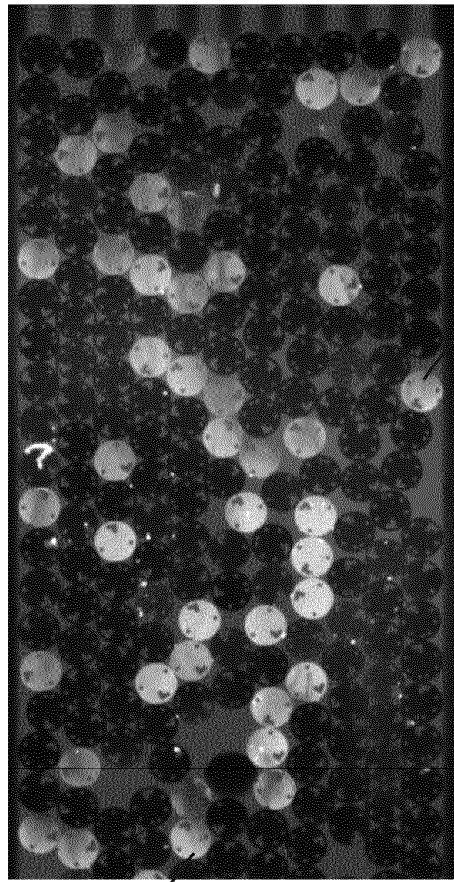




**Fig. 1**



**Fig. 2**

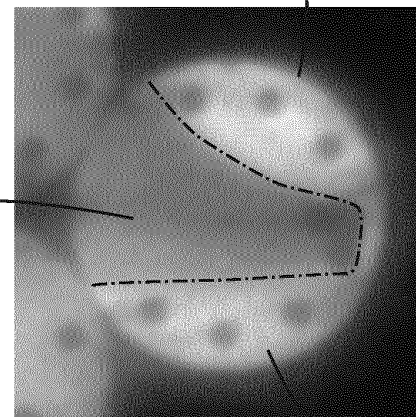


22

22

**Fig. 3**

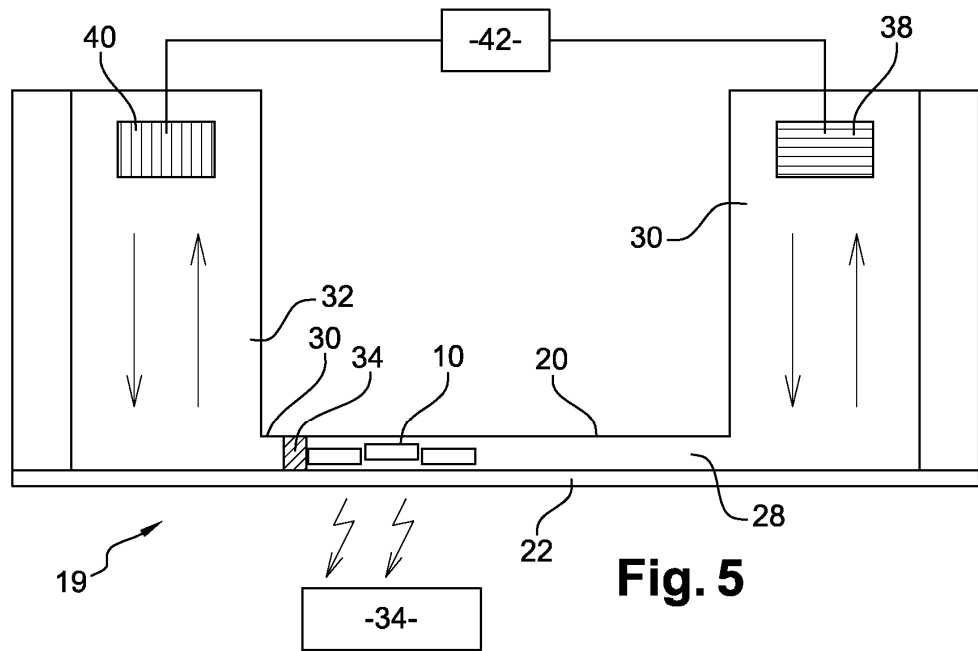
**Fig. 4**



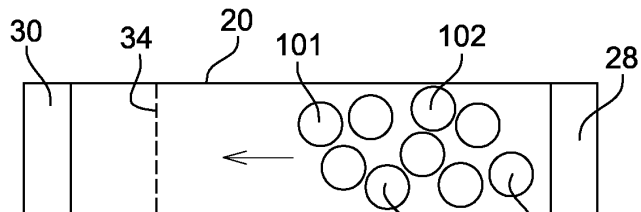
22

24

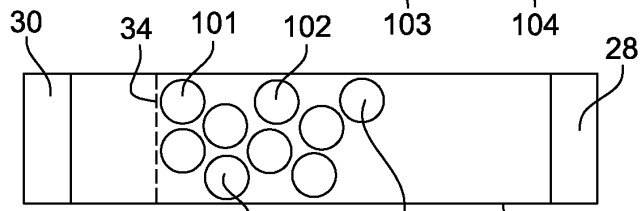
26



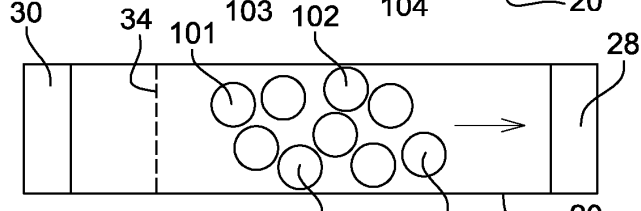
**Fig. 6A**



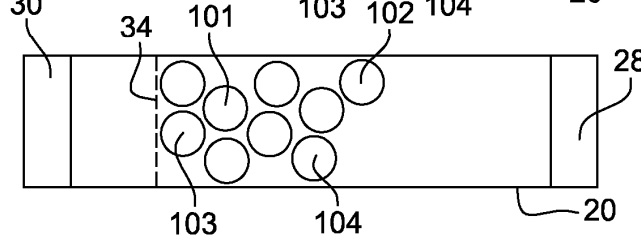
**Fig. 6B**



**Fig. 6C**



**Fig. 6D**



**Fig. 7**

