



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 327 619**

51 Int. Cl.:  
**B01L 3/02** (2006.01)  
**G01N 1/40** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02777429 .8**  
96 Fecha de presentación : **12.09.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1429866**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.06.2004**

54 Título: **Procedimiento y dispositivo de aislamiento y/o de determinación de un analito.**

30 Prioridad: **12.09.2001 FR 01 11883**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**02.11.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**02.11.2009**

73 Titular/es: **BIOMERIEUX**  
**Chemin de l'Orme**  
**69280 Marcy-L'Etoile, FR**  
**COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE**

72 Inventor/es: **Ginot, Frédéric;**  
**Achard, Jean-Luc;**  
**Drazek, Laurent y**  
**Pham, Pascale**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 327 619 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Procedimiento y dispositivo de aislamiento y/o de determinación de un analito.

5 La presente invención se refiere, de manera general, al aislamiento de un analito.

Por “aislar” o “aislamiento”, se entiende de manera genérica cualquier técnica que permite separar un analito, pero también enriquecer o concentrar en dicho analito cualquier líquido que lo contiene, o cualquier soporte sólido en contacto con este líquido. Pero se entiende asimismo, eventualmente conjuntamente con la definición anterior, cualquier técnica que permite determinar el analito, en el sentido de una detección y/o cuantificación de éste, a partir del medio líquido que lo contiene.

10 Por el término “analito”, se entiende cualquier entidad, en particular entidad química, bioquímica o biológica, a aislar. A nivel de los analitos considerados a continuación por la presente invención, se citarán las células, orgánulos, virus y bacterias, los anticuerpos, los fragmentos de anticuerpos, los antígenos, los haptenos, las lectinas, los azúcares, los ácidos nucleicos, las proteínas, en particular A o G, las hormonas, los receptores de hormonas, la biotina, la avidina, la estreptavidina, y de manera general cualquier molécula o macromolécula, natural o sintética, o análogo, a determinar, es decir, a detectar y/o a cuantificar.

15 Más particularmente, la presente invención se expondrá haciendo referencia a los análisis biológicos, en particular moleculares, para los cuales la muestra líquida de partida comprende o contiene un analito del tipo macromolécula biológica, tal como proteína o ácido nucleico.

Diferentes formatos de ensayos biológicos de tipo heterogéneo, tales como los denominados ELISA, comprenden una etapa, denominada de incubación, durante la cual un medio líquido intermedio, en el que se encuentra distribuido el analito obtenido a partir de la muestra de partida, se pone en contacto con una superficie reactiva, es decir, una superficie obtenida a partir de un sustrato y de un agente reactivo de unión específica con el analito, se distribuye y se fija sobre dicha superficie.

20 El rendimiento de dicha etapa, que tiene por objetivo capturar el analito, determina el del procedimiento de análisis usado, en términos de especificidad, sensibilidad, precisión o rapidez.

Este rendimiento depende por una parte de una cierta cantidad de factores que conviene examinar para entender bien los límites de los métodos de análisis usados en la actualidad en el campo de la biología molecular (análisis de ácidos nucleicos por ejemplo) y de las inmunosificaciones.

25 Un factor se refiere a la exposición efectiva de la superficie activa a cualquier analito distribuido en el medio líquido. En la práctica, la única difusión molecular (por agitación térmica) es insuficiente para llevar hacia la superficie reactiva las moléculas de analito que están separadas de dicha superficie por una distancia superior a algunos centenares de micrones. Por consiguiente, por simple difusión, sólo una cantidad limitada del analito alcanza la superficie reactiva.

30 Se han propuesto diferentes soluciones para oponerse a los límites de cualquier difusión molecular:

- 35 a) se ha propuesto agitar el medio líquido, en contacto con la superficie reactiva; dicha solución ya no funciona en cuanto el volumen del medio líquido es relativamente bajo o el pocillo demasiado profundo, como es el caso con los pocillos de una placa de microtitulación de 384 pocillos o más, cuyo volumen elemental puede no exceder de 200  $\mu$ l por pocillo,
- 40 b) también se ha propuesto crear un flujo del medio líquido, en general de manera laminar, en contacto con la superficie reactiva. Esta solución implica usar una bomba mecánica, y poner en movimiento unos volúmenes relativamente importantes, lo que disminuye la velocidad de unión específica entre la superficie reactiva y el analito,
- 45 c) se ha propuesto asimismo disminuir la cantidad del medio líquido, usando un agente reactivo intermedio, en estado dividido, por ejemplo unas partículas magnéticas que comprenden un soporte magnético y un agente de captura del analito, unido a dicho soporte. Este agente reactivo intermedio permite capturar el analito, y se puede confinar a continuación gracias a un campo magnético. Este confinamiento permite trasegar el medio líquido excedente sin extraer el analito. A continuación, mediante la destrucción, por ejemplo por calor, de la unión entre el agente reactivo intermedio y el analito, se libera este último en un volumen del medio líquido mucho más bajo.

50 Esta solución adolece del inconveniente de necesitar un agente reactivo suplementario y varias etapas adicionales.

- 55 d) se ha propuesto asimismo dividir y distribuir la superficie reactiva en el seno del medio líquido, gracias a un soporte magnético, dividido en forma de partículas, y funcionalizado con el agente reactivo de unión específica con el analito. Estas partículas tienen un tamaño comprendido entre 50 nm y varios micrones. Estas partículas que han reaccionado con el analito se pueden separar después mediante confinamiento magnético tal como anteriormente.

## ES 2 327 619 T3

Esta solución presenta la ventaja de aumentar el área necesaria para la captura del analito, debido a que el agente reactivo de unión específica está presente en todas partes o casi en todas partes. Ahora bien, el problema aparece durante el desarrollo del ensayo, durante la revelación de analito por un agente reactivo de detección. Este agente reactivo de detección se fijará asimismo, a nivel bajo pero no nulo sobre el área de reacción, independientemente de la presencia o no del analito. Una cantidad de agente reactivo de detección proporcional al área de reacción, no específicamente unida al analito, generará un ruido de fondo, lo que disminuye la sensibilidad de la etapa de incubación, y por lo tanto la del método de análisis.

Otro factor se refiere precisamente a la importancia de las superficies, no reactivas (puesto que no están funcionalizadas con el agente reactivo de unión específica), puestas en contacto con el analito. De manera general, estas superficies retienen una parte del analito, mediante absorción por ejemplo, lo que disminuye evidentemente la cantidad de analito efectivamente capturado por la superficie reactiva propiamente dicha, y por lo tanto limita la sensibilidad de la etapa de incubación, y por lo tanto del método de análisis.

Por lo tanto, existe un interés en limitar la importancia de las superficies en contacto con el medio líquido, diferentes de la superficie reactiva propiamente dicha.

La presente invención tiene por objeto un procedimiento que permite acelerar la cinética de la puesta en contacto del analito sobre la superficie reactiva.

La solución según la invención rompe con los métodos tradicionales de análisis, en particular de análisis biológico, proponiendo un procedimiento, en particular de incubación, que consiste por lo menos en:

- 1) formar y/o mantener, durante el tiempo de dicha etapa, una entidad volúmica de reacción que tiene una forma simétrica alrededor de un eje de referencia, constituida únicamente por un medio líquido denominado interno, en el que se distribuye el analito obtenido a partir de la totalidad o parte de la muestra líquida de partida, presentando dicha entidad de reacción una interfaz con un medio externo, eventualmente confinado, diferente del medio interno, que presenta con este último una tensión superficial, presentando dicha interfaz una superficie desarrollada cerrada alrededor de dicho eje de referencia,
- 2) generar un gradiente térmico según el eje de referencia, a través de la entidad de reacción, de manera que determina en esta última una zona caliente y una zona fría, induce una variación de la tensión superficial de la interfaz, paralelamente al eje de referencia, y pone en movimiento el medio interno según un trayecto cerrado de micro-convección forzada, que comprende una circulación axial de ida de la zona fría a la zona caliente, y una circulación periférica de retorno de la zona caliente a la zona fría,
- 3) colocar la superficie reactiva en contacto con el medio interno de la entidad de reacción, sobre el trayecto de micro-convección forzada de dicho medio interno.

Gracias a la invención, ya no existe en el seno del medio líquido prácticamente ningún volumen muerto, y casi la totalidad del líquido que constituye el medio interno se encuentra llevada al contacto con la superficie activa.

La solución según la invención permite por lo tanto aumentar directamente la sensibilidad del procedimiento de determinación del analito, y mejorar así todavía más el rendimiento de técnicas tales como la amplificación, al tratarse de un analito de tipo ácido nucleico.

Preferentemente, el agente reactivo de unión específica es un ligando.

Por el término “ligando” se entiende un elemento capaz de formar, mediante una unión física, un complejo con el analito.

A título de ejemplo de ligando, se pueden citar los anticuerpos, los fragmentos de anticuerpos, los antígenos, los haptenos, las lectinas, los azúcares, los ácidos nucleicos, las proteínas, en particular A o G, las hormonas, los receptores de hormonas, la biotina, la avidina o la estreptavidina y, de manera general, los ligandos naturales o sintéticos, y los análogos de ligandos modificados que pueden entrar en competición con los ligandos.

Cualquier ligando tal como se ha definido anteriormente se inmoviliza sobre un soporte por un medio cualquiera tal como adsorción, covalencia, quelación, reconocimiento molecular, y capaz de retener el analito, solo o conjugado con otro ligando.

Por el término “soporte” se entiende cualquier tipo de soporte, polímero, inorgánico o metálico. A título de ejemplo de soportes polímeros, se pueden citar los soportes plásticos a base de poliestireno, poli(met)acrilatos, polibutadienos, polipropileno, u otros, solos o en forma de copolímeros. A título de ejemplo de soportes inorgánicos, se pueden citar el óxido de silicio, el silicio, la mica, el vidrio, el cuarzo, el óxido de titanio, el óxido de vanadio. A título de ejemplo de soportes metálicos, se pueden citar el oro, y la plata.

La inmovilización de los ligandos sobre el soporte puede efectuarse, o bien mediante simple adsorción sobre el soporte nativo o modificado, o bien por medio de una reacción química de funcionalización, o física, que permite

## ES 2 327 619 T3

modificar la superficie del soporte, y permitir así la fijación del receptor por unas uniones de covalencia, o de otros medios tradicionales bien conocidos por el experto en la materia.

5 En la descripción siguiente, se entiende por “partícula” cualquier partícula de un soporte polímero, inorgánico o metálico, sobre la cual es posible inyectar un ligando. En particular, se consideran como pertenecientes al campo de la presente invención, las partículas que se pueden separar mediante la acción de un medio físico externo, por ejemplo por vía magnética o eléctrica, o bajo el efecto de la gravedad o por centrifugación. Destacan de la definición anterior, las partículas de tamaño pequeño, en particular superparamagnéticas, cuya velocidad de sedimentación bajo el efecto de la gravedad es inferior a la agitación térmica, pero que pueden constituir unos agregados por cualquier procedimiento  
10 que permite reunir las entre sí, o ensamblarlas sobre unas partículas de tamaño más grande, separadas por un medio físico cualquiera.

15 A título de ejemplo de partículas polímeras, se pueden citar las partículas obtenidas por polimerización en emulsión tales como los látex, o unas partículas de tamaño más grande, magnéticas o no.

A título de ejemplo de partículas metálicas, se pueden citar el oro coloidal, las partículas ferro-, ferri-, para- o superparamagnéticas, recubiertas o no de polímeros naturales o sintéticos, cuya composición comprende el hierro u otros metales tales como el cobalto, el níquel, solos o en forma de aleaciones, magnéticos o no.

20 A título de ejemplo de partículas inorgánicas, se pueden citar las partículas a base de sílice o de silicio, magnéticas o no.

Por el término “determinación” se entiende cualquier método que permite demostrar la presencia y/o cuantificar el analito unido a la superficie reactiva.

25 A título de ejemplo de método de determinación, se pueden citar todos los métodos tradicionales, con la ayuda de un marcador por ejemplo, en particular mediante fluorescencia, y de manera general, todas las técnicas no citadas en la presente memoria, pero equivalentes, por ejemplo colorimétricas, enzimáticas o cronogénicas.

30 La presente invención se describirá a continuación haciendo referencia al dibujo adjunto, en el que:

- la figura 1 representa, a escala ampliada, y de manera esquemática, un dispositivo de acuerdo con la invención; las figuras 2 y 3 representan una vista en sección del dispositivo según la figura 1, respectivamente según los cortes II-II y III-III; a partir de estas figuras 1 a 3 se explicará el procedimiento según la invención y sus principios,  
35

- las figuras 2 y 4 por un lado, y 5 y 6 por otro lado, representan respectivamente otros dos modos de realización de un dispositivo según la invención, siempre de manera esquemática; el detalle representado o esquematizado por la figura 6 pone en evidencia una partícula o micropartícula, tal como se considera en la presente invención, asociada a un agente de captura del analito,  
40

- las figuras 7 a 11 representan, en vista parcial y esquemática, respectivamente, otras variantes de realización de un dispositivo según la invención,

45 - la figura 12 representa, siempre de manera esquemática, lateral y parcialmente en sección, otra variante de realización de un dispositivo según la invención; la figura 13 es una vista en sección según XIII-XIII del dispositivo mostrado en la figura 12,

- la figura 14 representa, de manera esquemática, otra variante de realización de la presente invención, y

50 - la figura 15 representa, de manera esquemática, un montaje experimental, que ha permitido demostrar la pertinencia del procedimiento según la invención, usado con cualquiera de los dispositivos de micro-análisis según las figuras 1 a 14.

Haciendo referencia a la figura 1, un dispositivo según la invención comprende:

55 a) unos medios (13) para formar y/o mantener una entidad volúmica de reacción (2), por ejemplo una gota, que tiene una forma simétrica alrededor de por lo menos un eje de referencia (3); esta gota está constituida únicamente por un medio líquido, denominado a continuación medio interno (4), en el que se distribuye (en disolución y/o suspensión) un analito; esta entidad de reacción (2) presenta una interfaz (5), de perfil generalmente convexo, con un medio externo (6) diferente del medio interno, de manera que los medios interno (4) y externo (5) presentan entre sí una tensión superficial; y la interfaz (5) tiene una superficie desarrollada cerrada, alrededor del eje de referencia (3),  
60

65 b) unos medios (14 y 15) de aplicación de un intervalo de temperatura, dispuestos con relación a los medios (13) de formación y/o de mantenimiento de la entidad de reacción (2), de forma que se alinea un gradiente térmico (66) con el eje de referencia (3), a través de la entidad de reacción (2), y de manera que determina en esta última una zona denominada caliente (7) y una zona denominada fría (8), por ambos lados del eje de referencia (3); este gradiente térmico induce una variación de la tensión superficial de la interfaz (5),

## ES 2 327 619 T3

paralelamente al eje de referencia (3), lo que pone en movimiento el medio interno (4) según una trayectoria (12) cerrada de micro-convección forzada, el cual comprende una circulación axial de ida (12a), de la zona fría (8) a la zona caliente (7), y una circulación periférica de retorno (12b) de la zona caliente (7) a la zona fría (8),

5

- c) una superficie reactiva (9), obtenida a partir de un sustrato (10) sobre el cual se fija un agente reactivo (11) de unión específica con el analito (1), siendo el agente reactivo de unión distribuido y fijado (mediante enlace químico covalente y/o adsorción) sobre dicho sustrato; la superficie reactiva (9) está dispuesta con relación a los medios (13) de formación y/o de mantenimiento de la entidad de reacción (2), de manera que se pone en contacto con el medio interno (4), sobre el trayecto (12) de micro-convección forzada del medio interno (4).

10

Los medios (13) de formación y/o de mantenimiento de la entidad de reacción (2) comprenden un tubo (16), por ejemplo capilar, cuyo extremo libre abierto (16a) está adaptado para la formación y la suspensión de la entidad de reacción (2), es decir, de una gota del medio interno (4). El interior del tubo (16) está revestido de una capa (17) de un material hidrófilo, limitada en longitud o altura al extremo libre (16a), y eventualmente una capa de un material hidrófobo reviste el resto de la superficie interior del tubo (16).

15

Los medios de generación del gradiente térmico (66) comprenden unos medios de calentamiento (14) que intercambian calor con el medio interno (4) de la entidad de reacción (2), por el lado de la zona caliente (7), y unos medios de enfriamiento (15), que intercambian frío con el medio interno (4) citado anteriormente por el lado de la zona fría (8).

20

A título de ejemplo, y de manera no limitativa, los medios de calentamiento (14) y/o los medios de enfriamiento (15) comprenden un elemento metálico (18), cuyo extremo libre es puntiagudo o biselado, dispuesto coaxialmente al eje de referencia (3), y sumergido por su extremo libre en el seno del medio interno (4) de la entidad de reacción (2). Este mismo elemento metálico está unido térmicamente por el otro extremo a una fuente caliente (19), o a una fuente fría (20) según el caso. Cada una de estas fuentes puede estar constituida por un baño líquido termostataado, o por un módulo térmico con efecto PELTIER.

25

30

A título de ejemplo, los medios de calentamiento (14) o los medios de enfriamiento (15) están constituidos por el medio externo; o los medios de calentamiento (14) y/o los medios de enfriamiento (15) están constituidos por uno o unos elementos metálicos (18).

35

De manera no representada, el dispositivo según la invención comprende un recinto de confinamiento del medio externo (6), por ejemplo aire ambiente saturado en humedad.

El dispositivo descrito anteriormente permite realizar, o se integra en cualquier procedimiento para aislar el analito (1), a partir de una muestra de partida que lo contiene. Este dispositivo permite la realización de un procedimiento que comprende las etapas siguientes, independientemente de su orden cronológico.

40

- a) Formar y/o mantener la entidad volúmica de reacción (2), que tiene una forma simétrica alrededor de por lo menos el eje de referencia (3), estando esta entidad constituida únicamente por un medio líquido, o medio interno (4), en el que se distribuye el analito (1), obtenido a partir de la totalidad o parte de la muestra de partida; como se ha mencionado anteriormente, esta entidad de reacción (2) presenta una interfaz (5) con el medio externo (6), eventualmente confinado, siendo este medio externo diferente del medio interno (4), y presentando por ello con este último una tensión superficial; tal como lo muestra la figura 1, la interfaz (5) tiene una superficie desarrollada cerrada, de perfil convexo, alrededor del eje de referencia (3).

45

- b) Mediante la aplicación de un intervalo de temperatura, generar un gradiente térmico (66) según el eje de referencia (3), a través de la entidad de reacción (2), de manera que determina en esta última la zona caliente (7) y la zona fría (8); como se ha mencionado anteriormente, este gradiente térmico induce una variación de la tensión superficial a lo largo de la interfaz (5), paralelamente al eje de referencia (3), lo que pone en movimiento el medio interno (4) según la trayectoria cerrada (12) de micro-convección forzada, que comprende una circulación axial de ida (12a), de la zona fría (8) a la zona caliente (7), y una circulación periférica de retorno (12b), de la zona caliente (7) a la zona fría (8).

55

- c) Eventualmente, disponer u obtener la superficie de reacción (9), que comprende los sustratos (10) y el agente de reacción (11) de unión específica con el analito (1), siendo este agente reactivo distribuido y fijado sobre esta superficie.

60

- d) Colocar la superficie reactiva (9), sobre la trayectoria (12) de micro-convección forzada del medio interno (4).

65

Preferentemente, la entidad volúmica de reacción (2) tiene un volumen como máximo igual a 300  $\mu\text{l}$ , y preferentemente comprendido entre 0,1 y 100  $\mu\text{l}$ , por ejemplo algunas decenas de  $\mu\text{l}$ . Se usa el volumen de 5  $\mu\text{l}$ , puesto que corresponde al volumen de una gota.

## ES 2 327 619 T3

La tensión superficial del medio interno (4), con relación al medio externo (6), es por lo menos igual a 10 N/m, y preferentemente está comprendida entre  $10^{-2}$  y 1 N/m.

5 Preferentemente, el medio líquido interno comprende agua, y es por ejemplo una disolución acuosa en la que el analito (1) está suspendido y/o disuelto. Por ejemplo, tratándose de un analito de tipo ligando biológico, tal como anticuerpos o antígeno, o secuencia nucleotídica, el medio líquido interno es un tampón que comprende, además del agua, diferentes ingredientes o agentes, tales como sales, compuestos orgánicos, etc. En este caso, preferentemente, el medio externo (6) es aire cargado con vapor de agua.

10 Tal como lo muestra la figura 1, el eje de referencia (3) está dispuesto verticalmente y, llegado el caso, en correspondencia, el gradiente térmico (66) está dispuesto de abajo hacia arriba.

15 Este gradiente térmico (66) se genera por lo tanto aportando al medio interno (4) frío en la zona fría (8) de la entidad de reacción (2), y calor en la zona caliente (7) de esta misma entidad de reacción, por ejemplo con los medios descritos anteriormente, entendiéndose que el calor se puede aportar en la zona caliente (7), o extraer en la zona fría (8), mediante cualquier medio; así, el calor se puede aportar por iluminación de la zona caliente (7) con un haz infrarrojo o láser.

20 Tal como se muestra en la figura 1, se genera el gradiente térmico (66) aportando al medio interno (4) calor en la zona caliente (7) de la entidad de reacción (2), y el calor se aporta, a título de ejemplo, mediante intercambio conductivo con un elemento de calentamiento, en forma de un vástago metálico (18), dispuesto por lo menos en parte en el seno del medio interno (4), por el lado de su extremo caliente (7).

25 La superficie reactiva (9) está completamente sumergida en el seno del medio interno (4), entre la zona caliente (7) y la zona fría (8), por ejemplo lo más cerca posible al eje de referencia (3).

30 Preferentemente, la superficie reactiva (9) está posicionada lo más cerca posible al eje de referencia (3), puesto que el conjunto de las trayectorias (12) de micro-convección forzada pasan todas a este lugar, tal como se comprenderá mediante la observación de las figuras 1 a 3.

35 Para mantener la integridad de la entidad de reacción (2), y en particular asegurarle una duración de vida compatible con la duración de realización del procedimiento, la temperatura en la zona caliente (7) de la entidad de reacción (2) se mantiene a un valor inferior a la temperatura de ebullición del medio interno (4), y la temperatura en la zona fría (8) de esta misma entidad se mantiene a un valor superior a la temperatura de congelación del medio interno (4).

Según la invención, haciendo variar el gradiente térmico (66), cuyo valor nominal es, por ejemplo, igual a por lo menos 30°C, se controla la velocidad de la micro-convección forzada del medio interno (4).

40 De acuerdo con la figura 4, los medios (13) de formación y/o de mantenimiento de la entidad de reacción (2) comprenden un medio de colocación de ésta sobre un soporte plano, que puede estar constituido por un pivote hidrófilo (41), como se muestra en la figura 9, o por una zona hidrófila (42) de un soporte (43), circunscrita por una zona hidrófoba (44), como se muestra en la figura 8.

45 Mediante la expresión “pivote hidrófilo”, se entiende un pivote cuya superficie superior es hidrófila, pero no sus flancos laterales.

50 De acuerdo con la figura 5, el soporte, limitado y circunscrito a la superficie exterior de contacto con la entidad de reacción (2), forma un sustrato para el agente reactivo (11) de unión específica con el analito (1). Los medios de enfriamiento (15) están unidos térmicamente, por ejemplo mediante conducción, con el soporte (43), y por consiguiente con la superficie reactiva (9), de manera que esta última se encuentra enfriada.

Según la figura 4, el analito (1) representado esquemáticamente es una hebra constituida por una secuencia nucleotídica de interés, por ejemplo que pertenece a un agente patógeno, tal como bacteria o virus.

55 Como anteriormente, los medios de calentamiento (14) pueden estar unidos térmicamente, llegado el caso, por conducción, con la superficie reactiva (9).

60 De manera conocida en sí, tal como se muestra en las figuras 5 y 6, el analito (1) está unido a una partícula (25), comprendiendo esta última un soporte (32) y un agente de captura (33) del analito (1), unido al soporte (32). La unión entre el soporte (32) y el agente de captura y/o entre el agente de captura y el analito es lábil a la temperatura de la zona caliente (7) de la entidad (2) de reacción, y efectiva a cualquier temperatura comprendida entre la de la zona caliente (7) y la de la zona fría (8) de la entidad de reacción (2). Con el fin de determinar el analito, se distribuyen y se suspenden estas partículas (25) en el medio interno de la entidad de reacción.

65 El elemento metálico (18), que pertenece a los medios de calentamiento (14), está imantado, de manera que genera un campo magnético, permanente o temporal, en el seno del medio interno (4) de la entidad de reacción (2), permaneciendo este campo magnético espacialmente al margen de la superficie reactiva (9).

## ES 2 327 619 T3

La micro-convección forzada según la trayectoria (12), en cooperación con las propiedades citadas anteriormente del agente reactivo intermedio (25) en forma de partículas por un lado, y el campo magnético incorporado en los medios de calentamiento (14) por otro lado, tienen por efecto que:

- 5 - en la circulación axial ascendente del medio interno, las partículas (25) capturan el analito, y después están confinadas en contacto con los medios de calentamiento (14), por ejemplo el extremo del vástago (18),
- cuando entran en contacto con los medios de calentamiento, las partículas (25) lábiles se desasocian, y las partes desasociadas son arrastradas juntas en la circulación periférica descendente del medio interno, para  
10 entrar en contacto con la superficie reactiva (9),
- cuando entra en contacto con esta superficie (9), enfriada, el analito (1) se une específicamente,
- en total, como no existe prácticamente ningún volumen muerto, es decir, no afectado por la micro-convección forzada, se recoge prácticamente todo el analito (1) y es llevado al contacto con la superficie reactiva  
15 (9), y se recoge sobre esta última.

Para ello, se hará referencia a las figuras 5 y 6.

20 Cualquier partícula tal como la definida anteriormente puede ser una partícula magnética que puede ser atrapada por una fuente magnética, tal como un imán. Dicha fuente magnética está situada a nivel de o pertenece a los medios que generan la zona caliente (7).

De acuerdo con la figura 7, los medios (13) de formación y/o mantenimiento de la entidad de reacción (2), consisten  
25 en un anillo (21) suspendido por dos ramas paralelas (22), verticales y diametralmente opuestas.

De acuerdo con la figura 8, estos mismos medios (13) consisten en un vástago macizo (23) biselado y ranurado.

De acuerdo con la figura 11, el frío se aporta mediante el intercambio radiactivo y/o convección, con un emisor frío  
30 (30) dispuesto a distancia de la entidad de reacción (2), por el lado de su extremo frío (8). Por ejemplo, este emisor frío (30) consiste en un módulo plano con efecto PELTIER.

De acuerdo con las figuras 12 y 13, el medio externo (6) es una fase fluida, líquida o gaseosa. Con este fin, se prevé una placa (24) de un material plástico, en la que está practicada una cavidad de confinamiento (24a) de la  
35 entidad volumétrica de reacción (2), cuyo eje de referencia (3) está, por ejemplo, dispuesto horizontalmente. Esta cavidad de confinamiento (24a) tiene una forma aplanada o plana, y está por lo tanto dispuesta horizontalmente. Esta cavidad de confinamiento (24a) está por otro lado cerrada por una tapa o una película (50).

El dispositivo representado en las figuras 12 y 13 se puede obtener mediante cualquier técnica apropiada, en  
40 particular de micro-grabado en cualquier sustrato compatible, tal como silicio.

Tal como se muestra en la figura 13, la cavidad (24a) tiene cualquier forma apropiada, y el medio interno (4) es de forma redonda, incluso oval, preferentemente simétrica con relación al eje de referencia (3), de manera que las  
45 trayectorias (12) de micro-convección se efectúan sin esfuerzo físico.

El medio externo (6) está confinado en el seno de la cavidad (24a). Está constituido por ejemplo por aire aprisionado, creando, según un plano de corte paralelo al fondo de la cavidad (24a) y a la película (50), a nivel del medio interno (4), una interfaz redonda u ovoide con dicho medio externo (6).

De acuerdo con la figura 14, los medios (13) de formación y/o de mantenimiento de la entidad de reacción (2) consisten en un tubo cónico (16), en cuyo extremo libre (16a) están comprendidos o confundidos los medios de  
50 calentamiento (14), obtenidos por efecto resistivo, al tratarse de un tubo metálico.

De acuerdo con esta misma figura 14, un órgano de reacción móvil, por ejemplo un vástago (40), está dispuesto en el interior del tubo (16), y comprende en su extremo libre una superficie reactiva (9) que tiene una forma hidrodinámica, por ejemplo en forma de trépano. Este órgano de reacción es susceptible de desplazarse entre dos posiciones, a saber, una posición inactiva, en el exterior de la entidad de reacción (2), y una posición activa, en la que la superficie reactiva (9) está sumergida en el seno del medio interno (4) que forma la entidad de reacción (2).

Evidentemente, al final de la realización del procedimiento, se determina el analito (1) unido a la superficie reactiva (9) mediante cualquier medio apropiado, de dos maneras diferentes, a saber:

- o bien la superficie reactiva permanece en contacto con el medio interno (4), durante la determinación,
- 65 - o bien la superficie reactiva está dispuesta al margen del medio interno (4), en el momento de la determinación.

## ES 2 327 619 T3

La pertinencia de los principios de micro-análisis expuestos anteriormente se ha demostrado según el protocolo experimental siguiente:

5 En primer lugar, se dispone de un medio líquido interno (4), constituido por un tampón denominado TeNaCl, que tiene la siguiente composición: Triton X100 al 0,05%, Tris 10 mM pH8, EDTA, NaCl 1M, ADN de esperma de salmón al 0,05%.

10 En este medio líquido se dispersan y se suspenden unas microbolas fluorescentes, denominadas DIPF-8831, vendidas por la compañía MOLECULAR PROBES. La concentración de estas microbolas es del orden de 500 unidades por  $\mu\text{l}$ .

La densidad de estas microbolas es del orden de 1,05 g/ml, la cual es parecida a la densidad del medio interno (4).

15 De acuerdo con la figura 1, se dispone de un tubo metálico capilar (16), que tiene en su extremo un diámetro interno de 2 mm, cuyo extremo libre (16a) está biselado. Este extremo libre está recubierto, por el lado interior, con un revestimiento hidrófilo (17), que consiste en Bovine Serum Albumine (BSA). Este mismo extremo libre se calienta por efecto resistivo, tal como se describe o se muestra haciendo referencia a la figura 14.

20 Con el tubo (16) y el medio interno (4) ejemplificado anteriormente, en el que se suspenden las microbolas citadas anteriormente, se forma en el extremo libre (16a) una entidad de reacción (2) que tiene la forma de una gota, cuyo diámetro está comprendido entre 1 y 2,5 mm.

25 El frío se aporta, disponiendo de un elemento plano de enfriamiento (30), tal como se muestra en la figura 6, es decir, mediante intercambio radiactivo y/o convección con el extremo frío (8) de la entidad (2). Preferentemente, el intervalo de temperatura que genera el gradiente térmico (66) está regulado a un valor comprendido entre 10 y 65°C.

30 Tal como se muestra mediante el montaje experimental según la figura 15, se ilumina la entidad de reacción (2) con un haz láser He-Ne, a una longitud de ondas de 633 nm, mientras que las microbolas fluorescentes citadas anteriormente absorben a una longitud de ondas de 625 nm, y reemiten a 645 nm. La iluminación láser está colimada de manera que determina, durante su travesía de la entidad de reacción (2), un plano (27) extremadamente fino, que tiene un grosor comprendido entre 50 y 100  $\mu\text{m}$ . Este plano se observa con una cámara CDD (29), siendo las imágenes así adquiridas tratadas mediante cualquier sistema apropiado (28).

35 Gracias a este montaje experimental, se ha podido establecer y visualizar la existencia de una micro-convección forzada de acuerdo con la definición anterior, cuya velocidad varía aproximadamente de 80 a 190  $\mu\text{m/s}$ .

40 De manera general, las etapas de operación descritas y ejemplificadas anteriormente se pueden generalizar a cualquier procedimiento para aislar un analito (1) a partir de una muestra líquida de partida que lo contiene, sobre una superficie reactiva (9) en contacto con la totalidad o parte de la muestra de partida, y que consiste en efectuar las siguientes etapas:

45 1) formar y/o mantener una entidad volúmica de reacción (2), que comprende un medio líquido interno (4), que corresponde a la totalidad o parte de la muestra de partida, presentando la entidad (2) una interfaz (5) con un medio externo (6), que presenta con este último una tensión superficial,

2) aplicar un intervalo de temperatura entre por lo menos dos puntos térmicos situados:

- en la proximidad y/o

50 - en la superficie y/o

- en el seno

55 de la entidad (2), siendo dichos puntos térmicos respectivamente diferentes, en cuanto a sus temperaturas y posiciones,

3) fijar el analito (1) sobre la superficie reactiva (9), posicionada sobre la trayectoria de convección forzada generada por el intervalo de temperatura.

60 Y este procedimiento puede estar caracterizado porque comprende las siguientes etapas (1) a (3):

65 1) formar y/o mantener una entidad volúmica de reacción (2) que tiene una forma simétrica alrededor de un eje de referencia (3), constituida únicamente por el medio líquido denominado interno (4), en el que se distribuye el analito (1) obtenido a partir de la totalidad o parte de la muestra de partida, presentando dicha entidad de reacción una interfaz (5) con el medio externo (6), eventualmente confinado, diferente del medio interno, que presenta con este último una tensión superficial, teniendo dicha interfaz una superficie desarrollada cerrada alrededor de dicho eje de referencia (3),

## ES 2 327 619 T3

2) generar un gradiente térmico (66) según el eje de referencia (3), a través de la entidad de reacción (2), de manera que determina en esta última una zona caliente (7) y una zona fría (8), e induce una variación de la tensión superficial de la interfaz (5), paralelamente al eje de referencia (3), y pone en movimiento el medio interno (4) según una trayectoria cerrada (12) de micro-convección forzada, que comprende una circulación axial de ida (12a) de la zona fría (8) a la zona caliente (7), y una circulación periférica de retorno (12b) de la zona caliente a la zona fría,

3) colocar la superficie reactiva (9) sobre la trayectoria (12) de micro-convección forzada de dicho medio interno.

La superficie reactiva (9) puede comprender una superficie independiente de los puntos térmicos que generan el intervalo de temperatura (6), o una superficie que pertenece a la zona (7) o a la zona (8).

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para aislar un analito (1) a partir de una muestra de partida que lo contiene, sobre una superficie reactiva (9) en contacto con la totalidad o parte de la muestra de partida, **caracterizado** porque consiste en realizar las siguientes etapas:

10 1) formar y/o mantener una entidad volúmica de reacción (2), que comprende un medio líquido interno (4), que corresponde a la totalidad o parte de la muestra de partida, presentando la entidad (2) una interfaz (5) con un medio externo (6), que presenta con este último una tensión superficial,

15 2) aplicar un intervalo de temperatura entre por lo menos dos puntos térmicos situados:

- en la proximidad y/o

15 - en la superficie y/o

- en el seno

20 de la entidad (2), siendo dichos puntos térmicos respectivamente diferentes, en cuanto a sus temperaturas y posiciones,

25 3) fijar el analito (1) sobre la superficie reactiva (9), posicionada sobre la trayectoria de convección forzada generada por el intervalo de temperatura.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque comprende las etapas (1) a (3) siguientes:

30 1) formar y/o mantener, mientras dura dicha etapa, una entidad volúmica de reacción (2) que tiene una forma simétrica alrededor de un eje de referencia (3), constituida únicamente por el medio líquido denominado interno (4), en el que se distribuye el analito (1) obtenido a partir de la totalidad o parte de la muestra de partida, presentando dicha entidad de reacción una interfaz (5) con el medio externo (6), eventualmente confinado, diferente del medio interno, que presenta con este último una tensión superficial, teniendo dicha interfaz una superficie desarrollada cerrada alrededor de dicho eje de referencia (3),

35 2) generar un gradiente térmico (66) según el eje de referencia (3), a través de la entidad de reacción (2), de manera que determina en esta última una zona caliente (7) y una zona fría (8), e induce una variación de la tensión superficial de la interfaz (5), paralelamente al eje de referencia (3), y pone en movimiento el medio interno (4) según una trayectoria cerrada (12) de micro-convección forzada, que comprende una circulación axial de ida (12a) de la zona fría (8) a la zona caliente (7), y una circulación periférica de retorno (12b) de la zona caliente a la zona fría,

40 3) colocar la superficie reactiva (9) sobre la trayectoria (12) de micro-convección forzada de dicho medio interno.

45 3. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque la superficie reactiva (9) comprende una superficie independiente de los puntos térmicos que generan el intervalo de temperatura (6), o una superficie que pertenece a una de dichas zonas (7 u 8).

50 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque la entidad volúmica de reacción (2) es una gota.

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque el medio externo (6) es aire cargado con vapor de agua.

55 6. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque el eje de referencia (3) está dispuesto verticalmente y, por ejemplo, el gradiente térmico (6) está dispuesto de abajo hacia arriba.

60 7. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado** porque se genera el gradiente térmico (66) aportando al medio interno (4) calor en la zona caliente (7) de la entidad de reacción (2), y el calor se aporta mediante intercambio conductivo con un elemento de calentamiento (18) dispuesto por lo menos en parte en el seno del medio interno (4), por el lado de su zona caliente (7).

65 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, **caracterizado** porque la superficie reactiva (9) está sumergida en el seno del medio interno (4), entre la zona caliente (7) y la zona fría (8), por ejemplo lo más próximo al eje de referencia (3).

9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, estando el analito (1) unido a una partícula, **caracterizado** porque, en primer lugar, la partícula comprende un soporte (32) y un agente de captura (33) del analito

## ES 2 327 619 T3

(1), unido a dicho soporte (32), siendo la unión entre dicho soporte y dicho agente de captura y/o entre el agente de captura y el analito lábil a la temperatura de la zona caliente (7) de la entidad de reacción (2), y efectiva a cualquier temperatura comprendida entre la de la zona caliente (7) y la de la zona fría (8) de dicha entidad de reacción (2), y en segundo lugar, se distribuye y se suspende la partícula en el medio interno (4) de la entidad de reacción (2).

5

10. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado** porque la partícula es una partícula magnética que puede ser atrapada mediante una fuente magnética, tal como un imán.

11. Procedimiento según las reivindicaciones 2 y 10, **caracterizado** porque la fuente magnética, que puede atrapar las partículas magnéticas, está situada a nivel de los medios que generan la zona caliente (7) o pertenece a los mismos.

12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado** porque se efectúa una etapa de lectura/detección en contacto con el medio interno (4) al margen de dicho medio interno, después de la fijación del analito (1) sobre la superficie reactiva (9).

13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado** porque la temperatura de la zona caliente (7) de la entidad de reacción (2) se mantiene a un valor inferior a la temperatura de ebullición del medio interno (4), y la temperatura en la zona fría (8) de dicha entidad se mantiene a un valor superior a la temperatura de congelación de dicho medio interno (4).

14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13, **caracterizado** porque se controla la velocidad de la micro-convección forzada (12) del medio interno (4) mediante la variación del intervalo de temperatura entre las zonas caliente (7) y fría (8), cuyo valor nominal es, por ejemplo, igual a 30°C.

25

15. Dispositivo para aislar sobre una superficie reactiva (9) un analito, a partir de una muestra líquida de partida que lo contiene, **caracterizado** porque comprende:

a) unos medios (13) para formar y/o mantener una entidad volúmica de reacción (2) que tiene una forma simétrica alrededor de por lo menos un eje de referencia (3), constituida únicamente por un medio líquido, denominado interno (4), en el que se distribuye un analito, presentando esta entidad de reacción (2) una interfaz (5) con un medio externo (6) diferente del medio interno que presenta con este último una tensión superficial, presentando dicha interfaz (5) una superficie desarrollada cerrada alrededor de dicho eje de referencia (3),

35

b) unos medios (14, 15) de aplicación de un intervalo de temperatura, dispuestos con relación a los medios (13) de formación de la entidad de reacción (2), de forma que se alinea un gradiente térmico (66) con el eje de referencia (3) a través de la entidad de reacción (2), determina en esta última una zona caliente (7) y una zona fría (8), por ambos lados del eje de referencia, induce una variación de la tensión superficial de la interfaz (5), paralelamente al eje de referencia (3), y pone en movimiento el medio interno (4) según una trayectoria (12) cerrada de micro-convección forzada, que comprende una circulación axial de ida (12a), de la zona fría (8) a la zona caliente (7), y una circulación periférica de retorno (12b) de la zona caliente a la zona fría,

40

c) una superficie reactiva (9), obtenida a partir de un sustrato (10) sobre el cual se fija un agente reactivo (11) de unión específica con el analito (1), siendo el agente reactivo de unión distribuido y fijado sobre dicho sustrato, estando dicha superficie reactiva (9) dispuesta con relación a los medios (13) de formación y/o de mantenimiento de la entidad de reacción (2), de manera que se pone en contacto con el medio interno (4), sobre la trayectoria (12) de micro-convección forzada de dicho medio interno.

50

16. Dispositivo según la reivindicación 15, **caracterizado** porque los medios (13) de formación y/o de mantenimiento de la entidad de reacción (2) comprenden un medio de suspensión de esta última, seleccionado de entre el grupo constituido por un tubo (16), por ejemplo capilar, cuyo extremo libre abierto (16a) está adaptado para formar y suspender la entidad de reacción (2), un anillo (21), y un vástago macizo (23) biselado ranurado.

55

17. Dispositivo según la reivindicación 16, **caracterizado** porque el interior del tubo (16) está revestido por una capa (17) de un material hidrófilo, limitada en longitud y en altura al extremo libre (16a), y eventualmente, una capa de un material hidrófobo reviste el resto de la superficie interna de dicho tubo (16).

18. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, **caracterizado** porque los medios de generación del gradiente térmico (66) comprenden unos medios de calentamiento (14) que intercambian calor con el medio interno (4) de la entidad de reacción, por el lado de la zona caliente (7), y unos medios de enfriamiento (15) que intercambian frío con el medio interno (4), por el lado de la zona fría (8).

60

19. Dispositivo según la reivindicación 18, **caracterizado** porque los medios de calentamiento (14) y/o los medios de enfriamiento (15) comprenden un elemento metálico (18) dispuesto coaxialmente al eje de referencia (3), sumergido por un extremo en el seno del medio interno (4) de la entidad de reacción (2), unido térmicamente por el otro extremo a una fuente caliente (19) o a una fuente fría (20) según el caso.

65

## ES 2 327 619 T3

20. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, **caracterizado** porque los medios de calentamiento (14) o los medios de enfriamiento (15) están constituidos por el medio externo.

5 21. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, **caracterizado** porque los medios de calentamiento (14) y/o los medios de enfriamiento (15) están constituidos por uno o unos elementos metálicos (18).

10 22. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21, **caracterizado** porque un elemento imantado está presente de manera que genera un campo magnético, permanente o temporal, en el seno del medio interno (4) de la entidad de reacción (2), alejado espacialmente de la superficie reactiva (9).

20 23. Dispositivo según la reivindicación 22, **caracterizado** porque el elemento imantado está constituido por un elemento metálico (18).

15 24. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 23, **caracterizado** porque el medio externo (6) es una fase (24) gaseosa o líquida, inerte frente al medio interno (4), dispuesta en el seno de una cavidad de confinamiento (24a) de la entidad volúmica de reacción (2), cuyo eje de referencia (3) está dispuesto por ejemplo horizontalmente.

20 25. Dispositivo según la reivindicación 24, **caracterizado** porque la cavidad de confinamiento (24a) tiene una forma aplanada o plana.

25 26. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, **caracterizado** porque los medios de enfriamiento (15) y/o de calentamiento (14) están unidos térmicamente, por ejemplo mediante conducción, con la superficie reactiva (9).

30 27. Dispositivo según la reivindicación 15, **caracterizado** porque comprende un órgano de reacción, por ejemplo un vástago (40), que comprende en un extremo libre la superficie reactiva (9), susceptible de desplazarse, por ejemplo según el eje de referencia (3), entre dos posiciones, a saber, una posición inactiva, en la que la superficie reactiva (9) permanece en el exterior de la entidad de reacción (2), y una posición activa, en la que la superficie reactiva (9) está sumergida en el seno del medio interno (4).

35 28. Dispositivo según la reivindicación 15, **caracterizado** porque los medios (13) de formación y/o de mantenimiento de la entidad de reacción (2) comprenden un medio de colocación de esta última, seleccionado de entre el grupo constituido por un pivote (41) y/o una zona hidrófila (42) de un soporte (43), circunscrita por una zona hidrófoba (44).

40 29. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 27, **caracterizado** porque la superficie reactiva (9) tiene una forma hidrodinámica.

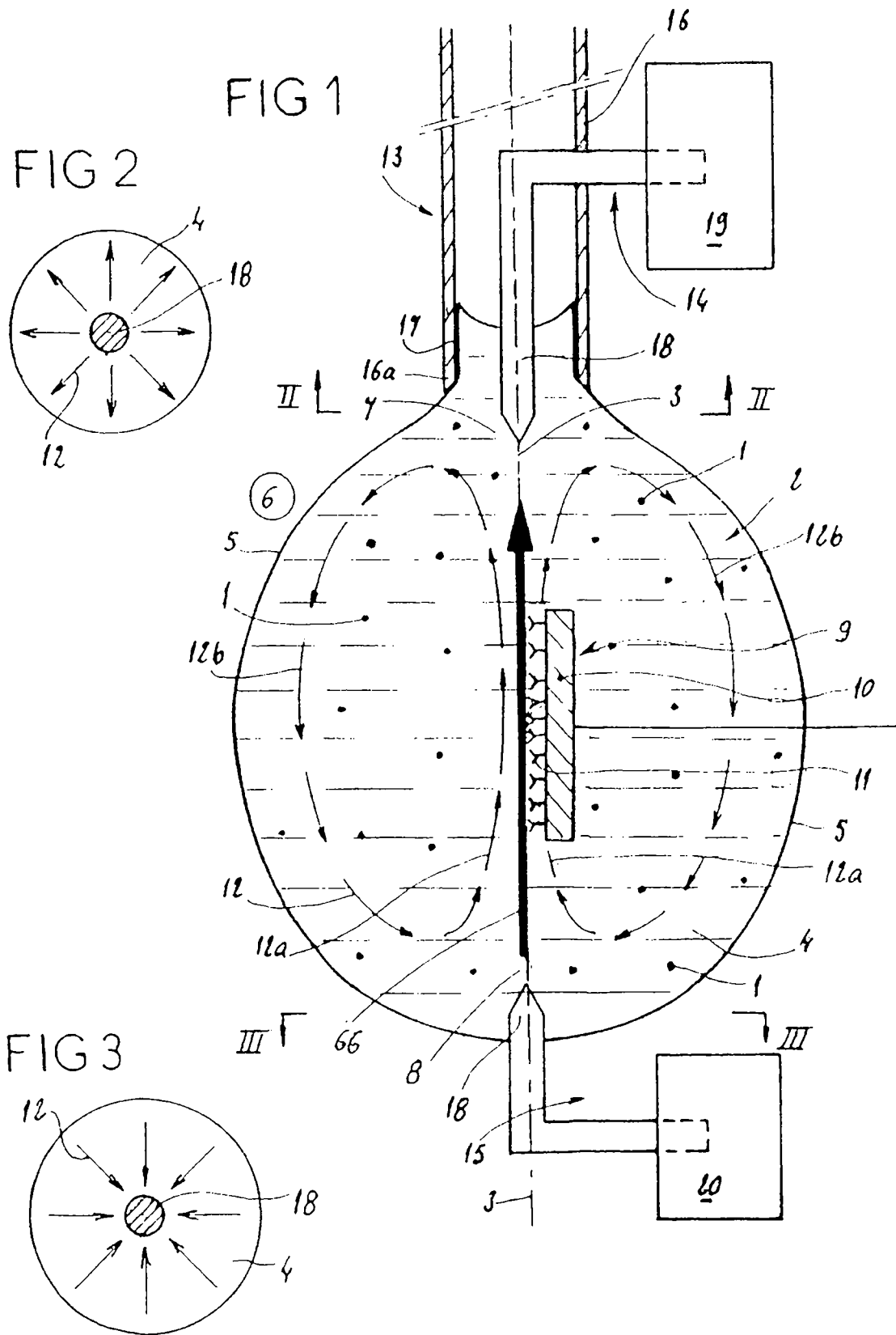
45

50

55

60

65



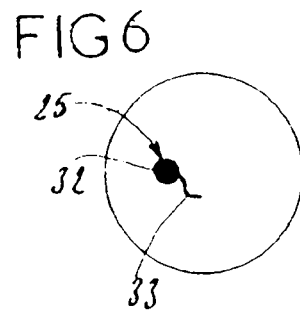
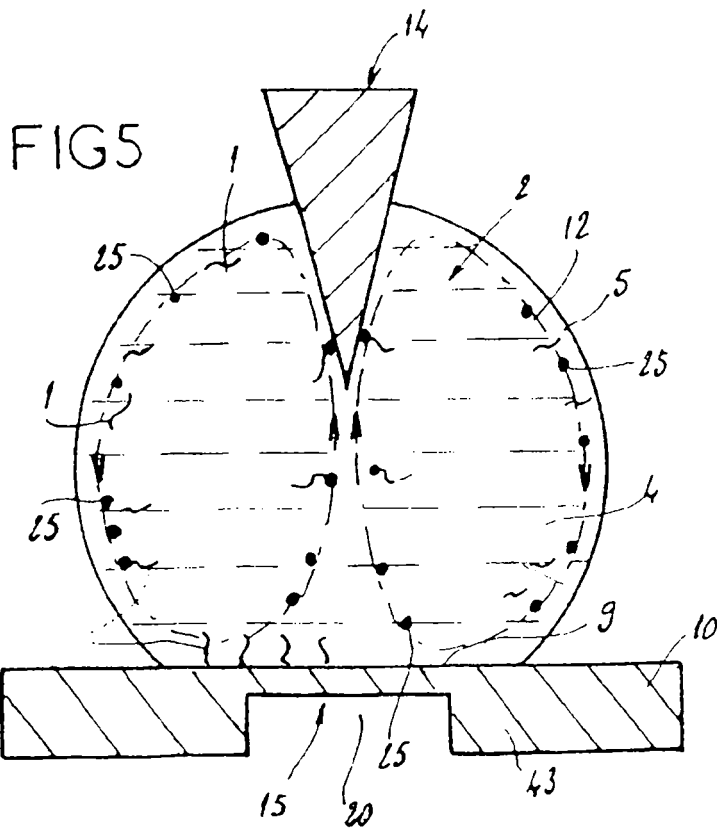
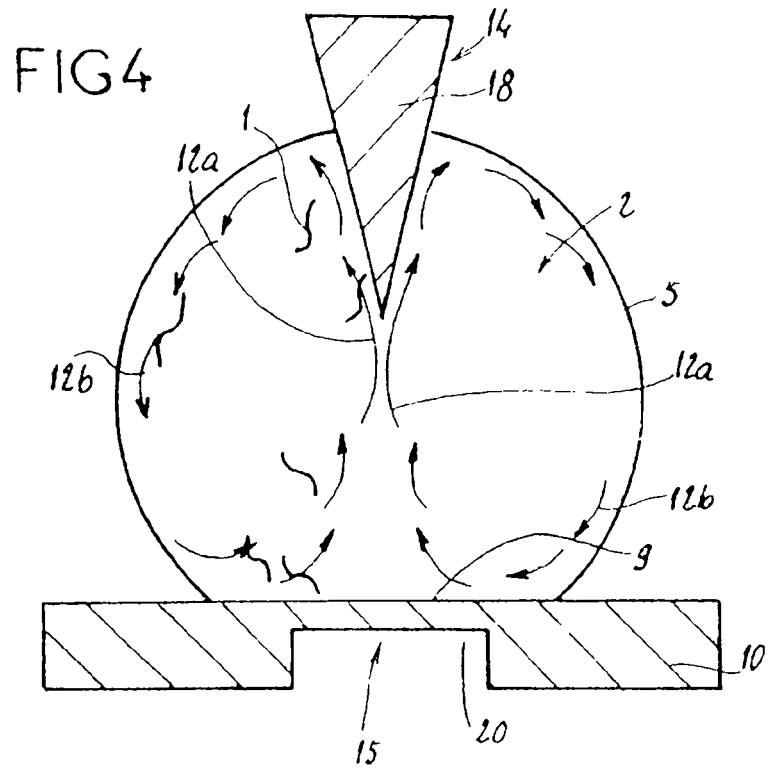


FIG 7

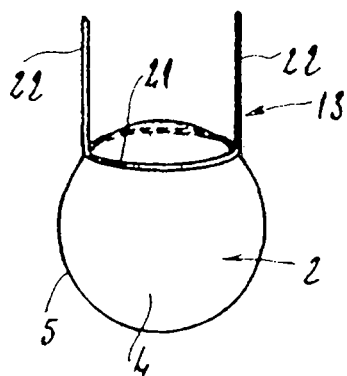


FIG 8

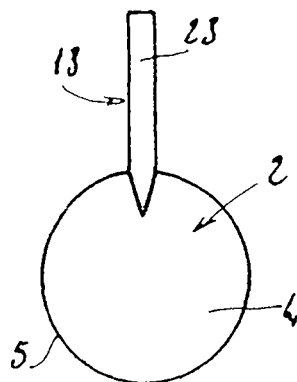


FIG 9

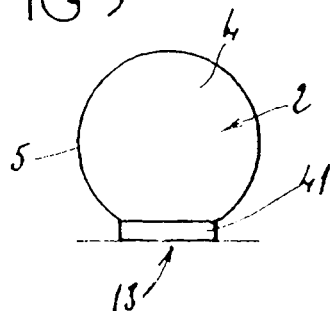


FIG 10

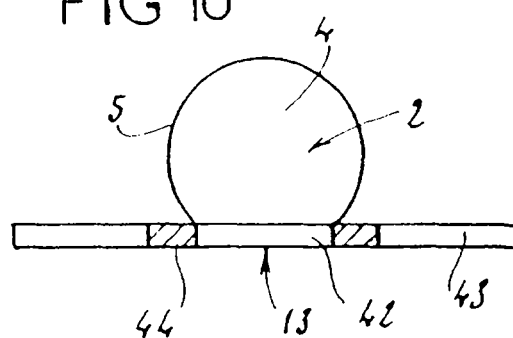
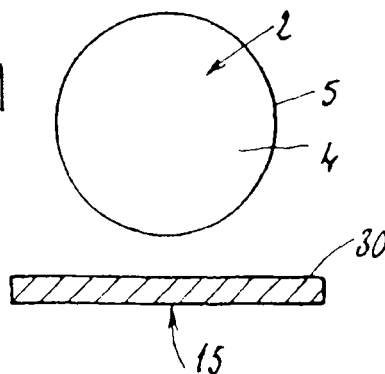


FIG 11



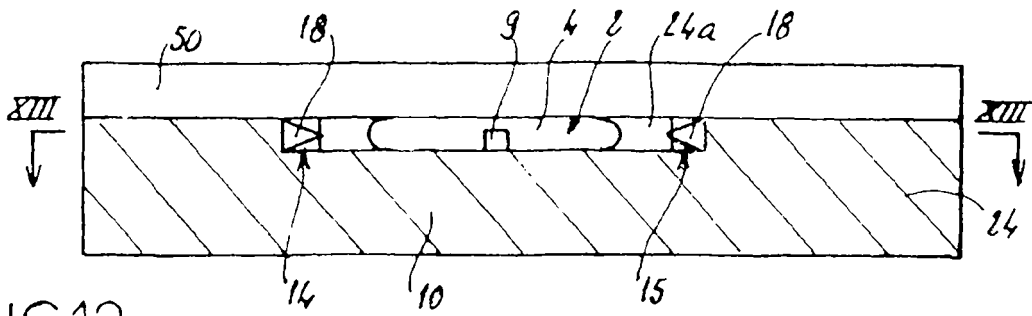


FIG 12

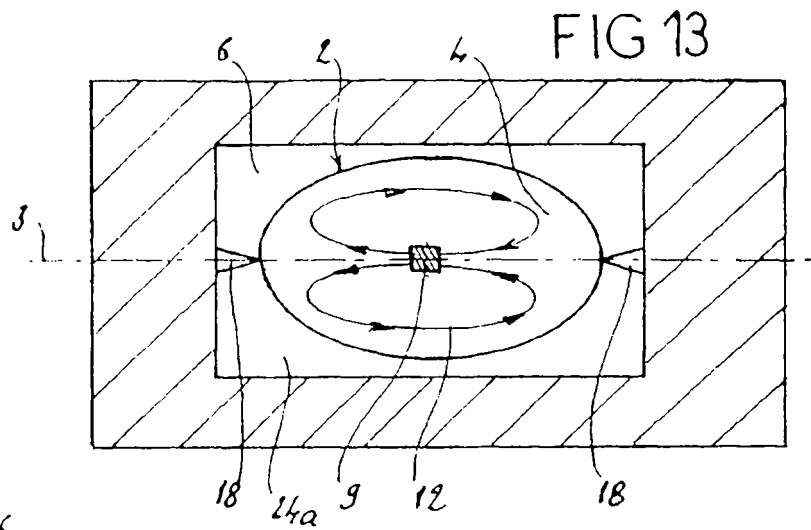


FIG 13

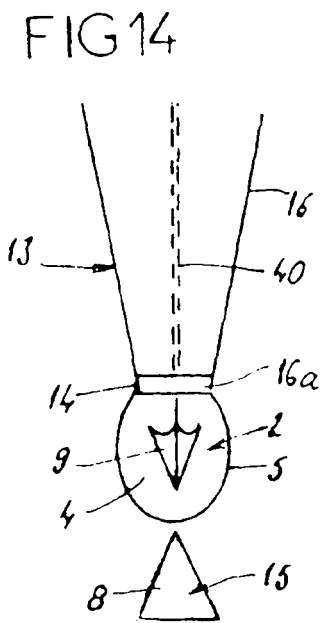


FIG 14

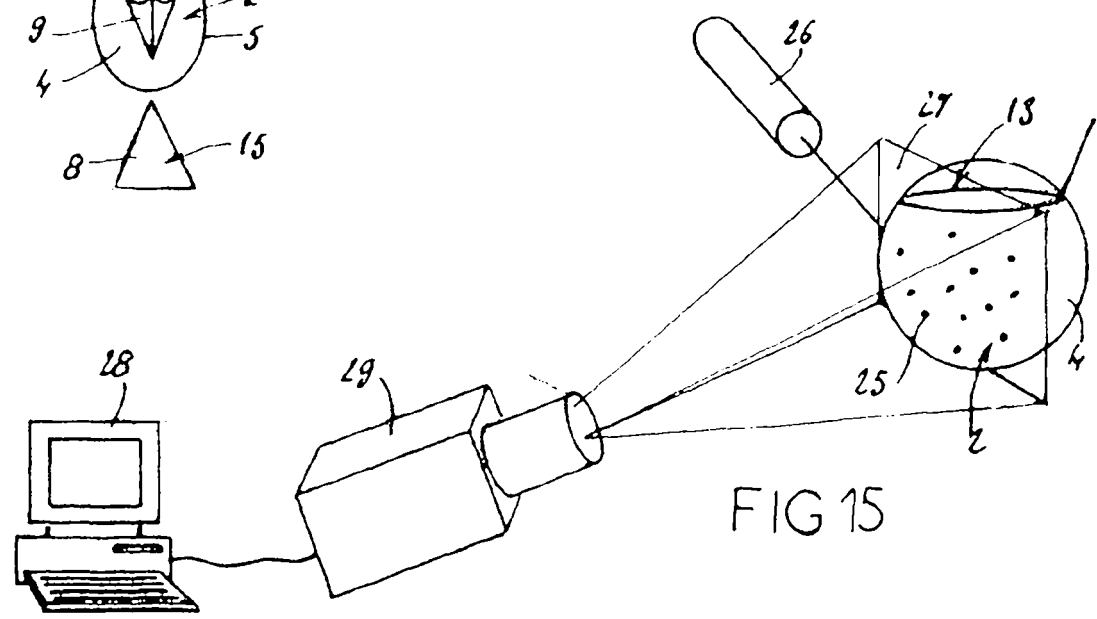


FIG 15