



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 662**

51 Int. Cl.:
G01N 27/447 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04786364 .2**
96 Fecha de presentación : **27.08.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1668365**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.06.2006**

54 Título: **Dispositivo para separar y/o analizar varias dianas moleculares disueltas en una mezcla compleja.**

30 Prioridad: **24.09.2003 FR 03 11204**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.07.2011

73 Titular/es: **Commissariat à l'Énergie Atomique et
aux Énergies Alternatives
Bâtiment "Le Ponant D"
25, rue Leblanc
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es: **Ugolin, Nicolas;
Chevillard, Sylvie;
Ory, Catherine y
Lebeau, Jérôme**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 362 662 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

Dispositivo para separar y/o analizar varias dianas moleculares disueltas en una mezcla compleja

5 **Antecedentes de la invención**

10 La invención se refiere a un dispositivo para separar y/o analizar varias dianas moleculares disueltas en una mezcla compleja, en particular ácidos nucleicos o proteínas. La invención se refiere en concreto a un dispositivo que comprende un chip o matriz organizada de sondas de biopolímeros, para la separación o el análisis de dianas moleculares. Un dispositivo de este tipo separa y/o detecta varias dianas moleculares disueltas en una mezcla compleja. De acuerdo con un primer modo de realización la invención comprende un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1.

15 La invención también se refiere a los usos de un dispositivo de este tipo, en particular para la separación y/o el análisis de moléculas de ADN o de ARN contenidas en una muestra biológica.

20 Se sabe determinar la masa de las macromoléculas como el ADN, el ARN o las proteínas, a partir de un análisis de espectrometría de masa. Si el análisis mediante este procedimiento se acompaña de una descomposición controlada de las moléculas, también se puede determinar su secuencia. No obstante, para las mezclas de moléculas de tamaños y secuencias diferentes, mediante esta técnica resulta difícil e incluso imposible discriminar entre las diferentes moléculas.

De forma alternativa a la detección mediante espectrometría de masa, se pueden utilizar otros métodos.

25 De este modo, la resonancia de plasmones superficiales (SPR) permite determinar la densidad de materia acumulada a una pequeña distancia (menos de 200 nm) de la superficie de una lámina de bajo espesor (x nm) de metal con electrón libre como el oro o el platino... En efecto, la reflexión sobre una de las caras de la lámina de metal se modifica de forma proporcional a la densidad y a la cantidad de materia que se encuentra cerca de la otra cara. No obstante, realmente no es posible distinguir entre los diferentes tipos de moléculas que contribuyen a la modificación de la reflexión. Por otra parte, mediante este método, la sensibilidad de detección de la fijación de las dianas sobre los biochips es inferior, por el momento, a la sensibilidad que se alcanza en fluorescencia con moléculas marcadas. La presencia misma de las sondas sobre la superficie del metal disminuye la sensibilidad de detección alejando las dianas del metal. Durante las mediciones dinámicas de la interacción diana/sonda, la presencia de las moléculas diana libres cerca de la superficie falsea la medición. La detección mediante los métodos de SPR necesita, por lo general, para resultar eficaz una cantidad mayor de materiales de la que necesitarían los métodos de marcados fluorescentes o radioactivos. Por esta razón la detección mediante SPR es todavía incompatible con un cierto número de experimentos, en particular en el campo de la diagnosis.

40 Por otra parte, se puede recurrir a la medición de la variación de impedancia que existe entre diferentes estados de moléculas.

45 Una molécula de ADN de cadena simple de una secuencia dada no tiene la misma impedancia que el complejo emparejado de doble cadena correspondiente. Esta propiedad se utiliza en los chips de ADN para evaluar la proporción de hibridación y, por lo tanto, el número de complejos sonda-diana formados en un biochip (ref.). De una manera general, las variaciones de impedancia se pueden utilizar para estudiar las interacciones intermoleculares como la fijación de un ligando sobre su receptor, pero también las interacciones entre moléculas de ADN o de proteínas con una droga, un ión... No obstante, para los biochips, este método de detección se ve limitado:

- 50 1) Por la dificultad de realizar chips de altas densidades, de más de 2.000 puntos de hibridación. En efecto, debido al tamaño de los electrodos y a la geometría de los elementos de conexión que se utilizan para realizar los chips de impedancia, la superficie de hibridación resulta muy grande en cuanto el número de puntos de hibridación supera los 800. Ahora bien, una gran superficie de hibridación implica un gran volumen de la muestra que debe cubrir la superficie de hibridación, de ahí la necesidad de una gran cantidad de material biológico para alcanzar la concentración mínima para la detección. Esto es incompatible con los experimentos en los que se dispone de poco material, como es el caso de los diagnósticos.
- 55 2) Por los cambios de conformación de las moléculas que se estudian (sonda y/o diana) que implican unos aparatos de medición que hacen que no se puedan interpretar las variaciones de impedancia medidas. Por ejemplo, las deformaciones del ADN debidas a la secuencia o las hibridaciones intramoleculares provocan
- 60 unas variaciones de impedancia del mismo orden de importancia que en el caso de la hibridación.

65 En la técnica anterior se utilizan transistores de efecto de campo como amplificadores de corriente para medir la variación de impedancia ligada a la hibridación de la molécula de ADN (ref.). El anclado de las sondas se realiza al nivel de la rejilla del transistor. Cuando las dianas se fijan, estas modifican la impedancia de la rejilla lo que implica una modificación de la corriente entre la fuente (entrada del transistor) y el drenaje de salida del transistor. Sin embargo, no se ha descrito ninguna organización en red para este tipo de detector. El hecho de utilizar el transistor

de efecto de campo como amplificador de corriente limita la frecuencia de las corrientes alternativas que se pueden utilizar para resaltar las variaciones de impedancia ligadas a la hibridación, que limita por lo tanto la sensibilidad del detector (ref.). Además, en las descripciones anteriores, la rejilla controla el paso de la corriente dentro del transistor, y el hecho de anclar las sondas en su interior elimina la posibilidad de utilizar los diferentes bornes del transistor como electrodos para controlar el movimiento de las dianas y, por lo tanto, para dirigir la hibridación concentrando las dianas al nivel de las sondas.

Las matrices organizadas de sondas de biopolímeros (chips de ADN, chips de proteínas, etc.) permiten separar de manera cualitativa y cuantitativa los biopolímeros que están presentes en una mezcla y esto, en teoría, sean cuales sean su número, sus secuencias y sus composiciones. Sin embargo, las redes de ácidos nucleicos, por ejemplo, no permiten contar de manera total y precisa el número de moléculas hibridadas. Por otra parte, con la tecnología de la que se dispone en la actualidad, la detección de los biopolímeros en chips (« micro-arrays ») es indirecta, necesitando de una etapa de marcado de estos (fluorescencia, radioactividad...). Si los rendimientos de incorporación de residuos radiomarcados y de residuos fríos en los biopolímeros son prácticamente los mismos, no sucede lo mismo con los marcadores fluorescentes (Martínez y otros – Nucl. Acids. Res. 2003 31: p. 18; Hoen y otros – Nucleid Acids Res. 2003 Mar 1; 31 (5); p. 20). Los inconvenientes de los marcados se encuentran en particular en el caso de la síntesis de las moléculas de ADNc que incorporan los marcadores fluorescentes CY3 y CY5. El amontonamiento estérico que se deriva de este último tipo de marcado puede, por otra parte, modificar de forma importante las cinéticas y los equilibrios estequiométricos de las reacciones (hibridación, reacción anticuerpos-antígenos, reacción diana-ligando en general...). Los inconvenientes de los amontonamientos estéricos se eliminan por medio del empleo de isótopos radioactivos; no obstante, los isótopos radioactivos implican una gestión de los desechos radioactivos. Por otra parte, las tecnologías de detección de moléculas marcadas de forma radioactiva, es decir, esencialmente de tipo phosphorimager para la radioactividad (Bertucci, F. y otros – Hum Mol Genet. 1999 Sep; 8 (9): 1715-22. Fe de erratas en: Hum Mol Genet 1999 Oct; 8 (11); p. 2129) y los diferentes tipos de escáner para la detección de la fluorescencia presentan un cierto número de límites en cuanto a la cantidad de material biológico que hay que hibridar en un chip para alcanzar los umbrales de detección y de reproducibilidad de las mediciones realizadas. De hecho, no es posible detectar las moléculas presentes en algunas copias por célula a partir de muestras que presentan un reducido número de células (~ 1.000 células), lo que corresponde sin embargo a una situación frecuente en el caso de los muestreos clínicos.

Una alternativa a la utilización de chip de ADN clásico consiste en funcionalizar el interior de un capilar con unas sondas dispuestas en coronas todo a lo largo, cada corona estando formada por un tipo de sonda específica para un gen. El pequeño diámetro del capilar (- 100 μm) permite reducir, en teoría, el volumen de muestra analizable y, por lo tanto, alcanzar la concentración detectable mediante la fluorescencia, por ejemplo, con una menor cantidad de materiales biológicos marcados. No obstante, incluso disminuyendo el volumen de la reacción, la concentración de cada diana que se hibrida al nivel de una corona de sondas depende del conjunto del volumen del capilar. Cuanto más aumenta el número de sondas, mayor debe ser la longitud del capilar y mayor es la cantidad necesaria de material (por ejemplo de muestra para analizar) para alcanzar una concentración detectable (el volumen del capilar siendo proporcional a la longitud). Los problemas ligados al marcado de las muestras siguen siendo los mismos que con la utilización de los capilares. Además, la fabricación de un capilar funcionalizado con una gran cantidad de sondas diferentes es complicada y costosa.

Por último, los chips de ADN o de proteínas que se han descrito en la técnica actual son, por lo general, de un solo uso, lo que genera unos costes de utilización muy elevados para cada ensayo. El hecho de que sean de un solo uso limita en gran medida la generalización de estas técnicas en los estudios y ensayos clínicos de cara a la realización de diagnósticos.

El documento D1 : WO2004059301 (figuras 1A-1E) da a conocer un dispositivo para separar y/o detectar varias dianas moleculares disueltas en una mezcla compleja, que comprende una red de capilares 36 que permite la circulación de la mezcla compleja introducida en el dispositivo, un juego de electrodos 33 dispuesto por debajo de los capilares y un electrodo no funcionalizado 62 dispuesto por encima de los capilares. Los electrodos se funcionalizan en el juego de electrodos 33 de tal modo que se anclan con sondas organizadas en puntos de hibridación definidos por las zonas 58, cada sonda siendo susceptible de retener una diana molecular específica presente en la mezcla compleja mediante unión específica sonda-diana. Se inyecta una solución dentro de los capilares respectivos por medio de unas agujas 42. Las uniones entre las dianas y las sondas se detectan por medio de la SPR de tal modo que se liberen unas señales por medio de un CCD 54.

La presente invención proporciona un dispositivo que permite separar y/o analizar dianas moleculares específicas presentes en una mezcla compleja y, en particular, biopolímeros como moléculas de ARN, de ADN o proteínas. El dispositivo de la invención se puede volver a utilizar en un gran número de experimentos y permite medir unas concentraciones de producto del orden del átomo (10^{-18}) e incluso del zeptomol (10^{-21}). Estos límites pueden permitir identificar moléculas presentes con una sola copia por célula a partir de un número limitado de células, por ejemplo, de un millar e incluso de un centenar de células. Por otra parte, de acuerdo con algunos modos de realización de la invención, el dispositivo permite realizar análisis comparativos y, por lo tanto, analizar varias muestras de forma simultánea. De acuerdo con otro modo de realización, el dispositivo permite determinar de forma directa la secuencia de los ácidos nucleicos o de las proteínas retenidas por las sondas, por ejemplo, al nivel de cada

microcolumna de la matriz o del punto de hibridación en la matriz.

La invención se refiere, por lo tanto, a un dispositivo para separar y/o analizar varias dianas moleculares disueltas en una mezcla compleja de acuerdo con la reivindicación 1.

En caso preciso, unos sistemas de electrodos permiten guiar o desplazar las dianas por las redes.

Por el término « capilar » hay que entender cualquier canal apropiado para permitir la circulación de fluidos, con un diámetro inferior a 1 milímetro, de preferencia comprendidos entre 1 y 100 μm .

En el sentido de la invención, se entiende por « separación de dianas moleculares en una mezcla compleja » la operación que permite obtener en unos volúmenes distintos unas soluciones enriquecidas con moléculas específicas, o dianas moleculares, presentes de forma inicial en una mezcla compleja. Por « enriquecidas » hay que entender que las dianas moleculares representan al menos un 50 % de las moléculas presentes en la solución obtenidas tras la separación, de preferencia un 80 % y de forma aun más preferente al menos un 90 %.

Se entiende por « análisis de las dianas moleculares » la operación que consiste en identificar la presencia de la diana molecular (detección) y/o la cantidad relativa o absoluta de esta diana molecular en la mezcla compleja que hay que analizar (dosificación).

Por la expresión « mezcla compleja » hay que comprender en el sentido de la invención una solución que contienen un número de moléculas con estructuras diferentes, en concreto una mezcla de 100 moléculas que tienen estructuras diferentes. El dispositivo de la invención está destinado de forma más preferente a la separación y/o el análisis de moléculas biológicas (o biomoléculas), que se encuentran en particular en una muestra de origen biológico.

Más en particular, puede tratarse de una muestra resultante de un muestreo de tejidos o de un fluido biológico como la sangre, el plasma, el líquido cefalorraquídeo, la orina o la saliva. El muestreo se puede realizar en un animal (en concreto en un mamífero y de preferencia en el hombre). El muestreo se puede realizar en concreto en un individuo sano o en un paciente afectado por alguna patología. La patología puede ser en particular un cáncer, una patología neurodegenerativa, una patología infecciosa y, en concreto, una patología viral, bacteriana o parasitaria. La muestra también puede contener un extracto de tejido o un extracto celular, procedente de células eucariotas o procariotas, de bacterias, de hongos o de levaduras, en particular de células en cultivo o de células muestreadas en el medio ambiente externo. La muestra también se puede obtener a partir de un muestreo realizado en un vegetal. También puede tratarse de un muestreo realizado en un producto agroalimentario, en particular en alimentos cocinados a partir de semillas, de frutos o de cereales.

Se puede emplear de este modo el dispositivo en aplicaciones diversas, en particular en el diagnóstico médico o el control de calidad agroalimentaria, o incluso en cualquier análisis biológico en particular en los campos de la ecología, de la arqueología o de la criminología.

Cada microcolumna comprende un pocillo con una forma cualquiera, por ejemplo, de forma tubular que presenta de preferencia un diámetro de entre 2 y 1.000 μm , de preferencia de entre 20 y 100 μm , y una longitud de entre 2 y 2.000 μm , de preferencia de entre 40 y 200 μm .

Cada pocillo está conectado por un primer extremo a un capilar de la primera red de capilares y a un capilar de la segunda red de capilares por su extremo opuesto, de tal modo que se puede hacer que un flujo que circula por la red de capilares atraviese el conjunto de los pocillos.

Un dispositivo conocido está formado, por lo general, por una matriz de N líneas y de P columnas de pocillos dispuestas en un mismo plano. Los pocillos pueden tener cualquier inclinación con respecto a este plano, pero son de preferencia paralelas o perpendiculares al plano de la matriz por cuestiones prácticas. Por razones de amontonamiento, los pocillos se pueden disponer en cualquier línea de cada dos.

Los pocillos se pueden grabar o moldear en particular en el espesor de la superficie de un material apropiado, como el vidrio, el silicio, el plástico, el Kaptón, el carbono, el oro o cualquier otro material que forme el plano de la matriz.

La matriz de microcolumnas se forma de este modo por un gran número de pocillos, por ejemplo entre 1 y un millón de pocillos, de preferencia entre 100 y 100.000 pocillos, que permiten de este modo la separación y/o el análisis de una gran cantidad de dianas moleculares específicas susceptibles de encontrarse en una misma muestra.

Las sondas moleculares se disponen y se inmovilizan dentro de cada pocillo, de preferencia, a razón de una sonda de especificidad particular dentro de cada pocillo, formando de este modo unas microcolumnas de cromatografía, susceptibles de retener, cada una, una diana molecular específica.

El término « inmovilizadas » significa, en el sentido de la invención, que las sondas se mantienen dentro de los

pocillos, en particular en presencia de un campo eléctrico, magnético o de un flujo circulante, previamente inyectado dentro de la red de capilares, que entra del dispositivo cuando este atraviesa la microcolumna que contiene las sondas moleculares.

5 El dispositivo se compone de este modo de microcolumnas donde cada microcolumna consta de una gran cantidad (por ejemplo de entre 10^6 y 10^{10}) de sondas con la misma especificidad, inmovilizadas y aptas para unir de forma específica, en unas condiciones apropiadas, las dianas moleculares correspondientes. Se hace referencia a estas sondas a continuación con el término « sondas moleculares ». El término « unión específica » en referencia a la
10 unión de una sonda con una diana contenida en la mezcla compleja significa que la sonda se une con una diana particular, pero no se une de forma significativa con las otras moléculas y más en particular con las otras dianas presentes en la mezcla compleja.

15 Las parejas sondas-dianas preferentes son en particular los ácidos nucleicos que se hibridan con secuencias complementarias como moléculas mensajeras de ARN, de ADN o de ADNc que se hibridan con sondas de oligonucleótidos específicos, con antígenos que reconocen de forma específica las sondas formadas por anticuerpos o con sus fragmentos funcionales, o con cualquier otra pareja receptor-ligando o viceversa.

20 El experto en la materia podrá adaptar dicho dispositivo para la separación y/o el análisis de cualquier tipo de moléculas dado que es posible asociar una entidad que las reconoce de forma específica, constituyendo una sonda molecular, las moléculas dianas siendo capaces de unirse de forma específica a dicha sonda molecular inmovilizable sobre un soporte.

25 La inmovilización de las sondas dentro de cada uno de los pocillos se podrá obtener, por ejemplo, por medio de una interacción fuerte con un elemento que no puede salir del pocillo. El modo de emparejamiento consistirá, por ejemplo, en una inmovilización de las sondas en la pared interna del pocillo, en particular mediante enlace covalente o cualquier otra interacción fuerte.

30 De forma alternativa, las sondas moleculares se pueden fijar sobre partículas cuya estructura es de tal modo que estas no se pueden escapar de su pocillo (Huang y otros – Anal. Chem.; 2002; 74 (14); p. 3362-3371; Ugolin y otros – FR 0015398 noviembre de 2000). El diámetro medio de las partículas será superior, por ejemplo, al diámetro de los capilares a la entrada y a la salida de cada microcolumna. La retención de las partículas dentro del pocillo se puede hacer eventualmente mediante interacción magnética entre las partículas y una parte de la pared interna del pocillo, si las partículas son capaces de experimentar o producir una atracción magnética y si una parte de la pared
35 del pocillo es, a la inversa, capaz de producir o de experimentar una atracción magnética.

Las sondas moleculares se inmovilizan dentro de un gel contenido dentro de cada pocillo, que impide la migración de dichas sondas moleculares fuera de la microcolumna. Las sondas moleculares se retienen, por ejemplo, mediante interacción fuerte o enlace covalente con las moléculas que forman el gel.

40 Cada pocillo se rellena con un gel y las sondas moleculares se emparejan con partículas cuyo diámetro es superior al tamaño de la malla del gel, que permite la inmovilización de las partículas dentro de las microcolumnas y, por ello, la inmovilización de las sondas moleculares que están emparejadas con estas.

45 Se puede utilizar cualquier método adecuado para emparejar las sondas moleculares con las partículas o con la pared interna del pocillo. A título de ejemplo, se citará en particular el acoplamiento no covalente de tipo biotina-avidina entre unas sondas moleculares emparejadas con la biotina y unas esferas funcionalizadas con avidina, como las que se comercializan como « Dynal » (Dynal distributors worldwide, copyright 1996 Dynal AS – Technical Handbook second edition).

50 De una manera general, todos los tipos de acoplamientos, enlaces químicos, interacciones fuertes que se han descrito para las columnas de cromatografía pueden eventualmente resultar adecuados.

55 Las sondas se pueden fijar en concreto directamente sobre los polímeros de un gel contenido dentro de cada microcolumna.

60 En el caso en que la sonda sea un ácido nucleico, para el acoplamiento covalente de estas sondas con una partícula, se puede sintetizar un heteropolímero poli X/sonda como el polipirrol ácido nucleico. En efecto, las sondas moleculares de ácidos nucleicos unidas al pirrol en 5' o en 3' presentan la particularidad de polimerizar con unas moléculas libres de pirrol, que forman de este modo un heteropolímero, los heteropolímeros con un tamaño lo suficientemente importante pudiendo hacer la función de las partículas que se han descrito con anterioridad.

65 Otra alternativa es la utilización de sondas de ácidos nucleicos unidos en 5' y/o en 3' con unos agentes reticulantes como los psoralenos. Las secuencias de las sondas se pueden presentar en forma de: psoraleno 5' (Y1) Xn (Y2) 3'. Xn representa la sonda propiamente dicha e Y1 e Y2 son las secuencias seleccionadas de tal modo que las sondas se puedan concatenar sin límite las unas a las otras por complementariedad. Por ejemplo, las sondas que hay que polimerizar podrán estar formadas por una mezcla equimolar de psoraleno 5' (T) mXn (A) m3' con m = 5. Por la

acción de rayos ultravioletas, las sondas se polimerizan en una macro molécula (poli 5' (T) mXn (T) m3 psoraleno 3' (A) m (X) n (A) m5'...) que se puede retener dentro de cada pocillo.

5 En el caso de una fijación de las sondas directamente a la pared del pocillo, también pueden resultar adecuados todos los tipos de interacciones que se han descrito con anterioridad. En concreto, las interacciones que se utilizan de forma habitual en los chips de ADN para fijar las sondas de ácido nucleico, o los chips de proteínas para fijar las sondas de polipéptidos también se pueden adaptar (interacción electrostática lisina/ácido nucleico, fijación silana, polimerización del pirrol en la superficie del pocillo, fijación psoraleno, etc.), del mismo modo que los métodos de síntesis *in situ* sobre esferas o en la pared de los pocillos. También se podrá considerar la utilización de nylon o de nitrocelulosa para fijar las sondas de forma irreversible en las partículas o en las paredes de los pocillos (partículas o paredes que están por tanto realizados con estos materiales). La fijación puede ser directa o hacerse por medio de un enlace cruzado, como un enlace psoraleno entre una partícula de nylon y la sonda molecular.

15 También se puede considerar realizar una retención mecánica de las sondas moleculares emparejadas con las partículas dentro del pocillo, mediante la utilización de filtros agujereados por poros con un diámetro lo suficientemente pequeño (por ejemplo, un diámetro inferior al diámetro de las partículas filtradas). Este tipo de filtros se usan de forma habitual y están comercializados (filtro teflón, etc.).

20 La inmovilización de las sondas moleculares sobre su soporte debe ser lo suficientemente fuerte como para resistir los diferentes tratamientos que se aplican y los eventuales campos eléctricos que se utilizan para manipular las dianas.

25 Cuando el dispositivo que se presenta comprende una o dos redes de capilares unidas a unos electrodos que permiten controlar la elución y/o la migración de las dianas que hay que analizar, las sondas se pueden fijar sobre los electrodos mediante cualquiera de los procedimientos químicos que se han descrito para fijar las sondas sobre un soporte de biochip. En el caso de electrodos de ITO (o cualquier otra aleación transparente, ATO, ZNO, FTO), se puede realizar un depósito directo de las sondas que poseen un grupo hidrófilo como PO₃⁻ (véase ref.) como es el caso para los ácidos nucleicos.

30 Es necesario aislar las partes de los electrodos que no han recibido anclado de sonda, mediante un procedimiento de encapsulación. Por ejemplo, se puede utilizar una película de polipirrol. La película se realiza sometiendo a los electrodos a tensión en presencia de una solución de pirrol. El pirrol polimeriza de forma espontánea por la acción de la corriente y aísla las partes libres de los electrodos. Tras el anclado de las sondas, los electrodos también se pueden saturar con un oligonucleótido monótono (ejemplo poli A) que no se puede hibridar con las dianas.

35 **También se ha dado a conocer un procedimiento de fijación de un polímero de ácido nucleico sobre un electrodo de ITO mediante adsorción directa.**

40 Cuando el dispositivo consta de dos redes de capilares, este permite la circulación de la mezcla que hay que analizar a través del conjunto de las microcolumnas. Las dianas correspondientes se retienen de forma específica en cada microcolumna. A continuación se eluyen, es decir, se sueltan de las sondas moleculares a las que estaban unidas de forma específica, y luego migran hacia uno o varios detectores alcanzando la red de capilares a la salida de las microcolumnas.

45 Teniendo en cuenta el gran número de microcolumnas, se comprende con facilidad que puede resultar ventajoso para un análisis secuencial de las dianas poder controlar de forma separada la elución y/o la migración al nivel de cada microcolumna o al menos de grupos distintos de microcolumnas, por ejemplo, línea por línea en el caso de una matriz de N*P microcolumnas, como se describe en el ejemplo preferente.

50 Las redes de capilares están, por ejemplo, grabadas o moldeadas en materiales como el sílice, los plásticos (plexiglass, por ejemplo) según unas técnicas de erosión al ácido en el caso del sílice o de mecanizado por laser en el caso de los plásticos, conocidas por el experto en la materia.

55 Cada red de capilares se graba en el espesor de una placa de un material adecuado. El dispositivo comprende por tanto la matriz de microcolumnas y las dos placas en las que están grabadas las redes de capilares incorporadas sobre cada una de las caras de la matriz (Kuo y otros – Anal. Chem.; 2003; 75 (10); p. 2224-2230; Kuo y otros – Anal. Chem.; 2003; 75 (8); p. 1861-1867).

60 El dispositivo tal y como se ha descrito con anterioridad se caracteriza porque comprende unos medios que permiten controlar, al nivel de una o varias microcolumnas específicas de la matriz, la elución de las dianas moleculares y/o su migración hacia un detector y/o su retención dentro de las microcolumnas tras la elución.

65 Por « elución » se entiende la operación que consiste en romper la unión específica establecida entre la diana y la sonda.

Por control de la elución y/o de la migración de las dianas al nivel de microcolumnas específicas, hay que

comprender que el dispositivo permite seleccionar las microcolumnas para las que las dianas se eluirán o migrarán hacia el detector, las otras dianas no estando eluidas o quedando retenidas dentro de las microcolumnas, a pesar de la presencia eventual de un flujo que atraviesa dichas microcolumnas.

5 En la medida en la que se puede entonces analizar de forma separada las dianas eluidas de cada microcolumna o de un grupo de microcolumnas utilizando el mismo dispositivo de análisis, el dispositivo que se da a conocer permite en concreto limitar el número de detectores utilizados.

10 Cuando las dianas moleculares son moléculas cargadas, por ejemplo ácidos nucleicos, se puede controlar la elución y/o la migración de estas dianas aplicando un campo eléctrico, por ejemplo, por medio de juegos de electrodos dispuestos en contacto con cada microcolumna y a la salida de cada microcolumna. Los electrodos al nivel de cada pocillo pueden ser independientes los unos de los otros (multiplexación pocillo par pocillo) o estar organizados en grupos de electrodos formando, cada uno, una unidad de potencial para un grupo de pocillos.

15 De este modo, el dispositivo que se da a conocer comprende un electrodo, denominado electrodo de pocillo o medio, dispuesto en contacto con cada microcolumna, de preferencia medio en la microcolumna, y un segundo electrodo, denominado electrodo distal, dispuesto a la salida de cada microcolumna, que permite el control de la elución de las dianas moleculares retenidas dentro de una o de varias microcolumnas específicas y/o su migración hacia el detector o su retención dentro de las microcolumnas tras la elución.

20 Los electrodos de pocillo están dispuestos de tal modo que retengan las moléculas cargadas dentro de la microcolumna tras la elución mediante interacciones eléctricas y a continuación que permitan su migración selectiva. Cuando los pocillos son de forma tubular, estos se disponen, por ejemplo, en contacto con las paredes laterales de los pocillos.

25 En la medida en que el dispositivo permite la elución y/o la migración separada de las dianas moleculares hacia un detector, el dispositivo puede comprender una red de capilares adecuada que permite en particular la convergencia de las dianas moleculares a la salida de las microcolumnas hacia un número restringido de detectores, e incluso un detector único.

30 Además, el dispositivo que se da a conocer se caracteriza porque la primera red de capilares que abastecen la entrada de las microcolumnas comprende un primer capilar transversal en el que se introduce la mezcla compleja, denominado a continuación canal transversal superior, con un diámetro de preferencia comprendido entre 2 y 1.000 μm , conectado a un conjunto de capilares que abastecen las microcolumnas de la matriz, y porque la segunda red de capilares que abastecen la salida de las microcolumnas comprende un conjunto de capilares que unen las microcolumnas a uno o varios capilares transversales, denominados canales transversales inferiores, con un diámetro de preferencia comprendido entre 2 y 1.000 μm , estos últimos estando unidos a uno o varios detectores.

40 Los canales transversales inferior y superior están de preferencia unidos cada uno a un electrodo, que permite aplicar una diferencia de potencial eléctrico entre el lugar de introducción de la mezcla compleja que hay que analizar y el detector, y que permite de este modo garantizar la migración de moléculas cargadas dentro del conjunto del dispositivo, en particular de ácidos nucleicos contenidos en la mezcla compleja que hay que analizar mediante electroforesis.

45 El dispositivo que se da a conocer se caracteriza porque la matriz de microcolumnas comprende N líneas y P columnas de microcolumnas dispuestas en un mismo plano y porque comprende unos medios que permiten controlar la elución de las dianas moleculares retenidas en las microcolumnas de una línea específica y/o su migración hacia el detector y/o su retención dentro de las microcolumnas tras la elución, y porque la longitud de cada capilar de la segunda red se selecciona de tal modo que la distancia entre la salida de una microcolumna y el canal transversal inferior es diferente de un capilar de la segunda red al otro, de preferencia creciente o decreciente del capilar que une la última microcolumna de una línea al capilar que une la última microcolumna de esta línea, de tal modo que los tiempos de recorrido de las dianas moleculares a la salida de la microcolumna hasta el detector son diferentes para cada microcolumna de una misma línea.

55 A título de ejemplo, con el fin de obtener unos tiempos de migración diferentes para las dianas procedentes de cada microcolumna de una misma línea, la red de capilares que une cada microcolumna al canal transversal inferior puede comprender P capilares paralelos, cada capilar uniendo las P microcolumnas de una misma línea de la matriz al canal transversal inferior y formando un ángulo con dicho canal transversal inferior diferente de 90°. Para marcar aun más el retardo, las partes de los capilares situadas entre las últimas líneas de pocillos y el canal transversal siguen unos recorridos no lineales.

60 Los tiempos de migración de las diferentes dianas permiten identificar la microcolumna de la que las dianas proceden y, por lo tanto, identificar la diana en cuestión mediante la sonda molecular contenida dentro de la microcolumna. El diámetro de los capilares y la densidad de los eventuales geles utilizados en el interior de estos se seleccionan, por lo tanto, de tal modo que no discriminen las moléculas migrantes por un criterio de tamaño, dependiendo el tiempo de migración únicamente del recorrido realizado. No obstante, la densidad de los geles se

puede seleccionar eventualmente para realizar unas cromatografías mediante electroforesis capilar. Moléculas de diferentes tamaños o con un pequeño polimorfismo de secuencias como las que se hibridan en la misma sonda se retardan de este modo de modo diferente mediante un gel adecuado durante su migración.

5 De manera preferente, el canal transversal inferior, así como las diferentes partes de la segunda red de capilares, con distancia diferente, se rellenan con gel. Por esta razón, habrá una migración rápida de las dianas hasta las diferentes partes de los capilares de la segunda red en las que estas se cromatografiarán.

10 Con el fin de controlar la elución y/o la migración de las dianas para cada línea de microcolumnas del dispositivo, el conjunto de las P microcolumnas de una misma línea puede estar unido a un mismo electrodo, el dispositivo que se da a conocer comprendiendo de este modo N electrodos de línea (electrodos de líneas de pocillos), de preferencia medios en las microcolumnas, y una segunda serie de electrodos, paralelos a los electrodos de línea (electrodos de líneas distales), que unen el conjunto de los P capilares a la salida de las microcolumnas de una misma línea.

15 Se obtiene de este modo una red de electrodos de líneas de pocillos o medios: un electrodo por línea de la matriz de microcolumnas. Estos electrodos, además de permitir la nano-manipulación de las dianas dentro de cada uno de los pocillos, pueden catalizar la fijación de sondas, como las sondas enlazadas con pirrol que se fijan al nivel de cada uno de los electrodos por el efecto de un campo eléctrico. El segundo juego de electrodos de líneas distales, espejo de los electrodos de líneas de pocillos, está dispuesto a la salida de los pocillos de la matriz de microcolumnas. Las parejas de electrodos definen unidades de potencial de la matriz de las N*P microcolumnas. Estas parejas de electrodos permiten aplicar el potencial deseado al nivel de cada línea de microcolumnas.

25 De preferencia la primera y la segunda red de capilares están situadas en unos planos paralelos al plano de la matriz de microcolumnas, de preferencia por encima y por debajo respectivamente del plano formado por la matriz de microcolumnas, y la primera red de capilares, denominada red superior, comprende N capilares paralelos, cada capilar uniendo el canal transversal superior a las P microcolumnas de una misma línea de la matriz, y la segunda red de capilares, denominada red inferior, comprende P capilares paralelos, cada capilar uniendo las N microcolumnas de una misma columna de la matriz al canal transversal inferior, el ángulo formado entre las dos redes de capilares inferior y superior siendo diferente de 0°, de preferencia 90°. Por esta razón cada capilar de la red superior está conectado con todos los capilares de la red inferior por medio de una línea de P pocillos de la matriz de microcolumnas. De forma recíproca, cada capilar de la red inferior está conectado con todos los capilares de la red superior por medio de una columna de N pocillos de la matriz de microcolumnas.

35 Con una matriz de este tipo de N*P microcolumnas, los extremos de los capilares de la red superior opuestos a un canal transversal superior se paran de preferencia en la última conexión con las P-ésimas y últimas microcolumnas de las líneas de la matriz de microcolumnas y los extremos de los capilares de la red inferior opuestos a un canal transversal inferior se paran de preferencia en la última conexión con los N-ésimos y últimos pocillos de las columnas de microcolumnas de la matriz de microcolumnas.

40 El extremo de los capilares de la red de capilares inferiores opuestos al canal transversal está unido a un segundo capilar transversal (canal transversal inferior secundario), este canal permite el establecimiento de un flujo entre las dos redes de capilares inferiores y superiores a través de la matriz de microcolumna, esto permite acelerar y controlar con más exactitud la migración dentro de la red de capilares inferior. En efecto, si el canal transversal inferior principal se llena con un gel con el fin de realizar a este nivel una micro electroforesis capilar, entonces siempre se puede establecer un flujo de ciclo cerrado entre el canal transversal superior y el canal transversal inferior secundario.

50 De manera general, las redes de capilares se pueden llenar con gel, como un gel de poliacrilamida o cualquier otro gel que permita regular los flujos y controlar la difusión de las moléculas durante su migración, en particular los geles líquidos que se utilizan para las electroforesis capilares.

55 Con una matriz de N*P microcolumnas, los canales transversales superior e inferior están provistos de un pistón, roscado o no, que permite seleccionar el número de líneas de microcolumnas a través de las que puede pasar el flujo. Volviendo hacia atrás, el pistón moviliza cada vez más líneas de microcolumnas de la matriz. Realizando un pistón hueco provisto de una ranura, se pueden movilizar eventualmente las líneas de microcolumna una a una.

60 La introducción de las dianas durante la fase de hibridación se hace sin flujo, estableciendo un campo eléctrico alternativo entre los electrodos de los canales transversales superior e inferior y los electrodos de líneas sucesivas. Este campo permite mezclar de forma regular las dianas no hibridadas para homogeneizar la solución de hibridación. Por otra parte, regulando la fuerza del campo eléctrico, se puede controlar la especificidad de la hibridación (Cluzel, P. 1996. Science, Vol. 2071 (5250), pp. 792-794).

65 Una alternativa más simple a la utilización de una doble red de capilares superpuesta consiste en utilizar una red simple y un juego de electrodos de líneas para constituir el dispositivo de la invención.

El dispositivo se presenta entonces con la forma de una matriz de sondas organizadas en puntos de hibridación

- (correspondiendo a una unidad de hibridación), en la que cada punto de hibridación está formado por un tipo de sonda molecular, por ejemplo, un tipo de polímero de ácido nucleico cuya secuencia es específica para un gen (podrá tratarse, en el caso de las proteínas, de un tipo de anticuerpos o de un ligando concreto). Cada línea de puntos de hibridación de la matriz está colocada sobre una superficie de oro o de ITO (o de cualquier otro metal o aleación adecuado) que delimita un electrodo, el conjunto de la matriz estando entonces formado por n electrodos que corresponden al número n de líneas, cada electrodo de línea constando de P puntos de sondas ancladas (véase fig. 7). Los electrodos se graban mediante una fina capa en un material aislante como el vidrio, el kaptón, el óxido de alumina... (véase esquema).
- 5
- 10 Se realiza un segundo juego de electrodos, espejo del primero, pero esta vez los electrodos no están anclados con sondas, estos electrodos se denominan no funcionalizados. Los dos juegos de electrodos están dispuestos los unos frente a los otros, a ambos lados de una red de P capilares paralelos, de tal modo que haya un juego de electrodos por encima y el otro por debajo (fig. 8 y 9). El primer juego de electrodos funcionalizados posee unos electrodos anclados con sondas organizadas en puntos de hibridación, cada sonda siendo susceptible de retener una diana molecular específica cuando esta se encuentra presente en la mezcla compleja, mediante unión específica sonda/diana. El segundo juego de electrodos posee unos electrodos no funcionalizados. En un ejemplo determinado, el juego de electrodos funcionalizados se sitúa por encima de la red de capilares y el juego de electrodos no funcionalizados se sitúa por debajo de la red de capilares. Cada capilar es perpendicular a los n electrodos del juego de electrodos funcionalizados y a los n electrodos del juego de electrodos no funcionalizados (fig. 9, 10, 11). La construcción se realiza de tal manera que el primer punto de hibridación de los n electrodos funcionalizados se encuentre en el primer capilar de la red de capilares, el segundo punto de hibridación de los n electrodos funcionalizados se encuentre en el segundo capilar de la red de capilares y así sucesivamente (fig. 11). Un par de electrodos está formado por un electrodo anclado con sondas organizadas en puntos de hibridación por encima de la red de capilares y de un electrodo no funcionalizado enfrentado por debajo de la red de capilares. Los electrodos pueden ser muy delgados para permitir la detección mediante la SPR. En cada extremo de la red de capilares, los capilares convergen hacia un depósito circular. El depósito consta de un electrodo (electrodo de depósito), en el mismo plano que el del juego de electrodos funcionalizados (fig. 11). En un ejemplo determinado, este electrodo se sitúa en el centro del techo de cada depósito. El juego de electrodos funcionalizados (electrodos anclados de las sondas) se completa mediante dos electrodos de unión suplementarios: un primer electrodo curvo se sitúa entre el primer electrodo de depósito y el primer electrodo funcionalizado y un segundo electrodo curvo se sitúa entre el segundo electrodo de depósito y el último electrodo funcionalizado. El electrodo de unión es curvo, su curvatura está definida de tal modo que las distancias entre el electrodo de unión y el centro del depósito (electrodo de depósito) sean idénticas en cualquier punto del electrodo.
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35 El primer y el segundo electrodos de unión suplementarios se sitúan respectivamente entre el primer electrodo de depósito y el primer electrodo funcionalizado, y entre el segundo electrodo de depósito y el último electrodo funcionalizado, de tal modo que las distancias más cortas entre el electrodo de unión y el electrodo depósito sean idénticas en cualquier punto de los electrodos.
- 40 La descripción que se ha hecho con anterioridad para el dispositivo de la invención, que comprende una doble red de capilares de los elementos constitutivos de la red, como los capilares, los electrodos, los detectores... se puede transponer para la preparación del dispositivo que consta de una red simple, con la reserva de que sea compatible con el funcionamiento de este dispositivo de red simple, y adaptarse si fuera necesario a esta estructura.
- 45 De forma análoga, la descripción que se ha realizado de las moléculas que hay que analizar y de las sondas que se utilizan, así como de su preparación y de sus modalidades de aplicación y de detección, se puede transponer para la preparación del dispositivo que consta de una red simple, con la reserva de que sea compatible con el funcionamiento de este dispositivo de red simple, y adaptarse si fuera necesario a esta estructura.
- 50 El principio de funcionamiento del dispositivo, que consta de una red única de capilares, se remite a la hibridación activa (ha) y se puede describir de la siguiente manera:
- 1/ La muestra (fig. 12) que hay que analizar se introduce dentro del primer depósito. Se aplica un potencial eléctrico entre el primer electrodo de unión (positivo) y el electrodo del primer depósito (negativo), cuando las moléculas analizadas son ácidos nucleicos. El potencial se puede invertir de forma alternativa en el caso de análisis de proteínas. La descripción se refiere a continuación al funcionamiento para los ácidos nucleicos. Las moléculas que hay que analizar migran de forma equimolar dentro de cada uno de los capilares y se concentran al nivel del electrodo de unión.
- 55
- 2/ El potencial entre el electrodo de depósito y el electrodo de unión se corta a continuación y se aplica un potencial eléctrico entre el primer electrodo funcionalizado (+) y el electrodo de unión (-). Las moléculas de cada capilar migran entonces al nivel del primer electrodo funcionalizado en el que las dianas complementarias de los puntos de hibridación del primer electrodo (un punto de hibridación por capilar) se pueden hibridar (la hibridación se acelera con el campo eléctrico). La concentración al nivel de cada punto de hibridación es máxima (esta solo depende del número de capilares y ya no del volumen total de las canalizaciones).
- 60
- 3/ Con el fin de confinar las dianas al nivel del punto de hibridación, el segundo electrodo de línea (no funcionalizado) se puede llevar a un potencial negativo; se obtiene una distribución de carga (- + -) en la que la
- 65

carga + se centra en el primer punto de hibridación de cada capilar. Para mejorar la hibridación, los potenciales eléctricos pueden ser discontinuos, el lapso de tiempo sin potencial correspondiendo a un tiempo de relajación durante el cual las dianas se pueden hibridar sin tensión. Para aumentar la mezcla de las dianas que hay que analizar y favorecer de este modo la hibridación de las dianas presentes en bajo número, durante el tiempo de relajación se puede establecer un potencial discontinuo y alternativo entre el primera par de electrodos por encima y por debajo de la red de capilares (esto mejora aun más la especificidad de hibridación).

4/ Una vez que las dianas se han hibridado al nivel de la primera línea de puntos de hibridación, los potenciales eléctricos se separan por una línea. Tomando 0 como la posición del electrodo de unión y respectivamente 1, 2 y 3 como las posiciones del primero, el segundo y el tercer electrodos funcionalizados anclados con sondas, la secuencia de potencial eléctrico aplicado se puede describir de este modo:

5/ el segundo electrodo funcionalizado se conecta a un potencial positivo, la distribución de cargas es (0 -, 1 +, 2 +) (eventualmente el tercer electrodo se conecta a un potencial negativo) con una distribución de carga (0 -, 1 +, 2 +, 3 -);

6/ el primer electrodo funcionalizado se conecta a un potencial negativo, la distribución de cargas es (0 -, 1 -, 2 +) eventualmente (0 -, 1 -, 2 +, 3 -);

7/ el electrodo de unión se pone a 0 para una distribución de cargas (1 -, 2 +), eventualmente (1 -, 2 +, 1 -).

7/ potencial eléctrico discontinuo y alternativo entre el electrodo 2 funcionalizado y el electrodo 2 no funcionalizado.

El conjunto de las sondas no hibridadas al nivel de la primera línea de puntos de hibridación va a migrar al nivel de la segunda línea de puntos de hibridación. El conjunto de las secuencias de migración, relajación, mezcla (puntos 4 a 6) se aplica paso a paso para hibridar todos los puntos de hibridación de todas las líneas que tienen dianas complementarias en la muestra analizada. Una vez que han llegado al segundo depósito, las dianas que habían migrado dentro de capilares diferentes se mezclan de nuevo. Se puede entonces, de acuerdo con una variante de realización, efectuar las secuencias de potencial eléctrico en el otro sentido para recorrer la red de capilares en sentido inverso. Las idas y venidas de las dianas entre los dos depósitos a través de los capilares permiten aumentar la sensibilidad de detección del dispositivo.

Se pueden considerar varias posibilidades de detección para cuantificar las dianas hibridadas dentro del dispositivo con una única red de capilares, de acuerdo con lo que se ha descrito en párrafos anteriores para el dispositivo con doble red de capilares.

Mediante la SPR:

- Las dianas se pueden cuantificar de forma directa en la red de electrodos funcionalizados. Un prisma triédrico se adapta a la parte de atrás de cada electrodo de línea de la red de electrodos funcionalizados para poder realizar la medición mediante SPR (véase la descripción del capítulo de detección mediante SPR).

- Para reducir los problemas de ruido de fondo y de sensibilidad de detección, la medición mediante SPR se puede hacer en el juego de electrodos no funcionalizados en el que la cara opuesta a los capilares de cada electrodo estará emparejado con un prisma triédrico (véase capítulo SPR). En este procedimiento de detección, el juego de electrodos funcionalizados se puede emparejar con una estructura en la que cada punto de hibridación está cerrado y delimitado por un pequeño pocillo (fig. 13). Cada pocillo es una pequeña cubeta, cuyo fondo está formado por el electrodo funcionalizado y que está abierta en el capilar enfrentado al electrodo no funcionalizado (pocillo abierto únicamente por un lado de un capilar de la red de capilares). Las paredes de los pocillos evitan que se mezclen las dianas de un punto de hibridación con el otro a lo largo de la migración de una de las dianas entre el electrodo funcionalizado y el electrodo no funcionalizado.

En el campo de la utilización de pocillos abiertos solo por un lado y de una red de capilares única, se puede adaptar un canal transversal al sistema de capilares y un sistema de retardo de migración (tal y como se ha descrito para la red inferior de capilares del dispositivo de doble red, véase capítulo). En el campo de utilización de una red de capilares única, se puede suprimir el segundo depósito y sustituirlo por un canal transversal al sistema de capilares y un sistema de retardo de migración (fig. 14). De este modo los mismos tipos de detección que se han descrito para el sistema que posee dos redes de capilares superpuestas se pueden aplicar al sistema simplificado.

En esta configuración, el primer electrodo de unión es curvo, de tal modo que las distancias entre el electrodo de unión y el centro del depósito sean idénticas en cualquier punto del electrodo, y el segundo electrodo de unión es no curvo. Este electrodo sirve de frontera eléctrica infranqueable por las sondas durante la hibridación, y a continuación en la etapa de la detección permitirá dirigir las dianas hacia el sistema de retardo por medio de los potenciales que establecen el electrodo diana y el electrodo de unión.

Si el electrodo presenta un ángulo saliente con respecto al canal transversal, el efecto retardo se amplifica.

Mediante fluorescencia:

- Si las dianas están marcadas con un marcador fluorescente, las dianas hibridadas se pueden leer directamente en el juego de electrodos funcionalizados mediante un escáner. Del mismo modo que se puede emplear la utilización de la fluorescencia acoplada a la SPR (excitación de las moléculas fluorescentes mediante onda evanescente de la SPR).
- Sin las dianas no están marcadas, las tasas de complejos sonda-diana se pueden evaluar utilizando ligandos fluorescentes de la diana o del complejo. Para los chips de ADN se citarán las acridinas y en particular la acridina naranja, que es un intercalante del ADN cargado positivamente. La acridina naranja permite marcar de forma diferente a los ADN simples o dobles, las moléculas libres se eliminarán por medio de la acción de los campos eléctricos que producen los sistemas de electrodos. El conjunto de las mediciones se puede hacer a lo largo de las reacciones de hibridación o de complejación por medio del juego de electrodos que permiten manipular el conjunto de las moléculas cargadas. Mediante esta aproximación, se puede evaluar el número de moléculas de sondas que componen el punto de hibridación y el número de dianas que se hibridan; estas dos mediciones permiten establecer las concentraciones reales de las dianas disueltas.

Para evitar la fluorescencia parásita procedente de los electrodos, el conjunto de los elementos de conexión se puede realizar con aleaciones del tipo ITO que son transparentes en el rango visible (óxido de indio y óxido de estaño o cualquier otra aleación equivalente como...). Estas aleaciones siendo muy electrófilas, deben experimentar un procedimiento de aislamiento químico descrito en el capítulo de aislamiento químico.

En una construcción particular del dispositivo de la invención, las sondas se pueden colocar entre los electrodos del juego de electrodos funcionalizados (fig. 7).

En el campo de la utilización de una doble red de capilares, el dispositivo comprende uno o varios detector(es) adecuados para recolectar de forma separada las dianas moleculares y/o para analizar de forma separada las dianas moleculares, denominadas a continuación como el o los detector(es).

En unos modos de realización preferentes, el detector está conectado a la salida de un canal transversal inferior que une los capilares de la segunda red. En el texto que viene a continuación, se describe en detalle un dispositivo que comprende un detector y un canal transversal inferior que une el conjunto de los capilares de la segunda red. Obviamente, se pueden considerar otras variantes, en concreto se pueden utilizar varios detectores, cada detector estando unido a la salida de un canal transversal inferior que une una parte de los capilares de la segunda red.

Cualquier sistema de detección se puede adaptar a la salida de la segunda red de capilares, en concreto en función del tipo de marcado utilizado para diferenciar las dianas moleculares, por ejemplo, procedentes de muestras diferentes.

A título de ejemplo, si las dianas se pueden localizar mediante fluorescencia, en particular tras el marcado por una sonda fluorescente, la detección se puede hacer por medio de un espectrofotómetro que permite excitar y adquirir la fluorescencia de moléculas marcadas o la fluorescencia intrínseca de las moléculas estudiadas. Para ello, en un modo de realización determinado, se puede añadir a la salida de un canal transversal inferior, un capilar grabado en un cristal de cuarzo o en cualquier otro material transparente que permita la excitación y la adquisición de la fluorescencia (por ejemplo, plástico). La excitación y la lectura de la fluorescencia se producen durante el paso a través del capilar de cuarzo. La fluorescencia natural de las moléculas estudiadas se puede utilizar para la detección. Del mismo modo, unos cristales de NaCl o de KCl se pueden utilizar para realizar estudios de espectrometría infrarroja o de espectrometría Raman.

De forma alternativa, la detección y la cuantificación de las dianas utilizan la resonancia paramagnética o electrónica si las dianas están marcadas por un marcador paramagnético.

Cuando la detección se realiza mediante la SPR, los electrodos de líneas distales o inferiores están formados por un lámina de oro (o de otro metal con electrón libre) de algunas decenas de μm de espesor. La cara externa (opuesta a los canales) de cada electrodo distal está unida a una de las tres caras de un prisma (vidrio, cuarzo, plástico o cualquier otro material transparente que puede convenir a la SPR). El prisma está formado por un triedro del que una de las tres caras rectangulares se junta con la cara externa de un electrodo de línea distal, la longitud del triedro correspondiendo a la del electrodo (fig. 15).

Tras la hibridación de las dianas, el circuito de micro canales se enjuaga y se purga de todas las dianas no hibridadas, las dianas hibridadas se retienen al nivel de cada pocillo o de cada punto de hibridación en el caso del diseño simplificado. El sistema se pone bajo tensión de tal modo que al nivel de cada par de electrodos de línea el potencial es positivo en el electrodo medio y negativo en el electrodo distal respectivamente en el diseño de electrodos funcionalizados y no funcionalizados. A la hora de describirlo, asimilaremos el electrodo funcionalizado al electrodo medio y el electrodo no funcionalizado al electrodo distal. Para los chips de proteínas, de anticuerpos o de receptores moleculares los potenciales se adaptarán en función de la carga de las moléculas estudiadas. Un agente caotrópico capaz de deshacer el complejo sonda-diana se introduce en el centro. Las sondas se separan de las dianas, pero permanecen retenidas dentro de cada pocillo o punto de hibridación mediante la carga negativa del

electrodo medio (fig. 16). El potencial al nivel del primer par de electrodos se invierte de tal modo que sea positivo en el electrodo distal y negativo en el electrodo medio. Las dianas de la línea de pocillos o de puntos de hibridación dependientes del par de electrodos, migrarán dentro de la red de capilares para llegar al nivel del electrodo distal perpendicular a la red de capilares (red inferior para el sistema con dos redes superpuestas), de tal modo que las sondas de cada pocillo o punto de hibridación se encuentren en un capilar diferente.

La medición SPR se hará mediante la reflexión de la luz sobre la cara externa del electrodo distal, a través de los prismas dispuestos en cada electrodo. Se puede estimar la constante de disociación observando la velocidad a la que varía la señal de SPR medida a lo largo del tiempo. Aplicando una corriente alternativa entre un par de electrodos de línea, se pueden medir las constantes de asociación y de disociación sonda/diana. En este caso particular los experimentos se hacen sin agente desnaturante, las variaciones de concentración locales inducidas por el campo eléctrico permiten realizar las asociaciones y disociaciones de las sondas y de las dianas.

La corriente que se aplica a los electrodos puede perturbar la señal de la SPR. Para limitar esta perturbación, el campo aplicado entre el par de electrodos de línea puede ser discontinuo. La medición de la SPR realizándose entonces únicamente durante las fases de interrupción del campo, hablaremos de medición mediante impulsiones de SPR acopladas a la frecuencia del campo eléctrico. Se puede determinar el coeficiente de difusión de la molécula analizando las velocidades de variaciones de las señales SPR en función del tiempo de interrupción del campo eléctrico entre el par de electrodos de líneas. Se realizan de nuevo las mismas operaciones para cada par de electrodos de línea.

Dado que la superficie metálica no está funcionalizada, las dianas pueden estar en contacto directamente con el metal, lo que aumenta de este modo la sensibilidad de la detección. Por otra parte, el campo eléctrico permite concentrar al máximo las dianas al nivel de la superficie del metal, lo que incrementa aun más la sensibilidad de detección. La detección SPR dependiendo de la masa, cuanto más pesadas sean las moléculas que hay que detectar, más eficaz será la detección. Un aumento de la masa de las moléculas permite, por lo tanto, rebajar el umbral de detección. La utilización de dianas en las que los átomos se han sustituido por isótopos pesados permite aumentar la masa molecular y de este modo rebajar el umbral de detección. En el campo de la alternativa que corresponde a la utilización de una red simple de capilares, se puede medir de forma directa la impedancia de las moléculas que se fijan sobre una diana mediante detección eléctrica directa. Además de su función de manipulación de las sondas y de las dianas por medio de un campo eléctrico, el sistema de electrodos implantado en los chips, permite medir de forma directa la impedancia de las moléculas que se fijan sobre una diana. Con el fin de alcanzar una alta densidad de puntos de hibridación, de 10^3 a 10^6 sobre una superficie inferior a 20 cm^2 , se realiza un sistema de electrodos cruzados. El sistema está compuesto por dos juegos de electrodos superpuestos situados en dos planos diferentes por debajo y por encima de una matriz de puntos de sondas. La dirección de los electrodos del juego no funcionalizado es perpendicular a la de los electrodos del juego funcionalizado (fig. 17). Los puntos de hibridación se implantan, por ejemplo, en los electrodos del juego funcionalizado en cada intersección de los electrodos funcionalizados y de la proyección en el plano superior de los electrodos del juego no funcionalizado. El anclado de las sondas depende de la clase de los electrodos y de la clase de las moléculas de la sonda (véase capítulo de implantación de las sondas y aislamiento de los electrodos). En el campo de las moléculas de ADN es conveniente limitar al máximo la conformación de las moléculas con el fin de minimizar los aparatos de medición debido a la curvatura del ADN y de la hibridación intramolecular, que implican variaciones de impedancia del mismo orden que en el caso de una hibridación. Una solución para limitar el ADN consiste en adsorberlo en el electrodo mediante un peinado molecular. Las moléculas estiradas sobre el electrodo ya no se pueden doblar o hibridar entre sí, por el contrario conservan la facultad de hibridarse con una secuencia complementaria disuelta. Otra solución consiste en tensar la molécula de la sonda entre un electrodo del juego funcionalizado y un electrodo del juego no funcionalizado, fijándola por estos extremos a los electrodos. Las sondas de oligonucleótidos utilizadas están funcionalizadas en los dos extremos 5' y 3'. La función seleccionada para 5' es diferente de la de 3'. Los dos tipos de función tienen una activación y/o una catálisis diferente. Se seleccionan, por ejemplo, unas funciones Hs, NH₂ en 5' con una activación química o luminosa y una función pirrol en 3' con una catálisis eléctrica. La distancia entre los juegos de electrodos funcionalizados y no funcionalizados se selecciona de tal modo que las moléculas se estiran, sin que puedan adoptar una curvatura particular o realizar una hibridación intramolecular. Una alternativa consiste en funcionalizar el extremo 5' de la sonda para anclarla sobre el electrodo funcionalizado y en añadirle una corta secuencia (de 10 a 20 bases) en 3' (amarre 3'). La secuencia del amarre 3' se selecciona específicamente para que no haya hibridación con las dianas. Una secuencia complementaria al amarre 3' se ancla en el electrodo no funcionalizado uno frente al otro. Las sondas se unen al electrodo del juego funcionalizado por su extremo 5' por medio de un enlace químico y al electrodo no funcionalizado por el extremo 3' por medio del dúplex de entre 10 y 20 pares de bases formadas entre el amarre y su secuencia complementaria anclada en el electrodo. Las sondas se estiran de este modo entre los dos electrodos, lo que minimiza las hibridaciones intramoleculares y la curvatura.

El chip de electrodos con las sondas ancladas se puede hibridar de forma pasiva mediante difusión simple de las dianas al nivel de cada punto de hibridación tal y como esto se realiza para los biochips actuales. Se prefiere, no obstante, una hibridación activa siguiendo el procedimiento que se ha descrito con anterioridad. Con este fin, se disponen una red de capilares y dos depósitos similares a los que se han descrito en el capítulo anterior entre los juegos de electrodos funcionalizados y no funcionalizados. Se añaden dos electrodos de depósitos así como dos electrodos de unión al juego de electrodos funcionalizados (véase esquema). Una vez que el chip está hibridado, la

variación de impedancia de cada punto de hibridación permite determinar la cantidad de dianas fijadas. La intersección entre un electrodo funcionalizado y la proyección (en el plano superior) de un electrodo no funcionalizado es única y corresponde a un único punto de hibridación. La medición de impedancia se realiza punto a punto aplicando de forma sucesiva una diferencia de potencial eléctrico y una corriente eléctrica a todos los pares posibles de electrodos formados por un electrodo no funcionalizado y un electrodo funcionalizado.

La disposición perpendicular, entre los dos juegos superpuestos de electrodos, permite en teoría realizar la medición. No obstante, la utilización de una corriente alternativa o discontinua y el hecho de que un electrodo conecte varios puntos de hibridación, implica unos problemas de capacitancia eléctrica parásita que alteran la medición. En efecto, se hace difícil e incluso imposible medir de forma correcta la corriente y las tensiones eléctricas para definir la impedancia de cada punto de hibridación. Para resolver este problema es necesario introducir unos interruptores que permitirán establecer una tensión y una corriente punto a punto. Para realizar los interruptores compatibles con el tamaño de los biochips, el juego funcionalizado de electrodos (o el juego no funcionalizado) se sustituye por una cuadrícula de electrodos en un mismo plano, formada por un primer conjunto de electrodos (horizontal) aislado y perpendicular a un segundo conjunto de electrodos del primer conjunto (vertical). La malla de la cuadrícula delimita un espacio en el que está dispuesto un pequeño electrodo (electrodo de punto de hibridación) de entre 10 y 500 μm de lado de acuerdo con el tamaño de la cuadrícula. Al nivel de cada malla de la cuadrícula están dispuestos uno o dos transistores de efecto de campo de tal modo que la rejilla del transistor esté unida al electrodo horizontal de un lado de la malla, el borne entrante (fuente) del transistor al electrodo vertical de un lado de la malla y el borne saliente (drenaje) del transistor al electrodo de punto de hibridación.

En resumen, obtenemos una cuadrícula cuyas mallas, definidas por los electrodos horizontales y verticales están ocupadas por pequeños electrodos de punto de hibridación. Los electrodos de punto de hibridación están conectados a dos de los cuatro lados de la malla mediante uno o dos transistores de efecto de campo (fig. 17, 18). Las sondas moleculares están ancladas al nivel de cada electrodo de punto de hibridación. Los electrodos del juego no funcionalizado están dispuestos frente a cada columna de « electrodos de punto de hibridación » y en paralelo a los electrodos verticales de la cuadrícula funcionalizada. Cada electrodo del juego no funcionalizado está conectado a la masa. El juego de electrodos no funcionalizados se puede sustituir por una placa única conectada a la masa.

En el caso en que la impedancia se mide con una corriente discontinua (la corriente va siempre en el mismo sentido), es necesario un único transistor por « electrodo de punto de hibridación » para hacer la función del interruptor. Colocando los electrodos horizontales bajo tensión las rejillas de todos los transistores están alimentadas, lo que corta la corriente entre la entrada y la salida de todos los transistores, los electrodos de punto de hibridación están, por lo tanto, aislados. Al cortar la corriente al nivel de un único electrodo horizontal y al aplicar la corriente y un campo eléctrico discontinuo sobre un electrodo vertical único, solamente el transistor en la intersección de los dos electrodos deja pasar la corriente entre su entrada y su salida. Un punto de hibridación único se coloca bajo tensión, la variación de impedancia al nivel del electrodo de punto de hibridación se puede determinar sin que la parasiten los otros puntos de hibridación.

En el caso en que la impedancia se determina con una corriente alternativa (la corriente va en los dos sentidos), es preciso que el electrodo del punto de hibridación esté alimentado sea cual sea el sentido de la corriente. Es, por lo tanto, necesario disponer en la malla dos transistores de efecto de campo que tienen características opuestas, es decir, que cuando la tensión al nivel de las rejillas de los transistores es nula o es negativa, la corriente puede pasar entre la entrada y la salida en un sentido en el caso del primer transistor y en el otro sentido en el caso del segundo transistor. Sea cual sea el sentido de paso de la corriente, el electrodo de punto de hibridación está alimentado. Resultaría ventajoso introducir unos transistores que dejen pasar la corriente en los dos sentidos entre la entrada y la salida, como los transistores de tipo « nmos » o « pmos », pero estos transistores tienen un borne suplementario y necesitan, por lo tanto, un electrodo horizontal por malla para hacer la conexión, lo que lo limita para la miniaturización.

Se puede realizar una detección mixta de la fluorescencia y de la impedancia o de la fluorescencia solo (los electrodos solo se utilizan entonces para dirigir la hibridación de acuerdo con la descripción anterior de la hibridación activa (ha)). Para no alterar la fluorescencia emitida por las sondas o las dianas, el conjunto de los circuitos y electrodos se puede realizar de aleación transparente como ITO. En el campo de una detección mediante fluorescencia para los ácidos nucleicos, una alternativa al marcado de las dianas con un cromóforo consiste en utilizar un intercalante fluorescente en los ácidos nucleicos. Las acridinas son unas buenas candidatas y en particular la acridina naranja que tiene la particularidad de fluorescer de forma diferente cuando está asociada a unas moléculas de ADN de cadena sencilla o a un dúplex de ADN/ADN. Además, la acridina naranja está cargada positivamente lo que permite desplazarla dentro de un campo eléctrico. La densidad de las sondas al nivel de cada punto de hibridación está determinada por un marcado con acridina y mide la fluorescencia emitida, los diferentes campos eléctricos aplicados permitiendo eliminar las moléculas de acridina no fijadas a las sondas de ADN. La secuencia de aplicación de los campos eléctricos es similar a la que se ha descrito en el capítulo ha, pero el sentido de los campos se adapta a la carga de la molécula que se quiere desplazar. Una vez que las dianas están introducidas en el chip, la medición de la fluorescencia relativa a la formación del complejo de ADN/ADN permite determinar la concentración de cada tipo de dianas comparándola con la fluorescencia de las sondas. Este procedimiento permite realizar unas mediciones dinámicas de hibridación y determinar las constantes de disociación

(kd) y de asociación (ka) entre las dianas y las sondas. La medición de la kd y de la ka de una diana se puede comparar con las mediciones obtenidas para la secuencia nativa, lo que hace posible resaltar el polimorfismo. De manera más general, al realizar una medición mixta, se pueden resaltar desajustes de la sonda para la diana, por ejemplo por medio de un intercalante y un marcado fluorescente de las dianas con un cromóforo, o una medición de impedancia y un intercalante...

En concreto, un detector que se utiliza en el dispositivo de la invención es un espectrómetro de masa. El espectrómetro de masa permite informar, al mismo tiempo, al usuario acerca del número de moléculas diana y la clase de estas moléculas (pesos moleculares y en algunas condiciones sus fórmulas). El dispositivo puede, por ejemplo, comprender un canal transversal inferior contiguo a la ionización por electro spray (ESI) (Kearle y otros – Anal. Chem.; 1993; 65 (22); p. 972-986) de un espectrómetro de masa. De forma preferente, el canal transversal inferior está conectado al detector por medio de una pipeta piezoeléctrica o térmica que permite una inyección regular dentro del electro spray. Todas las mejoras del ESI se pueden adaptar como, micro spray (micro ESI), nano spray (nano ESI), pico spray (pico ESI) (Smith y otros – T. Matsuo y otros, Editores 1995, John Wiley e hijo; Baffinslane, Chischester, West Sussex, UK, p. 41-74; Emmett y otros – J. AM Soc. Mass Spectrom, 1994; 5; p. 605-613; Valaskovic y otros – Anal. Chem.; 1995; 67 (20); p. 3802-3805). Otros tipos de detectores, como los cuadripolos con analizador de tiempo de vuelo de aceleración ortogonal (ao TOF. o QTOF) (Chemushevich y otros – Proceedings of the 43rd ASMS Conference on MS and Allied Topics, 1995, Atlantas, Georgia; Sanzone, G. – Rev. SCi. Instium, 1970; 41 (5) p. 741) se pueden utilizar en el dispositivo de la invención.

Los datos acerca de la masa y la carga de los iones moleculares y el número de iones moleculares permiten deducir la clase y el número de cada tipo de dianas moleculares retenidas de forma específica en una microcolumna dada. La fórmula de las moléculas unidas de forma específica a las sondas al nivel de cada microcolumna se puede deducir en concreto por el marcado específico de las dianas y la descomposición de las moléculas durante la adquisición del espectro mediante el método MS/MS (Chemushevich y otros – Proceedings of the 43rd ASMS Conference on MS and Allied Topics, 1995, Atlantas, Georgia). También se puede considerar, en un modo de realización concreto, realizar una doble detección fluorescente y mediante espectrometría de masa montando en tándem el capilar de cuarzo que permite el análisis fluorescente y el electro spray. Del mismo modo, se pueden montar en tándem varios tipos diferentes de detectores o de analizadores.

De acuerdo con otro modo de aplicación determinado del dispositivo de la invención, se pueden analizar en paralelo diferentes transcriptomas de diferentes muestras.

En este modo concreto de aplicación del dispositivo, el dispositivo comprende unos ácidos nucleicos [inmovilizados dentro de los pocillos o sobre unas partículas] formados por un conjunto de ácidos nucleicos representativo de un transcriptoma.

Por « representativo de un transcriptoma » hay que entender que los ácidos nucleicos inmovilizados dentro del pocillo presentan unas secuencias idénticas o complementarias, o se hibridan de forma específica en unas condiciones estrictas con unos ARN mensajeros, productos de la transcripción de las secuencias de ácidos nucleicos del genoma de una célula dada o de un conjunto de células, y están en unas proporciones equivalentes a las de los productos de transcripción que se obtienen en unas condiciones concretas para dicha célula o conjunto de células.

En los ejemplos que se dan a continuación se describen unos métodos de preparación de ácidos nucleicos representativos de un transcriptoma.

De preferencia, el conjunto de ácidos nucleicos representativo de un transcriptoma está inmovilizado en unas partículas, dichas partículas estando inmovilizadas dentro de las microcolumnas mediante unos medios adecuados. El dispositivo permite entonces, mediante el procedimiento que se describe en particular en el ejemplo 3 que se da a continuación, analizar en paralelo los diferentes transcriptomas.

La invención se refiere en concreto a las partículas en tanto en cuanto estas constan de un conjunto de ácidos nucleicos inmovilizados representativo de un transcriptoma.

También se refiere a un juego de moléculas de ácidos nucleicos seleccionados de acuerdo con los criterios que se definen en el ejemplo 3. El juego de moléculas de ácidos nucleicos se puede utilizar en concreto con el chip de microcolumnas que comprende los conjuntos de ácidos nucleicos representativos de transcriptomas en cada microcolumna.

En otro modo de realización, el dispositivo de la invención se caracteriza porque las sondas moleculares son unos péptidos o polipéptidos, de preferencia anticuerpos o sus fragmentos que unen los antígenos.

La invención se refiere por naturaleza a las utilidades del dispositivo para la detección y/o la dosificación de moléculas de ARN y/o de ADN específicas contenidas en una muestra biológica, en particular en un extracto celular, las sondas moleculares estando seleccionadas de tal modo que se hibridan de forma específica con un tipo de ARN

o de ADN contenido en la muestra biológica. La utilización de un dispositivo de este tipo permite en concreto el análisis comparativo de moléculas de ARN y/o de ADN específicas contenidas en al menos dos muestras biológicas de acuerdo, por ejemplo, con el procedimiento que se describe en el ejemplo 4.

- 5 Seleccionando de manera apropiada varias sondas por gen, por ejemplo una sonda específica por exón, la cuantificación de las sondas permite proporcionar una caracterización específica de la forma de engarce de un gen.

La invención se refiere, por otra parte, a un procedimiento de separación y de análisis de dianas moleculares disueltas en una mezcla con el dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1.

- 10 La invención también se refiere a un procedimiento de separación y de dosificación de dianas moleculares contenidas en una mezcla compleja, dicho procedimiento comprendiendo:

- 15 a. la introducción de una mezcla compleja que contiene las dianas moleculares que hay que separar dentro de un dispositivo de la invención que comprende, por una parte, una red de capilares que permite la circulación de la mezcla compleja y, por otra parte, dos juegos de electrodos de acuerdo con la descripción que se ha hecho con anterioridad;
- 20 b. la aplicación de un potencial eléctrico entre los electrodos del dispositivo de tal modo que las dianas puedan migrar de un extremo de la red de capilares al otro y que las dianas complementarias de las sondas se puedan hibridar;
- c. el análisis *in situ* o la recuperación seguida del análisis de cada diana hibridada con una sonda por medio de un detector.

25 La aplicación de este procedimiento se ilustra en los ejemplos y figuras.

Los ejemplos que se dan a continuación permiten ilustrar algunos modos de realización preferentes del dispositivo de la invención y entender más fácilmente su utilización, sin limitar, no obstante, el alcance de la invención.

Descripción de las figuras

30 La figura 1A es una vista desde arriba de una matriz (1) de N líneas y P columnas de microcolumnas moldeadas en un material adecuado.

35 La figura 1B representa una línea de microcolumnas conectadas por un electrodo de línea medio (21) y un electrodo de línea distal (22).

40 La figura 2 representa una vista esquemática del dispositivo que comprende una matriz de microcolumnas (2), una red de capilares superiores (3) conectada al canal transversal superior (31) provisto de un pistón (6), una red de capilares inferiores (4) conectada al canal transversal inferior (41) y al detector (5). El dispositivo también comprende un canal transversal secundario (7) para facilitar la circulación de los flujos durante las etapas de hibridación y/o de lavado.

45 La figura 3 es una vista detallada de la conexión del canal transversal inferior (41) que comprende el electrodo del canal inferior (42), una pipeta piezoeléctrica (43), el electroespray (44) y el detector.

50 La figura 4 representa las polaridades de los electrodos durante la etapa de desnaturalización de dianas moleculares cargadas negativamente por medio de un dispositivo provisto de un pistón. El pistón metálico (6) está cubierto de electrodos cargados negativamente. La solución de desnaturalización se introduce por el extremo libre del canal transversal superior (31), las flechas indican el sentido de circulación del flujo. Los electrodos son positivos al nivel de las microcolumnas (+) y negativos a la salida de las microcolumnas (-).

55 La figura 5 representa las polaridades de los electrodos durante la etapa de migración de las dianas moleculares de la primera línea. La diferencia de potencial eléctrico al nivel de los electrodos de la primera línea se suprime. El canal transversal inferior (41) se llena con gel. El dispositivo también comprende un canal transversal secundario (7).

La figura 6 ilustra la etapa de desnaturalización de dianas moleculares cargadas dentro del dispositivo que utiliza unos depósitos (8) de amortiguadores de desnaturalización que contienen un agente caotrópico capaz de migrar dentro de un campo eléctrico.

60 La figura 7 ilustra un ejemplo de un juego de electrodos funcionalizados y anclados con sondas.

Los electrodos de oro o de ITO están grabados sobre una lámina de vidrio.

65 Los depósitos de sondas (punto de hibridación o unidad de hibridación) se realizan según el caso sobre los electrodos o entre los electrodos. En el procedimiento, únicamente se describirá la utilización de los depósitos sobre los electrodos.

La figura 8 ilustra un ensamblado de los pares de electrodos de línea.

Los pares de electrodos de línea se obtienen disponiendo dos láminas grabadas de electrodos una frente a la otra. Una de las láminas está funcionalizada, la otra no lo está.

5 La figura 9 ilustra una red de capilares que hay que intercalar entre los dos juegos de electrodos funcionalizados y no funcionalizados.

10 La figura 10 ilustra un juego de electrodos funcionalizados, completado por los electrodos curvos de unión y los electrodos de depósito.

La figura 11 ilustra un ensamblado de los dos juegos de electrodos funcionalizados y no funcionalizados alrededor de la red de capilares.

15 La figura 12 ilustra una secuencia de cargas aplicadas a los electrodos para hacer migrar de forma secuencial a las dianas de un electrodo al otro, por lo tanto, de un punto de hibridación al otro.

La figura 13 ilustra unos pocillos semiabiertos con un suelo formado por los electrodos funcionalizados.

20 Estos se abren dentro de los capilares de la red de capilares. Estos pocillos evitan la dispersión de las dianas por difusión.

La figura 14 ilustra una variante del dispositivo con una sola red de capilares.

25 El segundo depósito se suprime en beneficio de un canal transversal y de un sistema de retardo.

El segundo electrodo de unión (V) es rectilíneo. Este sirve para delimitar una frontera electrostática infranqueable para las dianas cargadas. Cuando el electrodo (V) es saliente con respecto al canal transversal (W), el efecto del retardo se amplifica. El segundo electrodo de unión permite desplazar de forma selectiva las sondas dentro del canal transversal.

30

La figura 15 ilustra un dispositivo para la detección mediante la SPR *in situ*.

Un prisma triédrico se une a la parte posterior del electrodo no funcionalizado.

35

La figura 16 ilustra un principio de detección mediante la SPR sobre el electrodo no funcionalizado.

- 1) Las dianas deshibridadas se mantienen en su sitio por medio del campo eléctrico.
- 2) Las dianas migran por medio del campo hasta el electrodo no funcionalizado.
- 3) Tiene lugar la detección mediante la SPR.
- 4) La corriente se puede cortar alternativamente para mejorar la detección.

40

La figura 17 ilustra un dispositivo de dos juegos de electrodos cruzados y superpuestos para realizar las mediciones de impedancia.

45

La figura 18 ilustra una cuadrícula que sustituye el juego de electrodos funcionalizados para las mediciones de impedancia con corriente discontinua.

La figura 19 ilustra una cuadrícula que sustituye el juego de electrodos funcionalizados para las mediciones de impedancia con corriente alternativa.

50

Ejemplos

1. Ejemplo de dispositivo para detectar las moléculas de ADN o de ARN contenidas en una muestra biológica.

55

1.A La matriz de microcolumnas

La matriz de microcolumnas (1) está formada por N líneas y P columnas de microcolumnas de 50 μm de diámetro y de 100 μm de longitud, grabadas o moldeadas en el espesor de un material de tipo vidrio, sílice o plástico (figura 1A). Los pocillos son perpendiculares al plano principal del chip. Cada pocillo se llena con un gel de poliacrilamida y las sondas moleculares específicas se inmovilizan en unas partículas cuyo diámetro es superior a la malla del gel. Los pocillos de cada línea de la matriz de microcolumnas están unidos por un electrodo común, que forma un electrodo de línea de pocillo (21). Este electrodo está formado por una fina capa de oro media en los pocillos separando a cada uno en dos semipocillos. Un segundo juego de electrodos, espejo de los electrodos medios de línea, está dispuesto a la salida de los pocillos de la matriz de microcolumnas, se trata de los electrodos de línea distal (22). Cada electrodo de línea distal es paralelo a un electrodo de línea medio que forma unos pares de

60

65

electrodos de línea (figura 1B). Estos pares de electrodos permiten aplicar el potencial deseado al nivel de cada línea de pocillos. Los electrodos distales están realizados de la misma manera que los electrodos medios.

1.B La red de capilares estratificados

Cada pocillo está conectado por dos canales a las dos redes de capilares estratificados situados respectivamente por encima y por debajo del plano de los pocillos (ver figura 2). La red superior de capilares está formada por N capilares paralelos (capilares superiores) (3), la red inferior está formada por P capilares paralelos (capilares inferiores) (4), la disposición N / P, obviamente, se puede invertir entre los dos estratos de capilares. Un mismo capilar de la red superior está conectado a los P pocillos de una línea de la matriz de microcolumnas, respectivamente un mismo capilar de la red inferior está conectado a los N pocillos de una columna de la matriz de microcolumnas. Las conexiones se realizan por medio de los canales de conexiones que se han descrito con anterioridad, de tal modo que la dirección entre las dos redes de capilares inferior y superior sea perpendicular. Por esta razón, cada capilar de la red superior está conectada con todos los capilares de la red inferior por medio de una línea de P pocillos de la matriz de microcolumnas. De forma recíproca, cada capilar de la red inferior está conectado a todos los capilares de la red superior por medio de una columna de N pocillos de la matriz de microcolumnas.

Los capilares presentan un diámetro comprendido entre 1 y 100 μm . El conjunto de los capilares de la red superior desemboca dentro de un capilar transversal (31) (canal transversal superior) con un diámetro comprendido entre 2 y 1.000 μm . El canal transversal superior une, por lo tanto, a todos los capilares de la red superior, es perpendicular a la dirección de la red superior. Los extremos de los capilares de la red superior opuestos al canal transversal se paran en la última conexión con los P-ésimos y últimos pocillos de las líneas de pocillo de la matriz de microcolumnas. El conjunto de los capilares de la red inferior desemboca dentro de un capilar transversal (41) (canal transversal inferior) con un diámetro comprendido entre 2 y 1.000 μm . El canal transversal inferior une, por lo tanto, a todos los capilares de la red inferior. Los capilares de la red inferior se realizan de tal modo que el recorrido comprendido entre la conexión con el primer pocillo de una columna de pocillos y el canal transversal inferior presenta una longitud diferente de un capilar inferior al otro. Esta parte de un capilar de la red inferior se denomina retardo. El retardo se obtiene realizando un canal transversal inferior que hace un ángulo diferente de 90° con la red de capilares inferior. Según el ángulo seleccionado, los retardos son crecientes o decrecientes entre los capilares inferiores sucesivos.

El extremo de los capilares de la red de capilares inferiores opuestos al canal transversal está conectado a un segundo capilar transversal (7) (canal transversal inferior secundario) que permite el establecimiento de un flujo entre las dos redes de capilares inferior y superior a través de la matriz de pocillos. El canal transversal inferior principal se llena con un gel líquido de electroforesis capilar con el fin de realizar a este nivel una electroforesis capilar, se puede entonces establecer un flujo en ciclo cerrado entre el canal transversal superior y el canal transversal inferior secundario (figura 2).

Se disponen unos electrodos al nivel de los canales transversales superior e inferior.

El canal transversal superior está provisto de un pistón (6) roscado o no, que puede permitir seleccionar el número de líneas de pocillos a través de los cuales pasará el flujo. Volviendo hacia atrás, el pistón moviliza cada vez más líneas de pocillos de la matriz de microcolumnas.

1.C Detector

La detección de las moléculas a la salida del canal transversal inferior se realiza por medio de un espectrómetro de masa (5).

El canal transversal inferior es contiguo a la ionización por electro spray (ESI) (44) de un espectrómetro de masa (figura3). Está conectado al detector por medio de una pipeta piezoeléctrica (43) o térmica que permite una inyección regular dentro del electro spray.

2. Ejemplo 2 de un dispositivo sin pistón

El ejemplo que se da a continuación ilustra otro dispositivo adaptado para la separación y el análisis de moléculas de ácidos nucleicos contenidas en una muestra biológica y que permite la desnaturalización de las dianas moleculares retenidas en las microcolumnas y su migración al detector únicamente mediante la utilización de campos eléctricos.

La matriz de microcolumnas y la red de capilares son prácticamente idénticas al ejemplo 1 con la excepción de las siguientes diferencias:

El dispositivo no comprende ningún pistón al nivel del canal transversal superior. Por el contrario, el canal transversal inferior y el canal transversal superior están unidos a unos depósitos de amortiguación de desnaturalización que contiene una sal de hidróxido de amonio (NH_4OH).

3. Ejemplo 3, preparación de una microcolumna que contiene un conjunto de ácidos nucleicos representativos de un transcriptoma y su utilización para el análisis de un transcriptoma.

5 Cada microcolumna, como por ejemplo la que se describe en el ejemplo 1 o 2, comprende un soporte o unas partículas en las que se inmoviliza el conjunto de los ácidos nucleicos representativos del transcriptoma que hay que analizar (ADN, ARN u oligonucleótido...).

10 Para evitar la presencia de cola poli A de gran tamaño, la retrotranscripción de la muestra de ARN mensajero que hay que analizar se realiza a partir de cebos como 5' (T)₁₉ X3' en la que X puede ser A, C o G. La retrotranscripción se realiza de este modo a partir del primer nucleótido diferente de A que se encuentra tras la cola de poli A.

15 Para obtener una muestra de ADNc representativo del genoma fijado sobre un soporte o en una partícula, los cebos que se han descrito con anterioridad se fijan previamente sobre dicho soporte o dichas partículas, antes de la retrotranscripción. Los productos de retrotranscripción también pueden anclarse tras la retrotranscripción sobre el soporte. El anclado se puede asegurar mediante unos acoplamientos de biotina-avidina por medio de unos cebos 5' (T)₁₉ X3' biotinilados en 5' (también se puede utilizar una complejación química entre las partículas y las dianas).

20 El dispositivo que se da a conocer para separar y/o detectar varias dianas moleculares disueltas en una mezcla compleja comprende un juego de partículas magnéticas sobre el que se inmoviliza el conjunto de las dianas representativo del transcriptoma que hay que analizar, y un juego de sondas.

Cada tipo de sondas del juego de sondas es específico y complementario de un tipo de dianas para formar una mezcla estequiométrica.

25 Estas partículas o soporte que contiene un conjunto de ADNc representativo de un genoma se disponen a continuación dentro de una microcolumna del dispositivo. Se obtiene de este modo un chip de microcolumna, del que cada microcolumna permite analizar un transcriptoma de acuerdo con el siguiente procedimiento:

30 El dispositivo se utiliza con un juego de sondas en el que cada tipo de sondas que compone la mezcla es específico y complementario de un tipo de dianas y de uno solo entre los tipos de dianas inmovilizadas dentro de las microcolumnas para formar una mezcla estequiométrica.

35 Cada tipo de sonda presente en la mezcla de este modo se puede identificar de forma inequívoca por su masa molecular. Esta especificidad de masa molecular se obtiene combinado tres criterios: la fórmula química, el tamaño y eventuales marcados con átomos pesados. La combinación de estos tres criterios permite producir un número astronómico de sondas. Para un tamaño de polímero de ADN igual a M, tal que $M = n + m + l + j$, se puede realizar un número de fórmula química (A_n C_m T_i G_j) igual a $(n + m + l + j)! / (n! * m! * l! * j!)$.

40 Las sondas complementarias se hibridan de forma específica en las moléculas diana retenidas sobre el soporte o en las partículas; se trata de la etapa de separación. Una vez que se ha aclarado el sistema y se han eliminado las sondas no hibridadas, las moléculas de sondas hibridadas al nivel del soporte o de las partículas se desnaturalizan de manera controlada. Se puede entonces realizar una cuantificación de cada tipo de moléculas de sondas hibridadas sobre el soporte o sobre las partículas que contienen las dianas inmovilizadas.

45 Para minimizar las hibridaciones no específicas, las secuencias se hibridan en presencia de pequeños polímeros nucleotídicos (X)_n en donde X representa A, T, G o C, y N varía de 3 a 7 nucleótidos para formar todas las secuencias posibles de n nucleótidos.

50 Este procedimiento también se puede aplicar para las proteínas en el campo del estudio de un proteoma. La mezcla de proteínas que hay que estudiar se fija sobre un soporte o sobre unas partículas. Las dianas están formadas por anticuerpos o por cualquier otro ligando específico, la masa molecular de cada tipo de sondas permitirá su identificación de manera inequívoca.

55 Para eliminar las indeterminaciones entre diferentes tipos de sondas que presentan una masa molecular idéntica, las sondas pueden estar emparejadas con unas moléculas inertes que modifican la masa molecular de la sonda. Para aumentar aún más la discriminación de la detección, se realiza una cromatografía capilar antes de la inyección dentro del espectrómetro de masa. Esta cromatografía capilar permite separar las sondas de acuerdo con su tamaño. El espectrómetro de masa y la electroforesis capilar se emparejan con una pipeta piezoeléctrica.

60 Una alternativa consiste en discriminar las sondas por medio de marcadores de fluorescencia. Cada tipo de sondas está definido de manera inequívoca por su tamaño y un marcador de fluorescencia. La combinación de estos dos criterios permite alcanzar un grado de complejidad del orden del millar combinando, por ejemplo, cinco marcadores de fluorescencias diferentes con dos sondas cuyos tamaños van paulatinamente de 20 a 200 bases. Obviamente se puede aumentar la complejidad de la mezcla de sondas aumentando el intervalo de tamaño autorizado para las sondas y el número de marcadores de fluorescencia utilizados.

65

El procedimiento se ha rechazado para utilizarlo directamente en disolución por medio de un juego de partículas magnéticas en el que se inmoviliza el conjunto de las dianas, representativo del transcriptoma que hay que analizar, y un juego estequiométrico de sondas como el que se ha descrito con anterioridad. Las partículas magnéticas sirven para aislar las sondas hibridadas. En efecto, las partículas hibridadas se aíslan mediante un campo magnético producido por un imán simple. Una vez que se ha aclarado el sistema y se han eliminado las sondas no hibridadas, las sondas hibridadas se deshibridan de manera controlada, el análisis del eluido por medio de uno de los métodos que se han descrito con anterioridad permite definir la composición del transcriptoma analizado.

Este procedimiento se sustituye por un chip de ADN clásico, en particular en los estudios del transcriptoma y de la CGH (comparative genomic hybridization).

4. Ejemplo 4: Aplicación de un chip de microcolumnas tal y como se ha descrito en el ejemplo 1 para el análisis de muestras de ARN

El dispositivo que se describe en el ejemplo 1 permite analizar una mezcla de moléculas de ácidos nucleicos. El análisis se puede realizar a partir de un extracto celular simple de ARN, pero también de dos extractos diferentes.

Para el análisis de dos extractos de ARN diferentes con una detección mediante espectrometría de masa, convendrá marcar al menos una de las dos poblaciones de ARNm. EL marcado se realiza mediante retrotranscripción con incorporación de un isótopo pesado. Los isótopos pesados se seleccionan entre: O^{18} , O^{17} , N^{15} , C^{13} , H^2 , o cualquier otro isótopo pesado que se pueda diferenciar mediante la masa de la forma común. Estos isótopos pesados se incorporan a los nucleótidos que entran en la síntesis de los ácidos nucleicos. La segunda población de ARNm que hay que analizar se retrotranscribe en ADNc sin incorporación de átomos pesados, o incorporación de átomos pesados diferentes de los de la primera población.

Para evitar cualquier confusión con eventuales productos de descomposición, los cebos $5' (T)_{19} X3'$, en la que X puede tomar los valores A, G o C, están marcados con unos átomos pesados, diferentes de los que eventualmente se utilizan para el resto de la molécula en el caso de una detección mediante espectrómetro de masa. En la detección mediante fluorescencia, estos cebos se marcan con cromóforos.

La retrotranscripción se para de forma brusca en una fase inicial, de este modo el tiempo de elongación es idéntico para todos los ADNc, se obtienen unas moléculas de ADNc en una escala de pequeño tamaño más fácilmente identificable en masa. Este procedimiento también se puede utilizar para la preparación de las dianas de ADNc que se pueden utilizar con los chips clásicos de ADN.

Una vez se obtienen las dos poblaciones de ADNc, estas se mezclan de manera equimolar (también se pueden tratar unas mezclas heterogéneas de ARNm/ADNc). La mezcla se introduce dentro de un circuito cerrado que circulará varias veces por cada microcolumna (ver figura 2). Durante el paso por las microcolumnas, las dianas se hibridan con las sondas complementarias. La circulación en el interior del circuito cerrado permite homogeneizar la mezcla tras cada paso por las microcolumnas. Una resistencia situada al nivel de las tuberías de admisión, por ejemplo, permite regular la temperatura de la solución de hibridación, pero también realizar las variaciones térmicas a lo largo del ciclo de hibridación, permitiendo esto controlar la especificidad de la hibridación. Una cámara de sonicación permite eventualmente homogeneizar el tamaño de las moléculas que hay que hibridar rompiendo las dianas de ADNc en moléculas de tamaño más pequeño, las sondas formadas por oligonucleótidos (entre 20 y 100 pb) facilitan en efecto la hibridación de las dianas de tamaño equivalente.

Una vez realizada la hibridación, el circuito se abre y se aclara abundantemente (etapas de lavado) con una solución que elimina las moléculas no hibridadas o no hibridadas de forma específica.

El sistema se acopla entonces al electro spray de un espectrómetro de masa y se establece una diferencia de potencial eléctrico entre los pares de electrodos de línea de las microcolumnas de la matriz, positivo en el nivel medio y negativo en el nivel distal. Del mismo modo, se establece una diferencia de potencial eléctrico al nivel de los electrodos de los canales transversales, negativo al nivel del canal transversal superior y positivo al nivel del canal transversal inferior. Dada la polaridad de los electrodos, las moléculas hibridadas se mantienen dentro de cada pocillo de hibridación. El pistón se dispone de tal modo que la circulación solo se pueda hacer entre las dos redes superior e inferior mediante las microcolumnas de la primera línea de microcolumnas de la matriz (figura 4). Se inyecta entonces una solución desnaturalizante cuya temperatura está controlada por la resistencia (situada, por ejemplo, al nivel del canal transversal superior) en flujo laminar y difuso a través de las microcolumnas de la primera línea, la más próxima al canal transversal inferior, el pistón impidiendo el acceso a las otras líneas de microcolumnas. El agente desnaturalizador desnaturaliza los complejos de sondas-dianas, el campo eléctrico impide la difusión de las dianas fuera de los pocillos.

La desnaturalización térmica también se puede considerar como alternativa. Al aumentar la temperatura del amortiguador dentro de cada microcolumna, se produce la desnaturalización del dúplex formado entre la sonda fija y la diana y la diana se vuelve a disolver mientras que la sonda permanece fijada sobre la matriz.

El campo eléctrico entre el par de electrodos de la primera línea se invierte a continuación o simplemente se corta, la diferencia de potencial eléctrico entre el par de electrodos de los canales transversales se mantiene (figura 5). Las dianas de cada microcolumna de la primera línea pasan entonces dentro de los capilares correspondientes de la red inferior, las sondas se transportan o migran mediante electroforesis a través de estos capilares hasta el canal transversal inferior. Las dianas de los diferentes de las diferentes microcolumnas llegan con tiempos diferentes dentro del canal inferior transversal en función de los retardos respectivos de los capilares de la red inferior. Por esta razón, las diferentes dianas llegan dentro de los capilares del detector (electro spray) acoplado al canal transversal inferior con unos tiempos diferentes para el análisis. Para que no haya mezcla entre las dianas que proceden de microcolumnas diferentes, por lo general es necesario trabajar con flujo laminar muy lento. La utilización de varias sondas por microcolumnas permite determinar todas las formas de empalme del gen.

5. Ejemplo 5: Aplicación de un chip de microcolumnas tal y como se ha descrito en el ejemplo 2 para el análisis de muestras de ARN

En el siguiente procedimiento, no es necesario que los fluidos circulen dentro de los capilares para la desnaturalización de las dianas y su migración hacia el espectrómetro de masa.

En este procedimiento se utilizará el dispositivo que se ha descrito en el ejemplo 2. La aplicación de las etapas de hibridación y de aclarado es idéntica a la que se ha descrito en el ejemplo 4. Tras la hibridación y el aclarado, el canal transversal superior se une al depósito de amortiguación que contiene el agente caotrópico capaz de migrar dentro de un amortiguador de campo eléctrico, el canal transversal inferior se conecta al segundo depósito que contiene el mismo amortiguador. Los electrodos del canal transversal superior e inferior, así como los electrodos distales de línea se mantienen con un potencial negativo con respecto a los electrodos medios de línea que se mantienen con un potencial positivo. La migración de los iones y de los agentes caóticos, al ánodo y al cátodo, el pH del amortiguador, así como la diferencia de potencial, implican la desnaturalización de los complejos de biopolímeros sondas-dianas (figura 6).

Las sondas se mantienen fijadas sobre la matriz debido a la unión fuerte con esta, las dianas cargadas negativamente y libres también se mantienen al nivel de los electrodos medios de línea cargados positivamente. Una vez desnaturalizados los complejos sonda/diana, los electrodos de los canales transversales se llevan a un diferencial eléctrico, negativo para el del canal transversal superior y positivo para el del canal inferior, el potencial eléctrico manteniéndose positivo en el caso de los electrodos medios y negativo en el caso de los distales, las dianas se confinan, por lo tanto, dentro de una cámara electrostática dentro de cada microcolumna que impide cualquier migración.

Las diferencias de potenciales entre los electrodos de líneas de la matriz de microcolumnas se anulan entonces de forma sucesiva línea por línea, implicando la migración sucesiva de las dianas de cada línea dentro de los capilares de la red inferior correspondiente mediante electroforesis. Las dianas migran hasta el canal transversal inferior en función de las distancias de recorrido respectivas de su capilar. A la salida del canal transversal inferior, se realiza el análisis.

6. Ejemplo 6: Microsecuenciación de los biopolímeros separados y aislados dentro de cada microcolumna

Los procedimientos permiten la secuenciación de las dianas de ácidos nucleicos o de proteínas separadas y analizadas dentro del espectrómetro de masa.

La micro-secuenciación consiste en realizar unos clivajes aleatorios en la secuencia de ácido nucleico y a continuación identificar los productos resultantes mediante un espectrómetro de masa. Los clivajes aleatorios pueden ser químicos, físicos, mecánicos o enzimáticos. Por ejemplo, las fracciones enzimáticas se podrán obtener mediante la acción de una mezcla enzimática formada por enzimas fijadas dentro de una microcolumna, esta microcolumna estando dispuesta, por ejemplo, entre el capilar de la detección y el canal transversal inferior. Cuando los biopolímeros atraviesan esta microcolumna, se degradan parcialmente. El análisis de los productos de degradación permite deducir la secuencia de estas. Las enzimas, como las endonucleasas para los ácidos nucleicos o endopeptidasa para las proteínas permiten, por ejemplo, obtener las fracciones aleatorias dentro de estos biopolímeros. El uso de exonucleasas para los ácidos nucleicos y de exopeptidasas para las proteínas permite unas digestiones parciales. El análisis de los productos de estas reacciones permite obtener la secuencia de los biopolímeros retenidos de forma específica dentro de cada una de las microcolumnas. Los clivajes químicos se obtienen por degradación química controlada de los biopolímeros por medio de un ácido, de una base o de cualquier otro producto químico.

Las degradaciones mecánicas se obtienen, por ejemplo, mediante la utilización de ultrasonidos, de microondas o de microfrecuencias capaces de segmentar los biopolímeros. Por último, las descomposiciones físicas se pueden obtener mediante un flujo de electrones o mediante un bombardeo con átomos pesados que interactuarán con el biopolímero. El conjunto de estos tratamientos permite fracturar el biopolímero de acuerdo con unas combinaciones que se pueden predecir, como la ruptura de los enlaces fosfatos para los ácidos nucleicos y de los enlaces pépticos para las proteínas. Los tratamientos estarán controlados para no inducir estadísticamente más que una fracción

aleatoria por molécula. Con el fin de determinar la secuencia de los biopolímeros, es necesario disponer un marcador en al menos uno de sus extremos. El estudio de todos los iones de descomposición obtenida que comprende este marcador permite establecer la secuencia. El marcador de extremo puede existir en estado natural dentro del biopolímero o bien se introduce de forma artificial. Por ejemplo, los extremos 3' de los ARNm constan de forma sistemática de una cola poli A. Esta cola poli A puede servir como marcador de extremo. Los ADNc se obtienen mediante retrotranscripción con unos cebos como 5' (T)₁₉ X3' donde X puede ser A, C o G. La retrotranscripción se realiza de este modo a partir del primer nucleótido diferente de A que se encuentra tras la cola poli A. Para evitar cualquier confusión con eventuales productos de descomposición, los cebos 5' (T)₁₉ X3' se marcarán con átomos pesados, diferentes de los que se utilizan eventualmente para el resto de la molécula. Conociendo la masa exacta del marcador, será fácil deducir de los productos de clivaje la sucesión de los residuos en la secuencia. En el caso de las proteínas, el marcado del extremo N terminal mediante unos compuestos como el fenilisotiocianato, el 1-fluoro-2,4 dinitrobenzoceno o el cloruro de dansilo, permite determinar la secuencia. También se puede realizar un doble marcado del biopolímero en cada uno de sus extremos para aumentar el poder de resolución del método. En los casos complejos, los métodos de MSMS permiten seleccionar los iones moleculares que hay que analizar en una segunda etapa como, por ejemplo, en el caso de proteínas multiméricas. Por último, se puede determinar la secuencia de los biopolímeros de forma directa mediante el análisis sucesivo de los productos de descomposición, tal y como lo permiten los métodos de MSMS, los marcadores de extremos de secuencias determinándose por medio de unos extremos N terminal y C terminal para las proteínas, por ejemplo.

7. Aplicación de un chip de microcolumnas para el análisis de mezclas de polipéptidos

Los dispositivos se realizan de manera similar a los que se han descrito en los ejemplos 1 o 2. Cada microcolumna de la matriz está llena de anticuerpos específicos de un tipo de polipéptido. Los anticuerpos son específicos de proteínas nativas o desnaturalizadas. Los anticuerpos están directamente fijados a la pared de los pocillos o a unas partículas retenidas dentro de cada pocillo. Como en el caso de los ácidos nucleicos, se podrán utilizar anticuerpos unidos a una molécula de pirrol. El conjunto de los procedimientos aplicados para las sondas unidas al pirrol que se han descrito para los ácidos nucleicos se aplican para los anticuerpos unidos al pirrol. Los extractos celulares de polipéptidos se ponen a complejar realizando un circuito cerrado con las redes de microcolumnas. Esto permite la formación de complejos específicos de antígeno/anticuerpos al nivel de cada microcolumna. Para eluir los polipéptidos retenidos dentro de cada microcolumna, es necesario utilizar unos amortiguadores que permiten la migración de las proteínas únicamente en función de sus tamaños. Estos amortiguadores también permiten destruir el complejo de anticuerpos/antígeno. Para ello, se citarán los amortiguadores a base de SDS (sodio dodecilo sulfato) que permiten que migren todas las proteínas hacia los polos positivos, sea cual sea su punto isoeléctrico.

Descripción de las figuras

Las referencias de las figuras se definen a continuación:

- A = electrodo curvo de unión (por ejemplo, lámina de vidrio con electrodos transparentes de ITO)
- B = electrodos de línea funcionalizados (por ejemplo, lámina de vidrio con electrodos transparentes de ITO)
- C = electrodo de depósito (por ejemplo lámina de vidrio con electrodos transparentes de ITO)
- D = capilar sin suelo ni techo (por ejemplo, grabado en kaptón): plano medio
- E = capilar sin techo con suelo (por ejemplo, grabado en kaptón): plano medio
- F = depósito sin suelo ni techo (por ejemplo, grabado en kaptón): plano medio
- G = electrodos de línea no funcionalizados (por ejemplo, lámina de vidrio con electrodos transparentes de ITO)
- H = dianas no hibridadas
- I = electrodos funcionalizados
- J = electrodos no funcionalizados
- K = puntos de hibridación de sondas: unidad de hibridación
- L = prisma
- M = electrodo horizontal de rejilla
- N = electrodo vertical de fuente
- O = electrodo de punto de hibridación
- P = rejilla
- Q = fuente
- R = drenaje
- S = pocillo sin fondo ni suelo
- T = sentido de circulación de la corriente
- U = red de capilares con retardo
- V = electrodo de unión de línea para el análisis
- W = canal transversal secundario

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo para separar y/o detectar varias dianas moleculares disueltas en una mezcla compleja, dicho dispositivo comprendiendo una red de capilares (D) que permiten la circulación de la mezcla compleja introducida dentro del dispositivo, **que se caracteriza porque** comprende, por otra parte, dos juegos de electrodos (B, G) dispuestos a uno y otro lado de la red de capilares:
- un juego de electrodos funcionalizados (B), cuyos electrodos están anclados con sondas organizadas en puntos de hibridación dentro de los capilares, cada sonda siendo susceptible de retener una diana molecular específica presente en la mezcla compleja mediante unión específica sonda/diana;
 - un juego de electrodos no funcionalizados (G),
- y **porque** los capilares (D) están unidos en uno de sus extremos a un depósito (F) que consta de un electrodo circular (C) situado en el mismo plano que el del juego de electrodos funcionalizados, un electrodo de unión (A) estando situado, por otra parte, entre el electrodo circular y el primer electrodo funcionalizado, de tal modo que las distancias más cortas entre el electrodo de unión y el electrodo circular sean idénticas en cualquier punto de los electrodos.
2. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, **que se caracteriza porque** el juego de electrodos funcionalizados (B) está situado por encima de la red de capilares (D) y **porque** el juego de electrodos no funcionalizados (G) está situado por debajo de la red de capilares.
3. Dispositivo de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, **que se caracteriza porque** los capilares (D) están unidos en el otro de sus extremos a otro depósito (F).
4. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 3, **que se caracteriza porque** el otro depósito (F) consta de un electrodo circular (C).
5. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 4, **que se caracteriza porque** el electrodo circular (C) del otro depósito (F) está situado en el mismo plano que el del juego de electrodos funcionalizados (B).
6. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, **que se caracteriza porque** consta de otro electrodo de unión (A) situado entre el electrodo circular (C) del otro depósito (F) y el último electrodo funcionalizado (B), de tal modo que la distancia entre el electrodo de unión (A) y el electrodo circular (C) sea idéntica en cualquier punto de los electrodos.
7. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 6, **que se caracteriza porque** los electrodos de unión (A) son curvos.
8. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **que se caracteriza porque** los capilares (D) están unidos en el otro de sus extremos a un canal transversal (W).
9. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 8, **que se caracteriza porque** el canal transversal (W) está asociado a un electrodo rectilíneo (V) de unión que sirve de frontera eléctrica infranqueable por las sondas durante la hibridación y que permite dirigir las dianas hacia un sistema de retardo de migración por medio de los potenciales que establecen los electrodos del dispositivo.
10. Dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **que se caracteriza porque** el juego de electrodos funcionalizados (B) comprende unos electrodos de línea funcionalizados que son paralelos entre sí, y el juego de electrodos no funcionalizados (G) comprende unos electrodos de línea no funcionalizados que son paralelos entre sí.
11. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 10, **que se caracteriza porque** los electrodos de línea funcionalizados (B) son paralelos a los electrodos de línea no funcionalizados (G).
12. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 10, **que se caracteriza porque** los electrodos de línea funcionalizados (B) son perpendiculares a los electrodos de línea no funcionalizados (G).
13. Dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **que se caracteriza porque** el juego de electrodos funcionalizados (B) o no funcionalizados (G) comprende unos primeros electrodos de línea paralelos (M) y unos segundos electrodos de línea paralelos (N) que están superpuestos y son perpendiculares a los primeros electrodos de línea paralelos de tal modo que forman una cuadrícula de electrodos en un mismo plano.
14. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 13, **que se caracteriza porque** cada malla de la cuadrícula delimita un espacio en el que están dispuestos un electrodo de punto de hibridación (O) y uno o dos transistores de efecto de campo, cada transistor teniendo su rejilla (P) conectada a uno de los primeros electrodos, en un lado de la malla, su borne entrante (Q) conectado a uno de los segundos electrodos, en otro lado de la malla, y su borne saliente (R)

conectado al electrodo de punto de hibridación.

5 15. Utilización del dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para la detección y/o la dosificación de moléculas de ARN y/o de ADN específicas contenidas en una muestra biológica, en particular un extracto circular, en la que las sondas moleculares se seleccionan de tal modo que se hibridan de forma específica con un tipo de ARN o ADN contenido en la muestra biológica.

10 16. Utilización de acuerdo con la reivindicación 15, para el análisis comparativo de moléculas de ARN y/o de ADN específicas contenidas en dos muestras biológicas.

17. Procedimiento de separación y/o de dosificación de dianas moleculares contenidas en una mezcla compleja, dicho procedimiento comprendiendo:

- 15
1. la introducción de una mezcla compleja que contiene dianas moleculares que hay que separar dentro de un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14;
 2. la aplicación de un potencial eléctrico entre los electrodos del dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, de tal modo que las dianas puedan migrar desde un extremo de la red de capilares hasta el otro y que las dianas complementarias de las sondas se puedan hibridar;
 - 20 3. el análisis *in situ* o la recuperación y el análisis de cada diana hibridada con una sonda por medio de un detector.

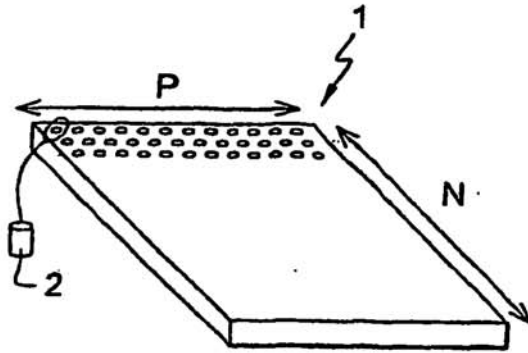


Fig. 1A

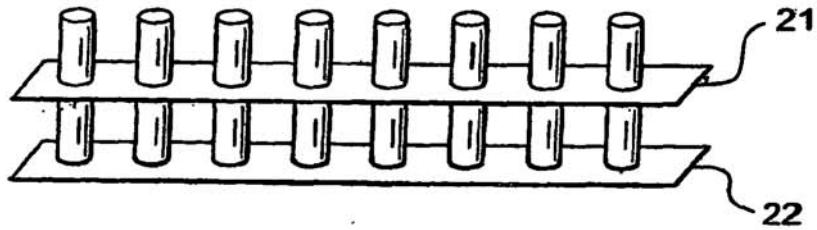


Fig. 1B

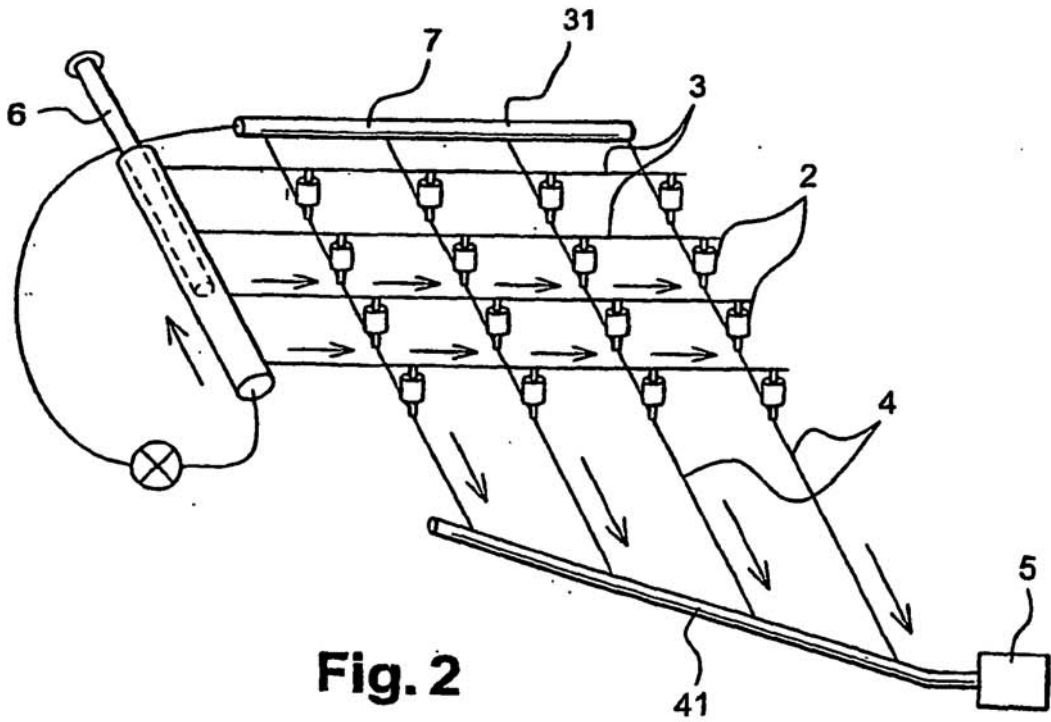


Fig. 2

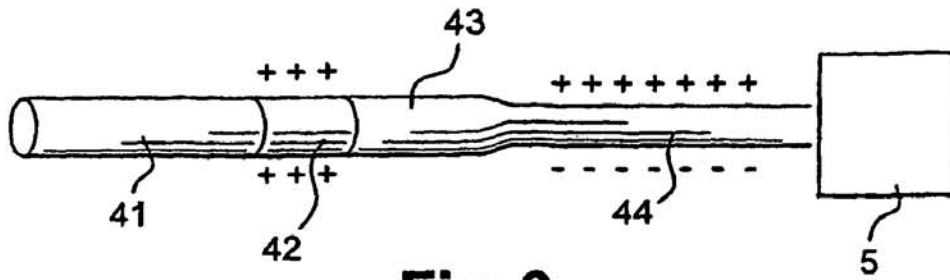


Fig. 3

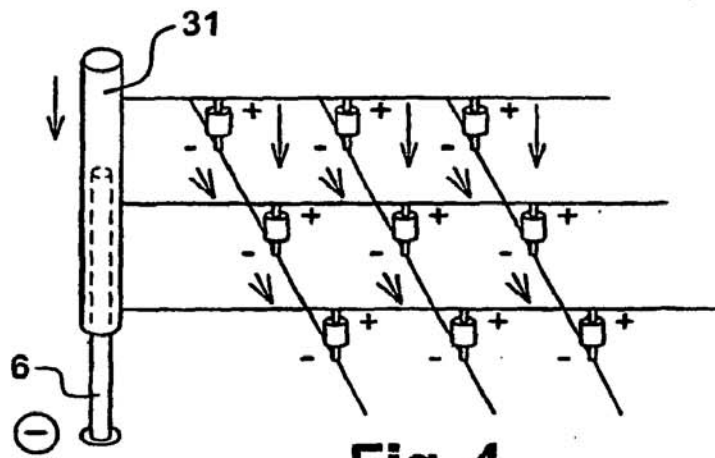


Fig. 4

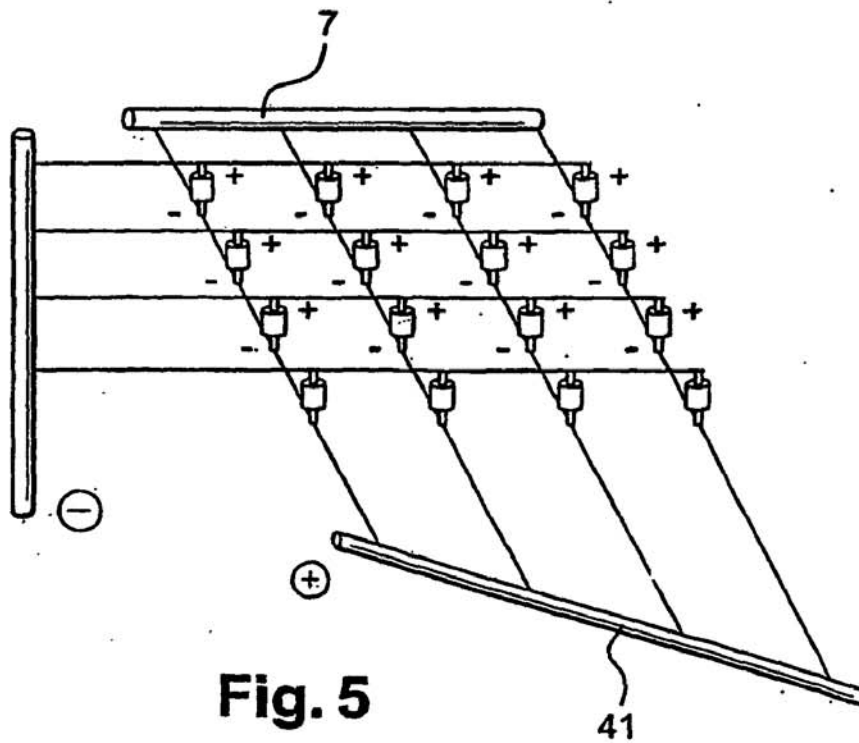


Fig. 5

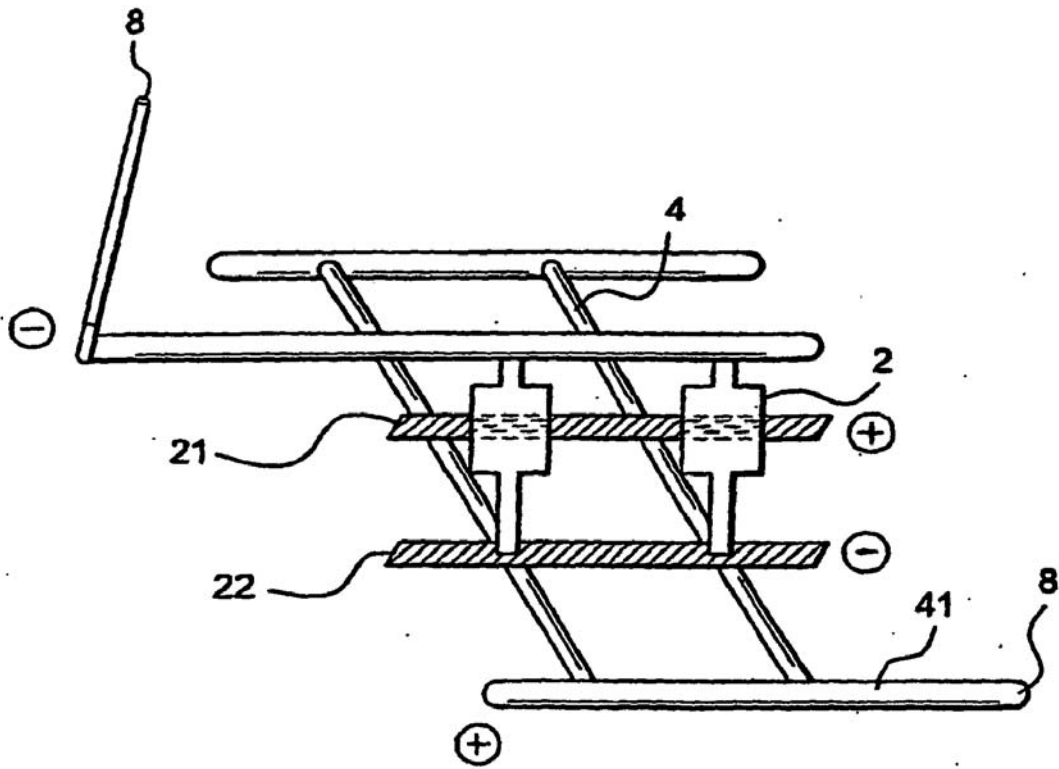


Fig. 6

fig. 7

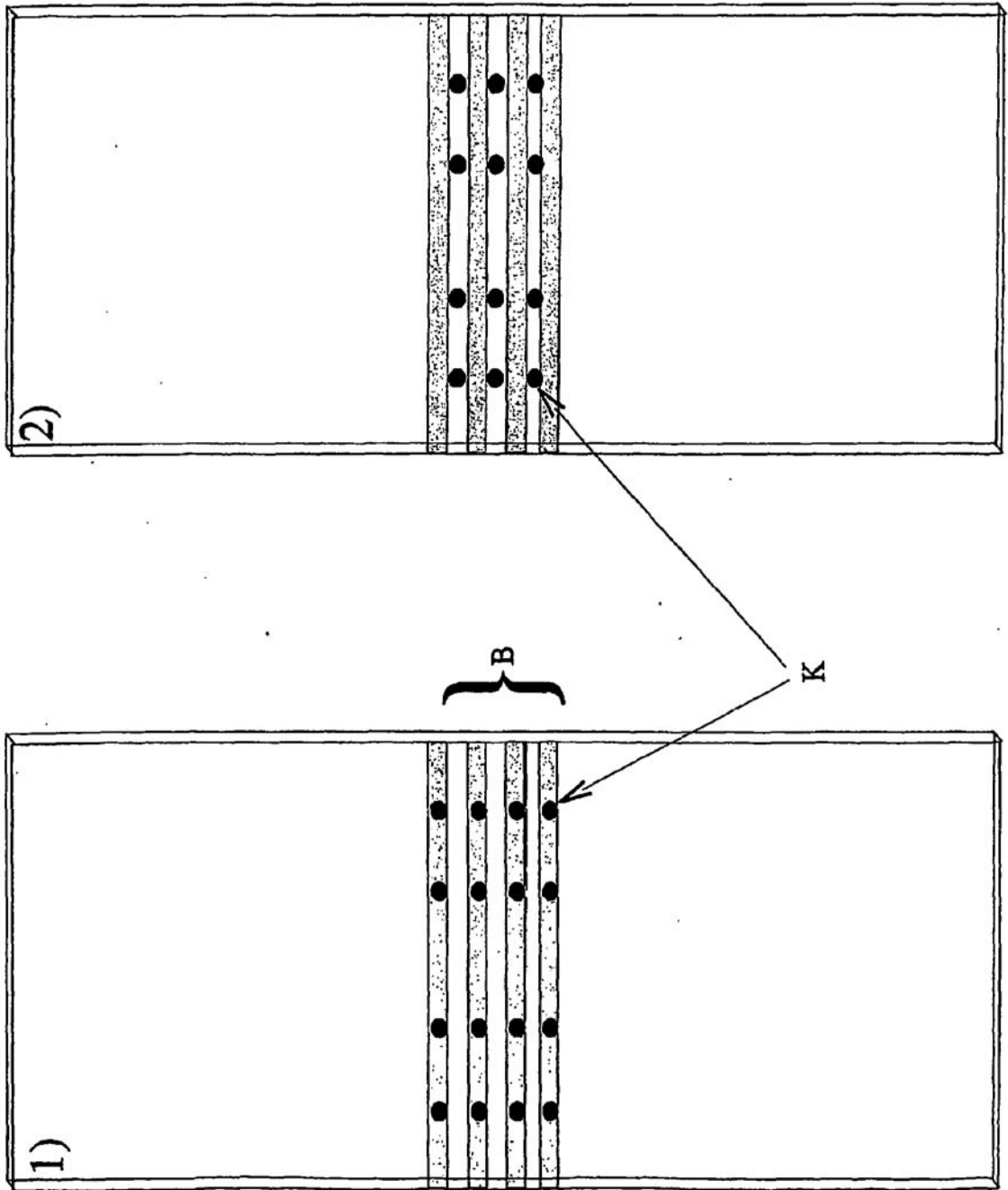
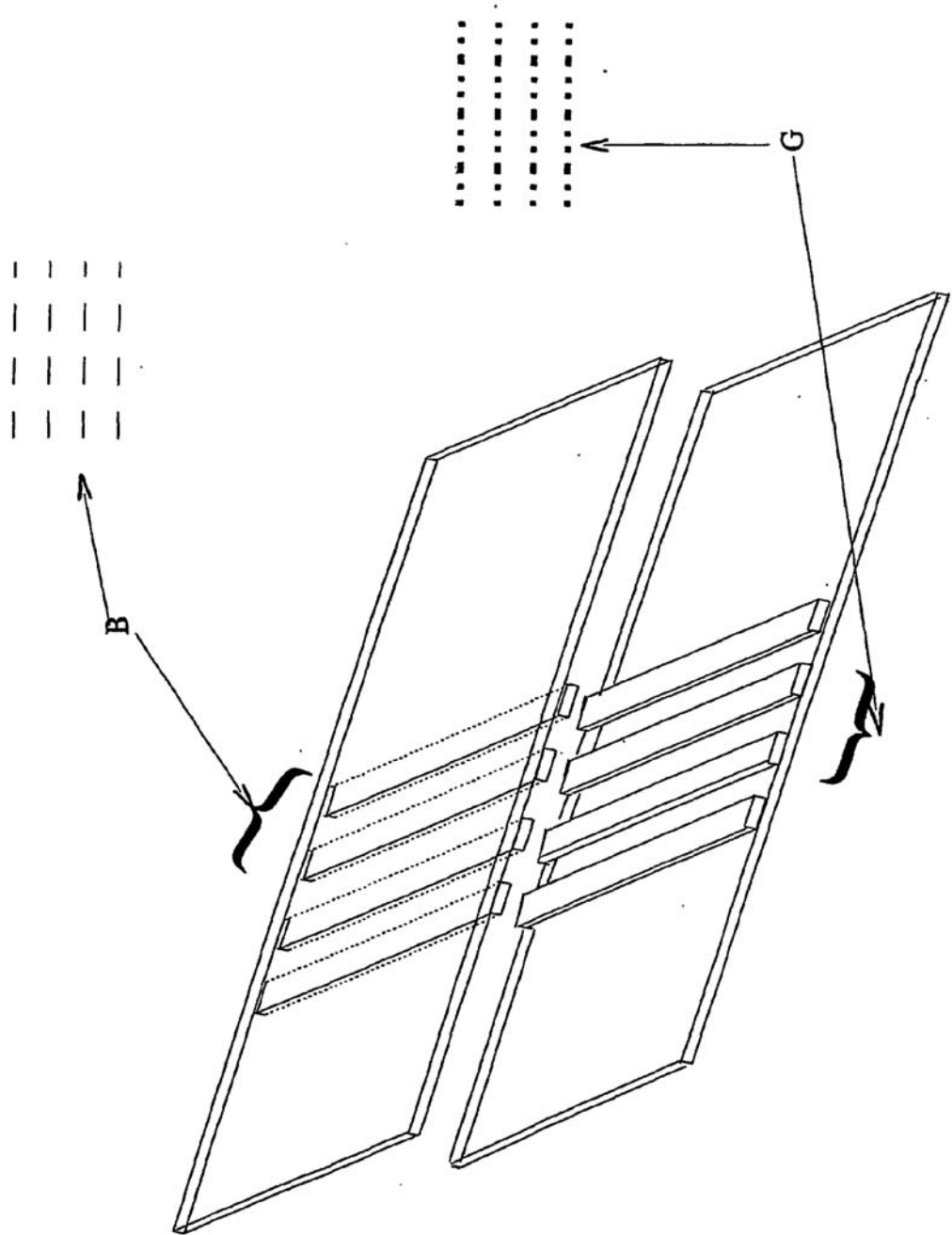


fig. 8



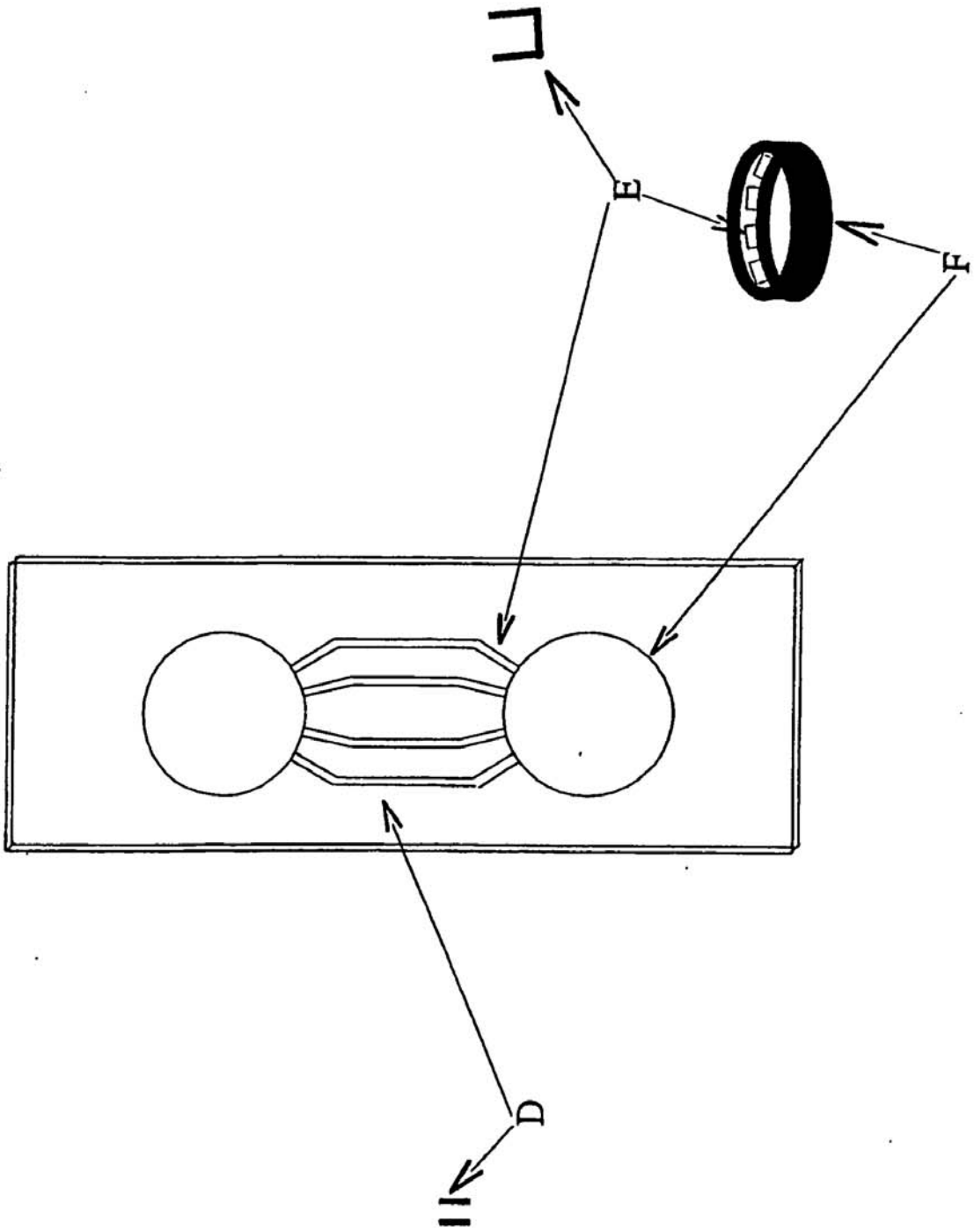


fig. 9

fig. 10

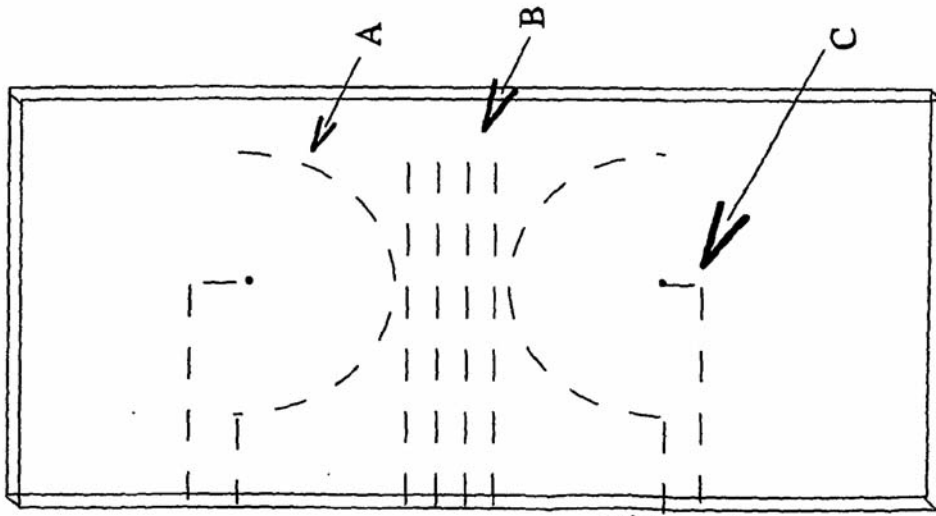


fig. 11

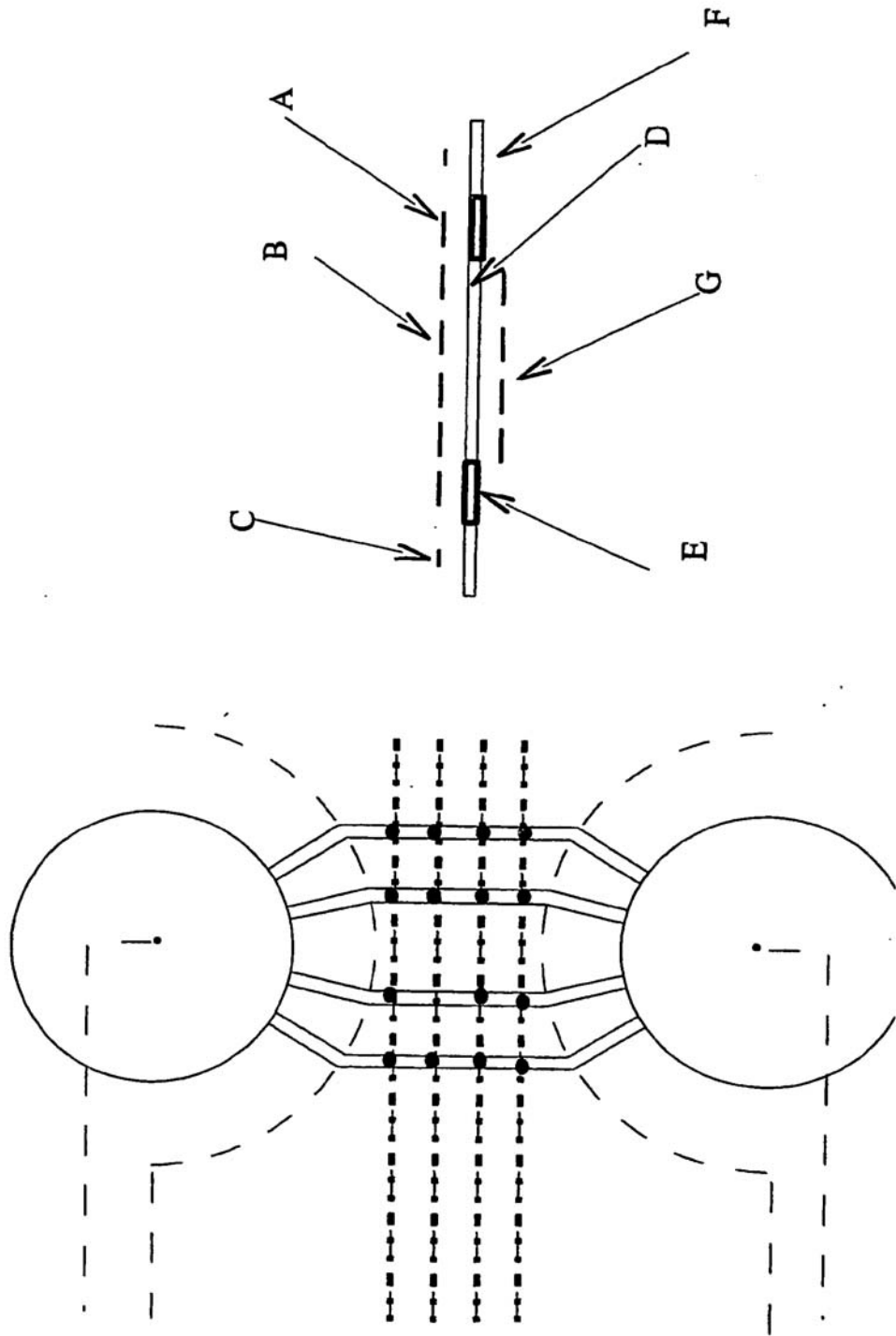


fig. 12

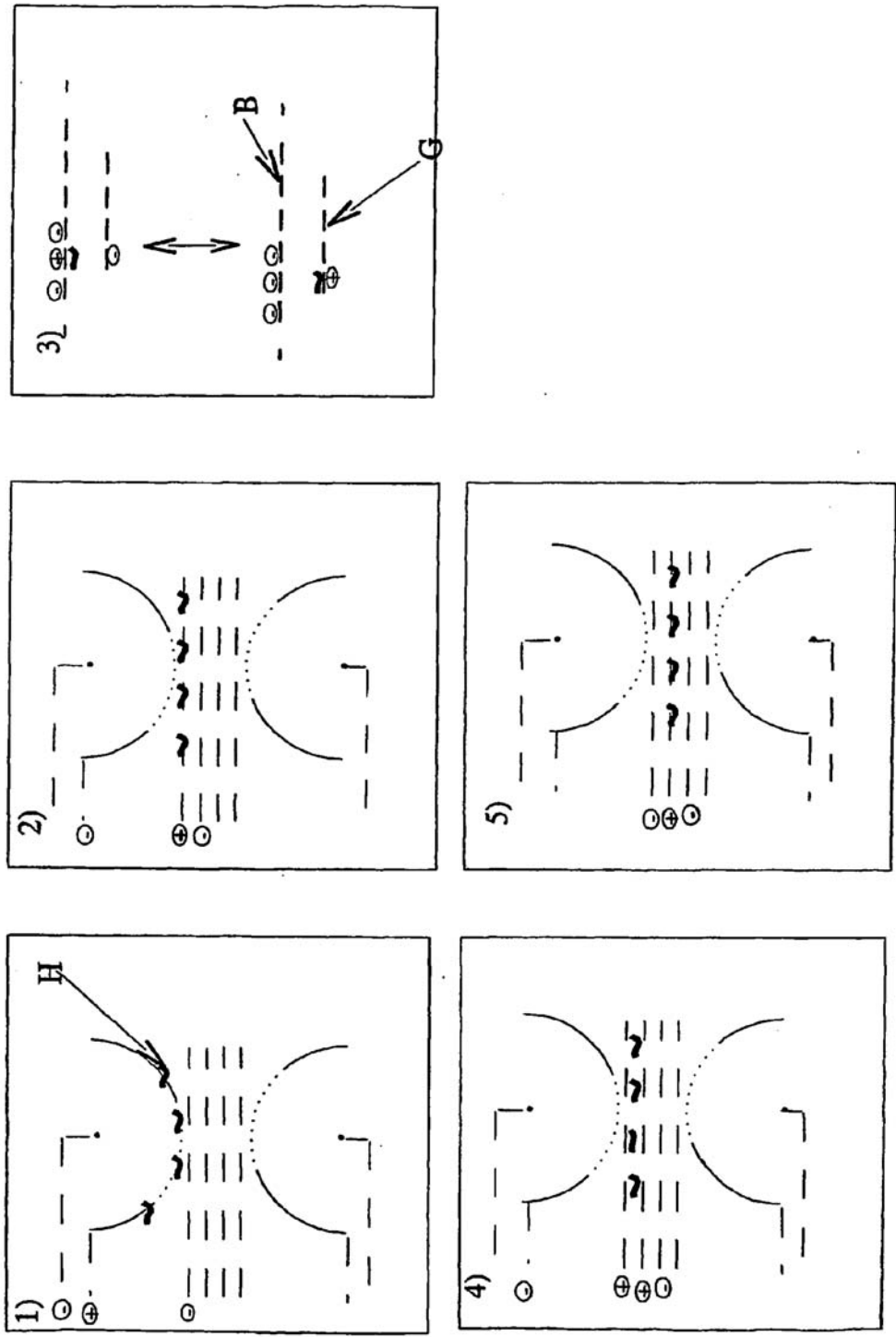
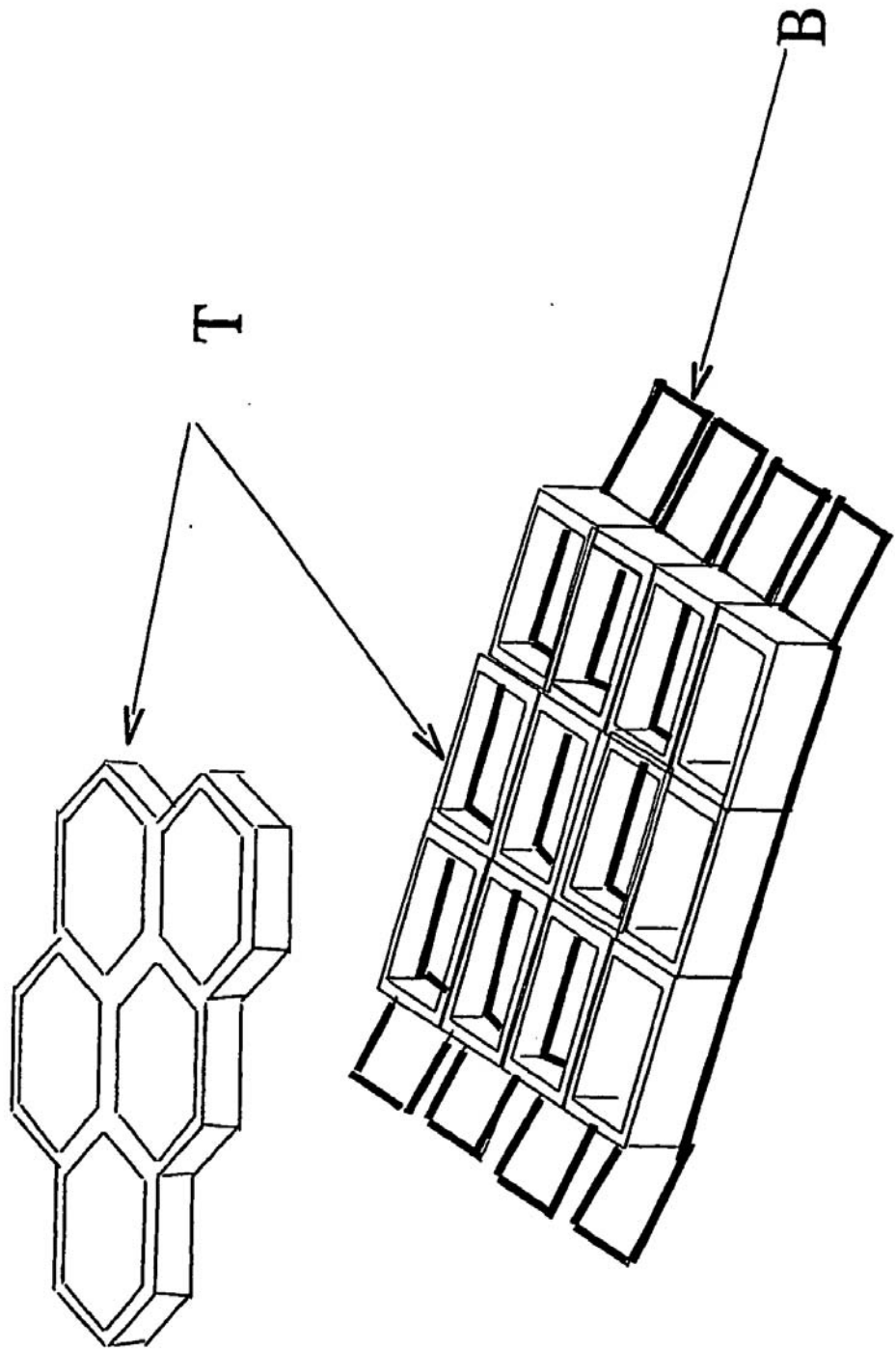
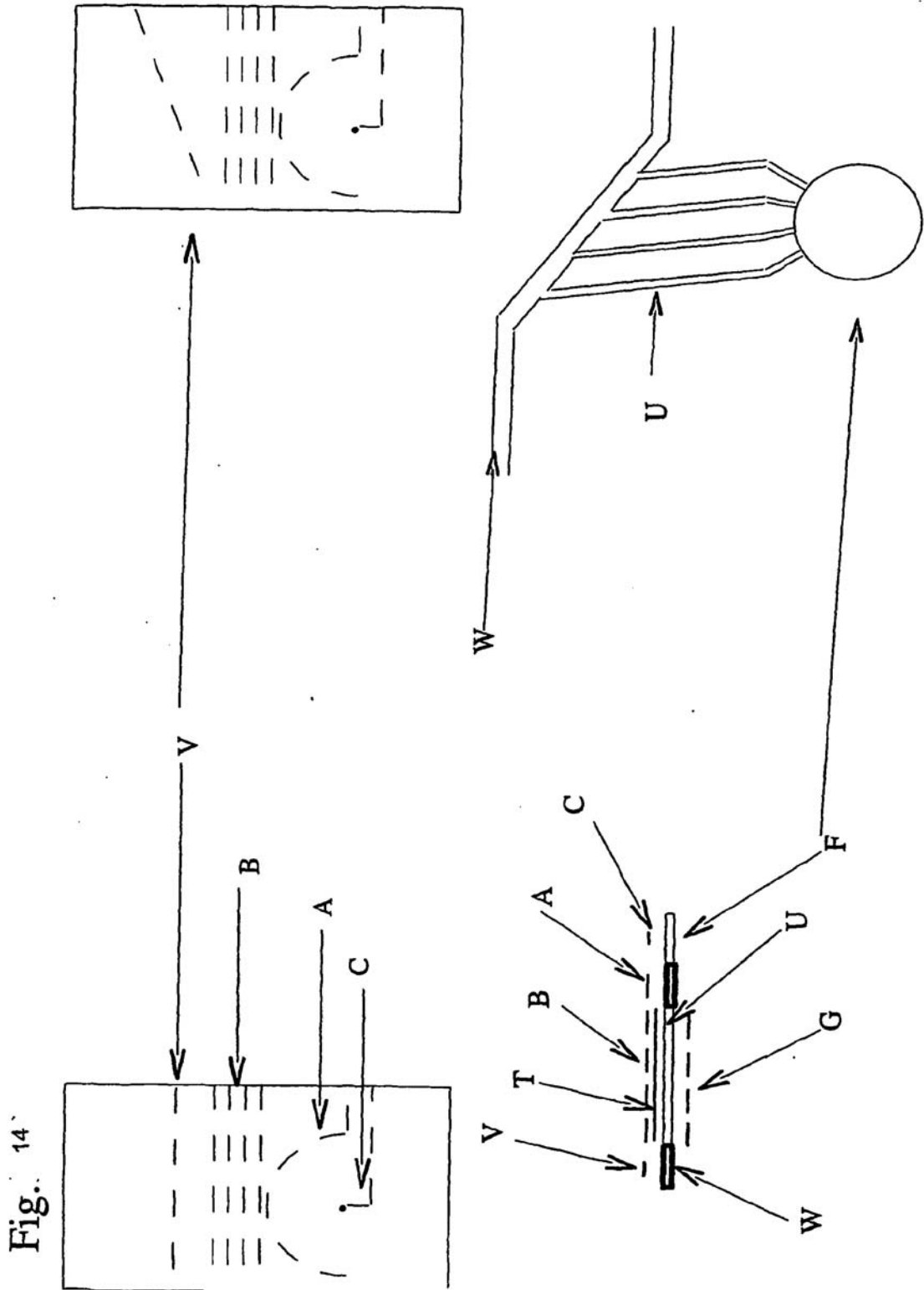


Fig. 13





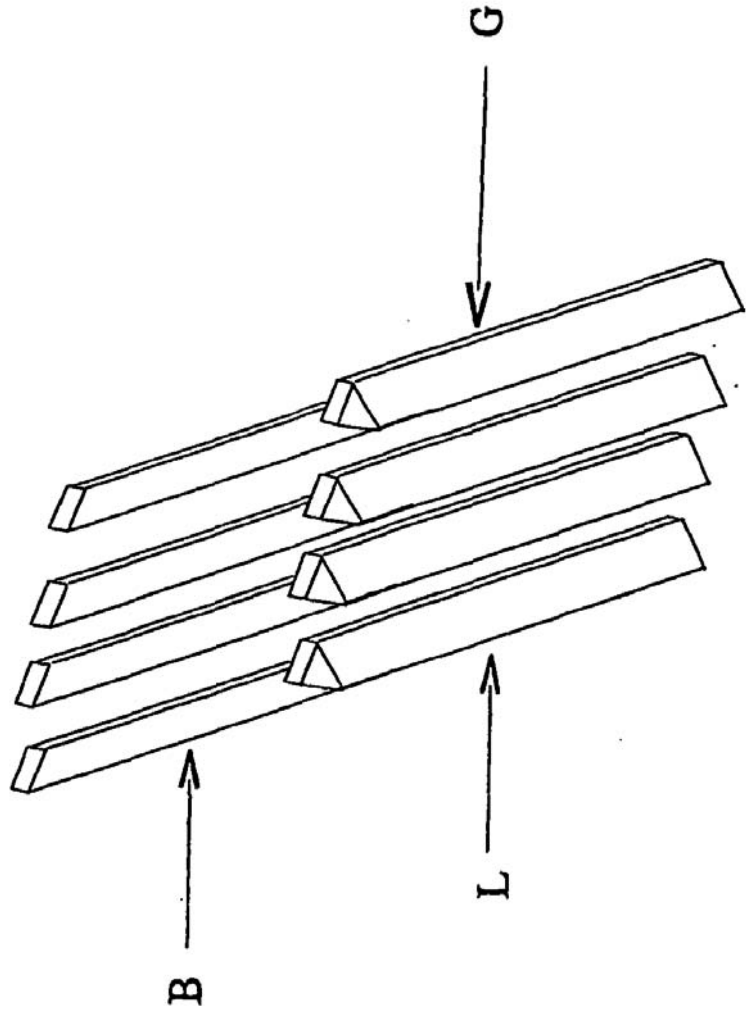


fig. 15

Fig. 16

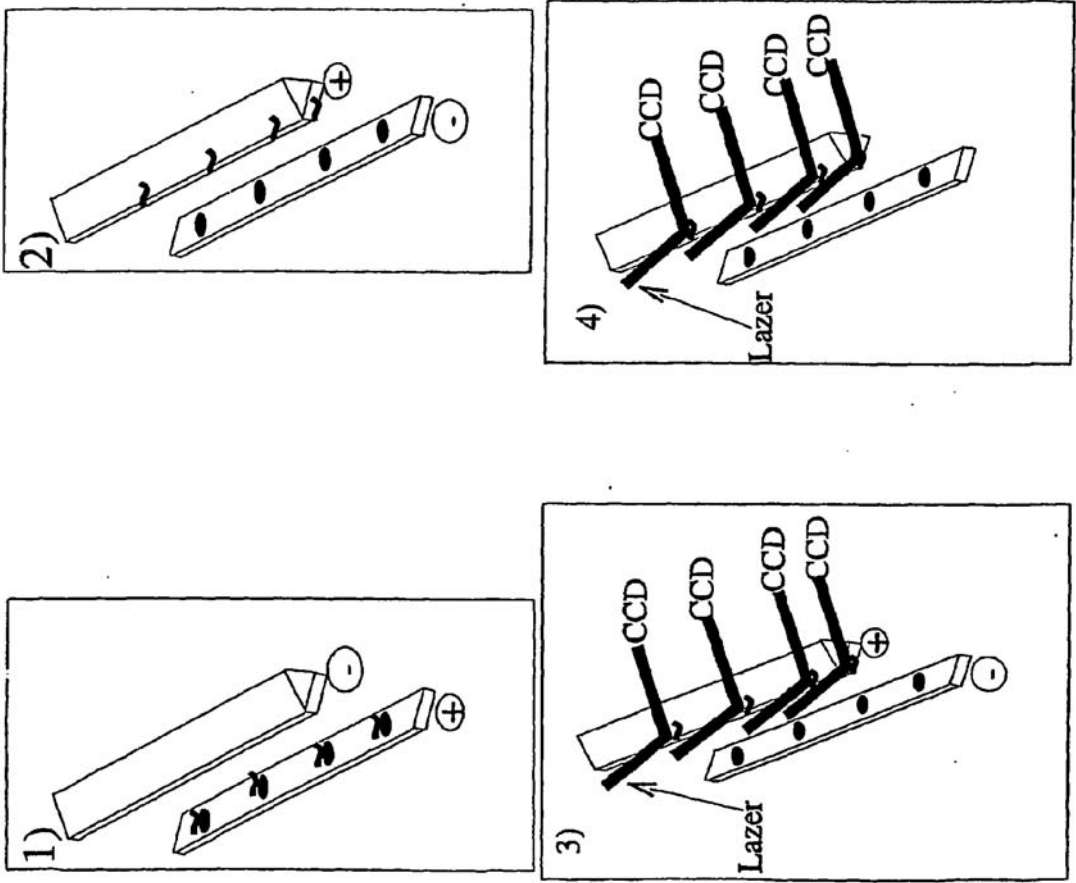


fig. 17

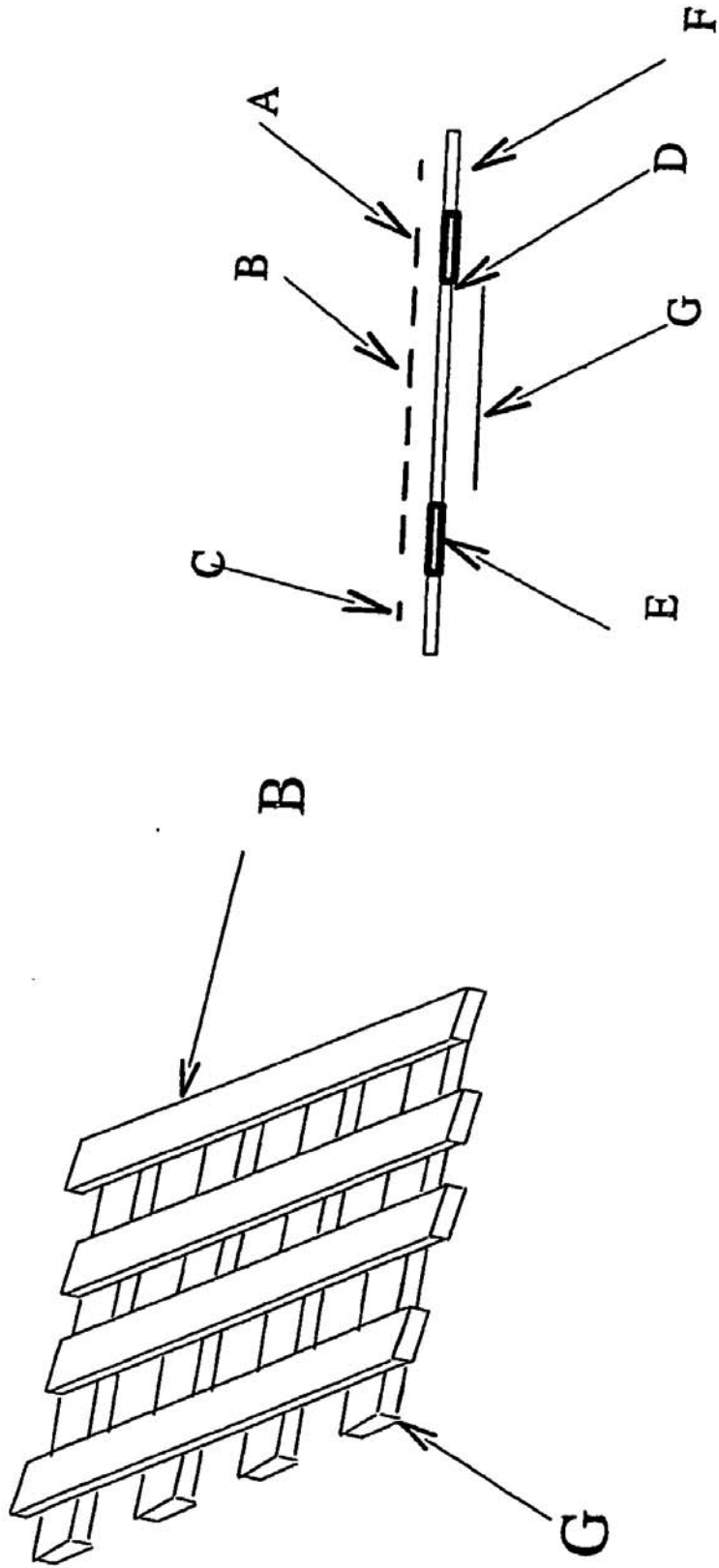


Fig. 18

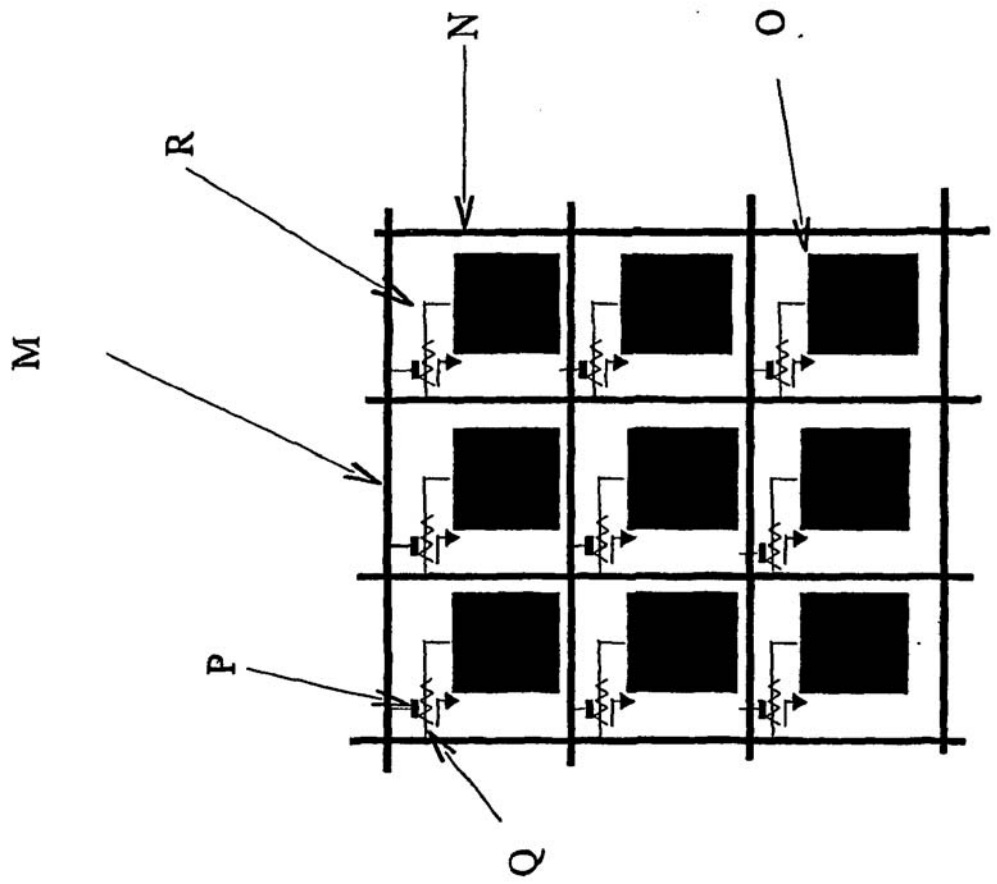


Fig. 19

