

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 962**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/543** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**B23B 9/04** (2006.01)  
**B05D 3/00** (2006.01)  
**C07H 21/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04784773 .6**  
96 Fecha de presentación: **22.09.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1664722**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2006**

54 Título: **POLIELECTROLITO INMOVILIZADO EN SUPERFICIE CON MÚLTIPLES GRUPOS FUNCIONALES CAPACES DE UNIRSE COVALENTEMENTE A BIOMOLÉCULAS.**

30 Prioridad:  
**22.09.2003 US 504716 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**07.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**07.03.2012**

73 Titular/es:  
**BIOARRAY SOLUTIONS LTD  
35 TECHNOLOGY DRIVE  
WARREN, NJ 07059, US**

72 Inventor/es:  
**WANG, Xinwen y  
BANERJEE, Sukanta**

74 Agente: **Fúster Olaguibel, Gustavo Nicolás**

ES 2 375 962 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

Polielectrolito inmovilizado en superficie con múltiples grupos funcionales capaces de unirse covalentemente a biomoléculas

## CAMPO DE LA INVENCION

5 Esta invención está en el campo de la química de polielectrolitos.

## ANTECEDENTES

10 Como alternativa para resolver muchos de los problemas asociados al uso diagnóstico de “matrices punteadas” de oligonucleótidos (los problemas se esbozan en “Multianalyte Molecular Analysis Using Application-Specific Random Particle Arrays”, solicitud de EE.UU. nº de serie 10/204.799, presentada el 23 de agosto de 2002; WO 01/98765), se forman matrices preferidas uniéndose sondas oligonucleotídicas a partículas de microperlas codificadas, incluyendo partículas codificadas hechas de resina polimérica. Véase la solicitud de patente de EE.UU. nº de serie 10/271.602 “Multiplexed Analysis of Polymorphic Loci by Concurrent Interrogation and Enzyme-Mediated Detection”, presentada el 15 de octubre de 2002, y la nº de serie 10/204.799 anterior. Se ensamblan entonces los conjugados de partícula codificada-sonda en un formato de matriz bidimensional y se ponen en contacto con muestras que se prevé que contienen polinucleótidos diana con subsecuencias complementarias de las sondas, en que los polinucleótidos diana en las muestras se marcaron fluorescentemente antes. Se determina la unión entre las sondas y las dianas mediante la presencia de una señal de ensayo fluorescente. Las sondas particulares que generan una señal de ensayo positiva pueden determinarse decodificando la matriz.

20 En Hirota y col. (documento US2002/0155481), se producen biochips planos en los que se inmovilizan sondas de ácido nucleico sobre una superficie funcionalizada. Puede añadirse seroalbúmina bovina como disolución reforzante para guiar a las sondas a los puntos de unión del chip antes del acoplamiento covalente de la sonda mediante técnicas estándares usando ácidos nucleicos modificados y superficies funcionalizadas.

En Trau y col. (documento WO02/12888), se describen micropartículas que tienen ligado covalentemente un polielectrolito sobre una superficie funcionalizada y unida a la misma un ácido nucleico.

25 Hay varios procedimientos conocidos y comercialmente disponibles para el ligamiento de sondas oligonucleotídicas con microperlas. Se ha desarrollado un gran número de esquemas de inmovilización covalente de sondas oligonucleotídicas en micropartículas y están disponibles en la bibliografía pública o comercialmente. Las técnicas de inmovilización covalente tradicionales usan perlas funcionalizadas (concretamente, perlas funcionalizadas con grupos reactivos como amino, carboxilo, tosilo, aldehído, epóxido, hidrazida y otros) para ligar con grupos funcionales complementarios en el extremo de sondas oligonucleotídicas (Maire K. Walsh, Xinwen Wang y Bart C. Weimer, “Optimizing the immobilization of single-stranded DNA onto glass beads”, *J. Biochem. Biophys. Methods* 2001; 47: 221-231). Muchas veces, dichos protocolos de unión conducen a una orientación inapropiada y a problemas de impedimento estérico. El rendimiento de hibridación de dichas sondas inmovilizadas covalentemente puede mejorarse mediante la introducción de moléculas espaciadoras (Edwin Southern, Kalim Mir y Mikhail Shchepinov; “Molecular Interactions on Microarrays”. *Nature Genetics Supplement*, 21, 1999, pág. 5-9), sin embargo, la ejecución es a menudo difícil e impracticable.

40 Por lo tanto, una química de unión de sonda práctica y robusta es importante para el rendimiento óptimo de un ensayo basado en matriz de microperlas. La química debe permitir a las sondas unirse a las partículas con alta eficacia para mantener una concentración consistente de sondas sobre la superficie de la perla y la reacción no debe alterar tampoco la eficacia de la unión sonda-diana. Además, la reacción debe tener una variabilidad mínima de lote a lote. En un procedimiento usado habitualmente, se recubren las micropartículas funcionalizadas con neutravidina (Pierce, Rockford, Ill.), estreptavidina o avidina, que son proteínas de unión a biotina, para mediar la inmovilización de sondas biotiniladas. La interacción de avidina-biotina es altamente específica y una de las más fuertes conocidas (con una constante de asociación ( $K_A$ ) del orden de  $10^{15} \text{ M}^{-1}$  en disoluciones acuosas) y proporciona un ligamiento casi irreversible entre la proteína inmovilizada en la superficie de la perla y la molécula de sonda biotinilada. Véase la solicitud de patente de EE.UU. nº de serie 10/271.602 anterior. El procedimiento descrito a continuación para unir sondas con polielectrolitos se prefiere a estos procedimientos conocidos porque se ha demostrado que es capaz de inducir el ligamiento de mayores números de oligonucleótidos a las perlas.

## SUMARIO

50 La invención proporciona un procedimiento de ligamiento de moléculas de ácido nucleico con una micropartícula que comprende: ligar covalentemente, a una temperatura de 65°C, seroalbúmina bovina con la superficie funcionalizada de una micropartícula hecha de polímero, resina polimérica, vidrio o látex y ligar covalentemente las moléculas de ácido nucleico que tienen extremos 3' o 5' funcionalizados con la seroalbúmina bovina en los extremos 3' o 5' funcionalizados de las moléculas de ácido nucleico.

55 Se inmoviliza un polielectrolito que tiene múltiples grupos funcionales expuestos, siendo cada grupo capaz de unirse covalentemente a una biomolécula, sobre una superficie con el fin de unirse a una biomolécula. La biomolécula es un ácido nucleico, por ejemplo, un oligonucleótido funcionalizado con amina. La BSA (seroalbúmina bovina) está unida a una superficie funcionalizada usando una estrategia de inmovilización covalente, por ejemplo, la reacción con la superficie de una micropartícula activada con tosilo. Después de dicha reacción, pueden utilizarse adicionalmente grupos funcionales reactivos expuestos en la proteína, tales como grupos amina, carboxilo, tiol o hidroxilo, para acoplar covalentemente el oligonucleótido de interés usando una química adecuada.

60 En una realización, los oligonucleótidos modificados en posición terminal (la posición 3' o 5' terminal) con aminas (por ejemplo, oligonucleótidos modificados con amino) se unen covalentemente a BSA usando una reacción con

EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) (véase, por ejemplo, D. Seligal y col., *Analytical Biochemistry* 218: 87091 (1994)). La reacción covalente da como resultado la formación de un enlace amida entre el grupo amina en el extremo del oligonucleótido y grupos carboxilo en la BSA. La reacción se ilustra en la FIG. 1.

5 La superficie funcionalizada es la superficie de una perla o micropartícula, que puede estar compuesta por una serie de materiales, incluyendo polímeros, resinas poliméricas, vidrio, látex u otros que pueden funcionalizarse para la inmovilización de un polielectrolito. Se efectuaron experimentos que comparaban perlas recubiertas con BSA con seroalbúmina humana ("HSA"), otro polielectrolito ejemplar, y también con neutravidina. Los resultados de los experimentos de hibridación indicaron que las perlas recubiertas con BSA eran capaces de ligar mayores concentraciones de oligonucleótidos con las perlas.

## 10 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 ilustra la unión de BSA a perlas funcionalizadas y la unión de una sonda oligonucleotídica a BSA usando una reacción con EDAC.

15 La Fig. 2 muestra las señales de hibridación de perlas oligofuncionalizadas acopladas con BSA en función de la cantidad de sonda aminada añadida para acoplamiento. Se ligó una sonda perfectamente coincidente a dos conjuntos de perlas acopladas con BSA. La BSA se acopló con el primer conjunto de perlas a 65°C y con el segundo a 37°C. Se observó una eficacia de hibridación mucho mayor (mayor señal) en el primer conjunto de perlas con las que se acopló la BSA a 65°C. Un tercer conjunto de perlas acopladas con BSA a 65°C y funcionalizadas con una sonda de control negativa no coincidente muestra una hibridación despreciable, indicando por tanto que la señal potenciada no es el resultado de una unión no específica aumentada.

20 La Fig. 3 muestra los resultados de valoración de perlas acopladas con BSA. Como en la Fig. 2, la eficacia de la hibridación es mayor para las perlas acopladas con BSA a mayor temperatura que a menor temperatura, como se demuestra por la diferencia en la señal de hibridación de una diana puesta en contacto con una sonda oligonucleotídica unida a perlas acopladas con BSA en que la BSA se acopló con un conjunto de perlas a 37°C y en que la BSA se acopló con otro conjunto de perlas a 65°C (véase el ejemplo 4).

25 La Fig. 4 indica una diferencia en la eficacia de acoplamiento de BSA con perlas funcionalizadas con tosilo a diferentes temperaturas, como se determina usando un ensayo de hibridación, en que las sondas oligonucleotídicas se unen a BSA inmovilizada en las perlas y se hacen reaccionar entonces con una diana marcada fluorescentemente complementaria (véase el ejemplo 6).

30 La Fig. 5 indica que para la incubación a 65°C durante aproximadamente 1 hora, en la reacción de acoplamiento de BSA con perlas activadas con tosilo, la eficacia de unión de BSA con la superficie de las perlas no está afectada, como se demuestra por la diferencia en la señal de hibridación de una diana puesta en contacto con una sonda oligonucleotídica unida a perlas acopladas con BSA (véase el ejemplo 7).

35 La Fig. 6A muestra que las perlas funcionalizadas con tosilo recubiertas con BSA dan una señal de hibridación más uniforme y fuerte, después de la unión de sondas y la hibridación con una diana, que una perla de tosilo recubierta con neutravidina (véase el ejemplo 8).

La Fig. 6B muestra el coeficiente de variación de las señales en la Fig. 6A.

40 La Fig. 7 muestra una diferencia significativa en la hibridación cuando la HSA, en lugar de la BSA, es el polielectrolito recubierto sobre perlas funcionalizadas con tosilo, en que las sondas oligonucleotídicas se unen, respectivamente, a BSA o HSA inmovilizada sobre perlas, y se hacen reaccionar entonces con una diana marcada fluorescentemente complementaria.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

### Ejemplo 1. Preparación de perlas funcionalizadas con tosilo recubiertas con BSA

45 Se prepara una disolución de BSA a una concentración de 5 mg/ml disolviendo 50 mg de BSA en 10 ml de PBS. Se añaden 2,0 ml de PBS-T a un tubo de centrifuga de 15 ml. Se transfiere 1 ml de perlas coloreadas por fluorescencia a una concentración de un 1% en sólidos (10 mg) al tubo de centrifuga y se mezcla bien con vórtice. Se sedimentan las perlas por centrifugación a 3.500 rpm durante  $4 \pm 0,5$  minutos y se decanta el sobrenadante. Se resuspenden las perlas añadiendo 3,0 ml de PBST al tubo y se mezclan bien con vórtice. Se sedimentan de nuevo las perlas por centrifugación a 3.500 rpm durante  $4 \pm 0,5$  minutos y se desecha el sobrenadante. Se añaden 3,0 ml de disolución de BSA (5 mg/ml) a las perlas y se mezclan bien con vórtice. Se disponen los tubos en un agitador en una incubadora a 37°C y se dejan reaccionar las perlas durante una noche con mezclado a 250 rpm.

50 Después de ello, se sedimentan las perlas por centrifugación a 3.500 rpm durante 4 minutos, y se desecha el sobrenadante. Se lavan entonces las perlas añadiendo 3,0 ml de PBS-T al tubo y se mezclan en un mezclador de vórtice. Se centrifugan de nuevo las perlas a 3.500 rpm durante  $4 \pm 0,5$  minutos y se elimina por vertido el sobrenadante. Se repiten entonces las etapas de lavado y centrifugación.

55 Se añaden 3,0 ml de tampón de almacenamiento (PBS 0,1 M que contiene un 0,1% de  $\text{NaN}_3$ ) y se mezclan en un mezclador de vórtice. Se centrifugan de nuevo las perlas a 3.500 rpm durante  $4 \pm 0,5$  minutos y se elimina por vertido el sobrenadante. Se resuspenden entonces las perlas en 1 ml de tampón de almacenamiento con vórtice. Las perlas están a una concentración de un 1% en sólidos (10 mg/ml) y se almacenan a 4-6°C. Están listas para el ligamiento con biomateriales que contienen amina (por ejemplo BSA) mediante la reacción con EDAC, como se describe a continuación en el ejemplo 3.

60

**Ejemplo 2. Preparación de perlas funcionalizadas con carboxilo recubiertas con BSA**

5 Se lleva a cabo el acoplamiento de BSA con partículas carboxiladas como sigue. Se transfieren 100  $\mu$ l de partículas carboxiladas a una concentración de un 1% en sólidos a un tubo Eppendorf de 2 ml. Se precipitan entonces las perlas por centrifugación y se retira el sobrenadante. Después de esto, se lavan las perlas 1 vez con 1 ml de tampón MES (0,05 M) (pH 4,5). Separadamente, se preparan una disolución madre de BSA (5 mg de BSA/ml) en tampón MES y EDC (20 mg/ml) en tampón MES. Se añaden 100  $\mu$ l de la disolución madre de BSA al sedimento de perlas y se mezcla bien la suspensión con vórtice. Después de esto, se añaden 400  $\mu$ l de la disolución madre de EDC a la suspensión de perlas, se mezcla bien con vórtice y se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 1 h con mezclado rotativo. Después de 1 h de incubación, se añaden 100  $\mu$ l de PBS-T a la suspensión y se centrifugan las perlas. Se lava el sedimento dos veces con 1 ml de PBS-T mediante un ciclo de centrifugación-redispersión y finalmente se suspenden las perlas en 100  $\mu$ l de tampón de almacenamiento (PBS 0,1 M que contiene 0,1% de azida de sodio,  $\text{NaN}_3$ ) y se almacena a 4-6°C.

**Ejemplo 3. Reacción con EDAC para el acoplamiento de sondas oligonucleotídicas aminadas con perlas de BSA**

15 Se llevó a cabo como sigue el acoplamiento de sondas oligonucleotídicas aminadas con las perlas, preparadas como en el ejemplo 1 y 2. Se tomaron una serie de tubos Eppendorf de 1,5 ml y se marcaron para identificar el tipo de micropartícula y la sonda oligonucleotídica para acoplar. Después de esto, se dispensaron 500  $\mu$ l de PBST a cada tubo, seguido de 100  $\mu$ l de perlas acopladas con BSA a una concentración de un 1% en sólidos. Se mezclaron bien los tubos con un mezclador de vórtice durante 10 segundos. Se sedimentaron entonces las perlas a 9500 rpm durante  $2 \pm 0,5$  min y se desechó el sobrenadante. Se añadió una alícuota de 500  $\mu$ l de tampón MES 0,05 M (pH 4,5) al sedimento y se mezcló bien con vórtice. Se centrifugaron entonces las perlas a 9500 rpm durante  $2 \pm 0,5$  minutos y se desechó el sobrenadante. Se añadió una alícuota de 500  $\mu$ l de EDAC 0,05 M en tampón MES (preparado justo antes del uso) a las perlas y se mezcló bien con vórtice. Después, se añadieron 10  $\mu$ l de cada sonda de ADN modificada con amino (por ejemplo, la sonda MS-508 N25, adquirida en Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville IA) a una concentración 100  $\mu$ M a cada uno de los tubos que contenían las suspensiones de perla, y se mezcló bien. Se deja proceder la reacción durante 1 h a temperatura ambiente (20-25°C) con mezclado rotativo.

20 Después de la incubación, se añaden 100  $\mu$ l de PBS-T a cada tubo y se mezcla con vórtice. Se sedimentan entonces las perlas en una centrífuga a 9500 rpm durante  $2 \pm 0,5$  min y se desecha el sobrenadante. Se lavan entonces las perlas dos veces con 500  $\mu$ l de PBS-T usando el ciclo de centrifugación-redispersión.

30 Se resuspenden las perlas en 100  $\mu$ l de PBST-T para llevar la concentración final a un 1% en sólidos, y se almacenan a 4-6°C para uso adicional.

Se muestra en la Fig. 2 el rendimiento de hibridación (véase el ejemplo 4 para el protocolo) de partículas funcionalizadas con oligonucleótido en función de la cantidad añadida de oligo (0,25, 0,4, 1, 2, 4, 8  $\mu$ l de partículas o 100  $\mu$ M/200  $\mu$ g de partículas). La cantidad descrita anteriormente de 10  $\mu$ l o 100  $\mu$ M/1 mg representa por tanto una concentración de saturación.

35 También las perlas con BSA acoplada a mayor temperatura muestran un rendimiento de hibridación mejorado como se describe con más detalle a continuación.

**Ejemplo 4. Ensayo de hibridación que usa perlas funcionalizadas con oligonucleótido**

1. Se ensamblan las mezclas de perlas en 8 chips diferentes. Se prepara una disolución diana madre de ADN marcada fluorescentemente (MS508-CY5 de 90 unidades) en tampón de hibridación (1xTMAC). Se preparan 8 diluciones en serie diferentes a partir de la solución diana madre. Se añaden entonces 20  $\mu$ l de cada una de las disoluciones diana diluidas en serie a los 8 chips separados.

2. Se dispone un portaobjetos, que contiene los chips, en un calentador/agitador de hibridación, y se incuba a 55°C durante 20 minutos a 100 rpm.

45 3. Se retira el portaobjetos, se enfría a temperatura ambiente y se retira la disolución de hibridación con la pipeta de transferencia.

4. Se añaden 20  $\mu$ l de 1xTMAC a cada chip, y se lava el chip por pipeteado de la disolución de 8 a 10 veces.

5. Se retira la disolución de lavado, se añaden 5 ml de disolución de montaje (1xTMAC) a cada chip y se lee la señal de ensayo (CY5) con un microscopio fluorescente usando un cubreobjetos.

50 6. Se representa una curva de valoración de la señal de hibridación (CY5) frente a la concentración de sonda de ADN.

Se muestra en la Fig. 3 un ejemplo de curvas de valoración.

**Ejemplo 5**

55 Se realizaron experimentos para comparar el efecto de añadir EDAC a la suspensión de perla-sonda dos veces (EDAC es conocido por hidrolizar muy rápidamente a pH ácido) para valorar si esto conduce a una unión potenciada de las sondas a la capa de BSA. En primer lugar, se acopló la sonda MS-508-N25 con perlas recubiertas con BSA en cada una de las siguientes condiciones: (10  $\mu$ l de sonda 100  $\mu$ M/100  $\mu$ l de 1% de perlas). Se retiró la mitad de las perlas del primer tubo después de 1 hora de tiempo de reacción, se añadió EDAC reciente y la reacción procedió entonces en este tubo durante 1 hora adicional. Se repitió todo el proceso para la sonda no coincidente SSP 36. Se combinaron cada conjunto de perlas con las perlas no específicas, se ensamblaron en un chip y se pusieron en contacto entonces todos los conjuntos con la diana MS 508-Cy5 de 40 unidades en condiciones de hibridación. Se registraron entonces los

resultados y se resumen a continuación en la Tabla II. La adición de EDAC dos veces proporcionó señales de hibridación mayores.

Tabla II

Concentración de sonda	Señal Cy5 del ensayo modelo	CV	Señal Cy5 no específica	CV
EDAC 1 vez	536,1	0,17	79,9	0,26
EDAC extra 2 veces	732,9	0,17	53,3	0,19

### 5 Ejemplo 6. Acoplamiento de BSA con perlas activadas con tosilo a diferentes temperaturas y sus características de hibridación

10 Se añadieron a cada uno de los 5 tubos de centrifuga de 15 ml 2,0 ml de PBS-T y 1 ml de perlas coloreadas por fluorescencia a una concentración de un 1% en sólidos (10 mg) y se mezclaron entonces las perlas con vórtice. Se sedimentaron las perlas por centrifugación a 3500 rpm durante  $4 \pm 0,5$  minutos y se decantó el sobrenadante. Se resuspendieron entonces las perlas en 3,0 ml de PBST, se mezclaron bien con vórtice y se sedimentaron de nuevo por centrifugación a 3500 rpm durante  $4 \pm 0,5$  minutos. Se eliminó entonces el sobrenadante por vertido.

15 Se añadieron 2 ml de PBS (pH 7,2) y 1 ml de disolución de BSA (50 mg/ml en PBS) a cada tubo y se mezclaron bien con vórtice. Se fijó la temperatura ambiente en una incubadora para cada uno de los tubos como sigue: tubo A- 22°C, tubo B- 37°C, tubo C- 50°C, tubo D- 65°C y tubo E- 75°C, y se dejaron reaccionar las perlas con BSA durante 14 horas a la temperatura designada, con mezclador rotatorio. Se enfriaron entonces los tubos a temperatura ambiente, se sedimentaron las perlas por centrifugación a 3500 rpm durante 4 minutos y se eliminó el sobrenadante por vertido. Se lavaron entonces las perlas añadiendo 3,0 ml de PBST al tubo, se mezclaron en un mezclador de vórtice y se sedimentaron a 3500 rpm durante  $4 \pm 0,5$  minutos. Se eliminó el sobrenadante por vertido.

20 Se añadió 1 ml de tampón de almacenamiento (PBS que contiene 0,1% de  $\text{NaN}_3$ ) y se mezclaron los tubos en un mezclador de vórtice. La concentración de perlas era de un 1% en sólidos (10 mg/ml). Se almacenaron las perlas acopladas con BSA a 4-6°C.

25 Se conjugó la sonda oligonucleotídica biotinilada MS-508 N25 de 25 unidades con cada conjunto de perlas mediante el procedimiento de acoplamiento con EDAC descrito anteriormente. Se puso en contacto entonces cada conjunto de perlas con una concentración fija de diana marcada (un oligonucleótido de 90 unidades marcado con Cy-5) para la sonda en condiciones de hibridación. La cantidad de marcaje en las perlas se correlaciona con la concentración de sonda en las perlas.

30 Como se muestra en la Fig. 4, las perlas que se acoplaron con BSA a mayores temperaturas exhibieron más unión orientada a las sondas oligonucleotídicas exhibidas en la superficie de la perla. Esto indica que hay una mayor concentración de sondas en la superficie de dichas perlas, lo que puede ser debido a que a 65°C la BSA se desnaturaliza y se abre, presentando más sitios de unión disponibles a las sondas.

### Ejemplo 7. Comparación de un tiempo de incubación variable para el acoplamiento de BSA con partículas funcionalizadas con tosilo

35 Se realizó un experimento para estudiar el curso temporal de la reacción de acoplamiento de BSA en partículas tosiladas. Siguiendo el mismo protocolo que en los ejemplos 1 y 5, se incubaron 12 tubos separados, que contenían cada uno una mezcla de reacción de BSA-partículas de tosilo, a 65°C en una estufa, y se incubó un tubo de control a 37°C. Se sacó cada tubo después de un periodo de incubación predeterminado, se lavó y se acopló entonces con una sonda oligonucleotídica (incluyendo la sonda de control) siguiendo el procedimiento esbozado en el ejemplo 3. Después de esto, se efectuó una reacción de hibridación y se registró la intensidad del ensayo (véase el ejemplo 4). Se muestran los resultados en la Fig. 5, que ilustra que la reacción de acoplamiento de BSA se completa esencialmente en menos de una hora.

### Ejemplo 8. Comparación con la química de acoplamiento biotina-avidina y recubrimiento con neutravidina convencional

45 Se llevó a cabo un experimento para comparar la eficacia de captura e hibridación de perlas oligoconjugadas funcionalizadas con BSA con una perla biotinilada oligoconjugada con neutravidina. Se acoplaron las proteínas con la superficie de la perla a 37°C usando un protocolo como se expone en el ejemplo 1. Después de esto, se conjugaron los oligos biotinilados (y también aminados) con partículas (como en el ejemplo 3) y se llevó a cabo un ensayo de hibridación con una diana asociada.

50 Se tomaron dos partículas recubiertas con BSA codificadas diferentemente pero por lo demás idénticas y se unió una sonda coincidente con un grupo y se unió una sonda no coincidente con el otro grupo. De forma similar, se tomaron otras dos perlas funcionalizadas con neutravidina y se unieron a sondas biotiniladas coincidentes y no coincidentes.

Se muestran los resultados del ensayo en las Fig. 6A y 6B. Es evidente que el recubrimiento con BSA proporciona una señal más uniforme (menor CV) y mayor relación de señal a ruido (la intensidad de hibridación en la sonda no coincidente se consideró como ruido) que la conseguida cuando se usa la química de captura de neutravidina.

**Ejemplo 9. Comparación con recubrimiento con HSA**

5 Se acopló HSA (seroalbúmina humana) en condiciones idénticas a las usadas para el acoplamiento de BSA con partículas funcionalizadas con tosilo. Se acoplaron entonces las partículas funcionalizadas con HSA con sondas oligonucleotídicas y se hibridaron (valoraron) con una diana de ADN modelo marcada fluorescentemente (como en el ejemplo 4). Se muestran los resultados en la Fig. 7. Se indica que el recubrimiento con HSA no es tan eficaz como el recubrimiento con BSA para la unión de las sondas oligonucleotídicas a pesar del hecho de que, como la BSA, la HSA tiene muchos grupos carboxilo funcionales disponibles para la unión a las sondas oligonucleotídicas.

**Ejemplo 10. Variación entre lotes del acoplamiento de BSA**

10 Se acoplaron separadamente tres lotes de 10 mg cada uno con BSA a 65°C durante 14 horas, siendo la relación de BSA-perla de 5 (p/p, mg/mg). El volumen de reacción para el acoplamiento era de 3 ml. Se acopló un lote de perlas con BSA a 37°C para uso como control. Se determinó la eficacia de acoplamiento basándose en la intensidad de señal para la hibridación de sondas de ADN acopladas con las perlas de dianas asociadas. Se realizó la hibridación a 55°C durante 20 minutos en 1XTMAC, y la diana era MS508-CY5 de 90 unidades a una concentración 400 nM. El tiempo de integración para la lectura del ensayo es de 200 ms. Se muestran los resultados en la Tabla I.

15

**Tabla I**

Lote	Intensidad de CY5 (100 ms)
1	6864
2	6515
3	6431
Control	3964

Los lotes a 65°C tenían una intensidad consistentemente mayor que el lote acoplado a 37°C y también la variabilidad entre lotes era pequeña.

20 Los términos, expresiones y ejemplos anteriormente en la presente memoria son solo ejemplares y no limitantes, y la invención se define solo en las reivindicaciones siguientes, e incluye todos los equivalentes de la materia en cuestión de las reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de ligamiento de moléculas de ácido nucleico con una micropartícula que comprende:  
ligar covalentemente, a una temperatura de 65°C, seroalbúmina bovina con la superficie funcionalizada de una micropartícula hecha de un polímero, resina polimérica, vidrio o látex, y ligar covalentemente moléculas de ácido nucleico que tienen extremos 3' o 5' funcionalizados con seroalbúmina bovina en los extremos 3' o 5' funcionalizados de las moléculas de ácido nucleico.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las moléculas de ácido nucleico se unen a la seroalbúmina bovina a través de un enlace amida, formado por una reacción con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la superficie de la micropartícula está funcionalizada con grupos funcionales tosilo.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las moléculas de ácido nucleico se ligan a la seroalbúmina bovina a través de los grupos carboxilo o amino de la seroalbúmina bovina.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la molécula de ácido nucleico es un oligonucleótido.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el oligonucleótido se funcionaliza en su extremo 3' o 5' con un grupo amino primario.

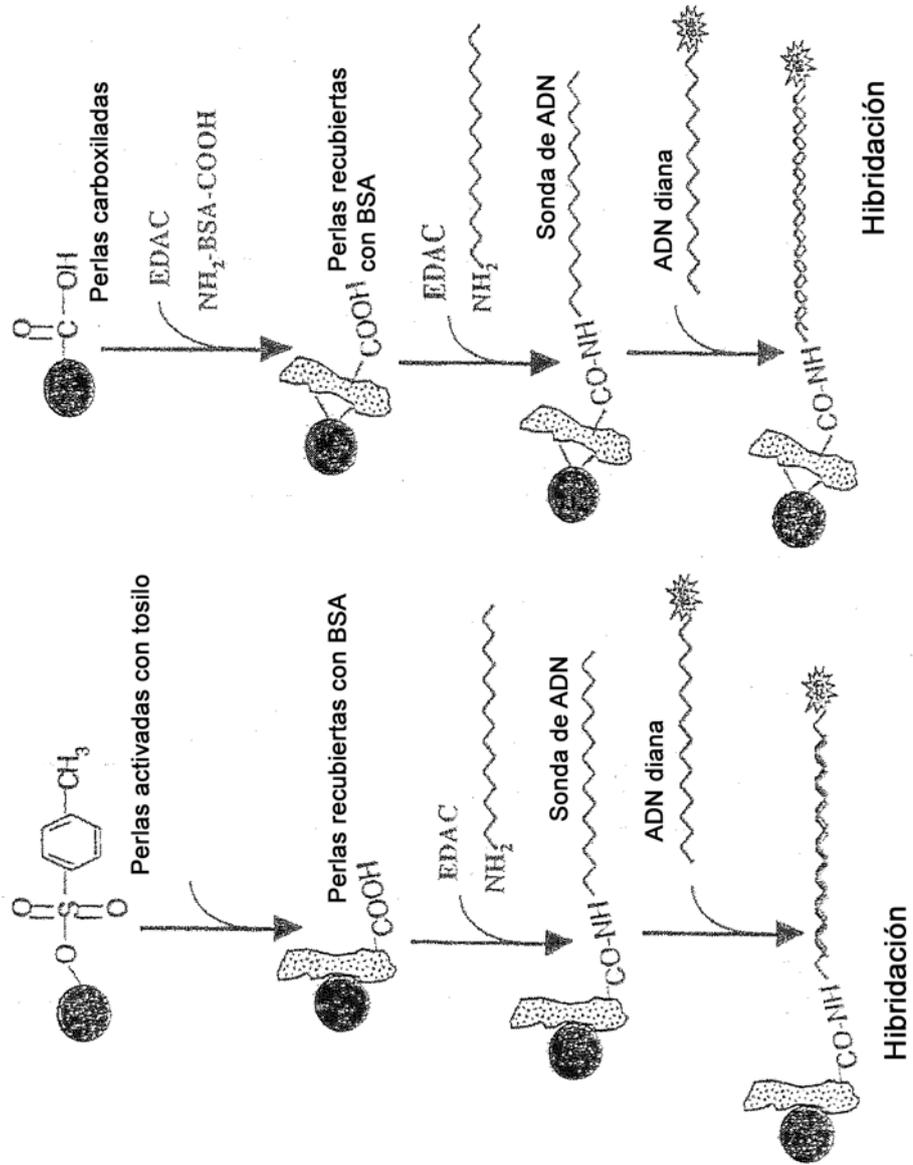


Fig. 1

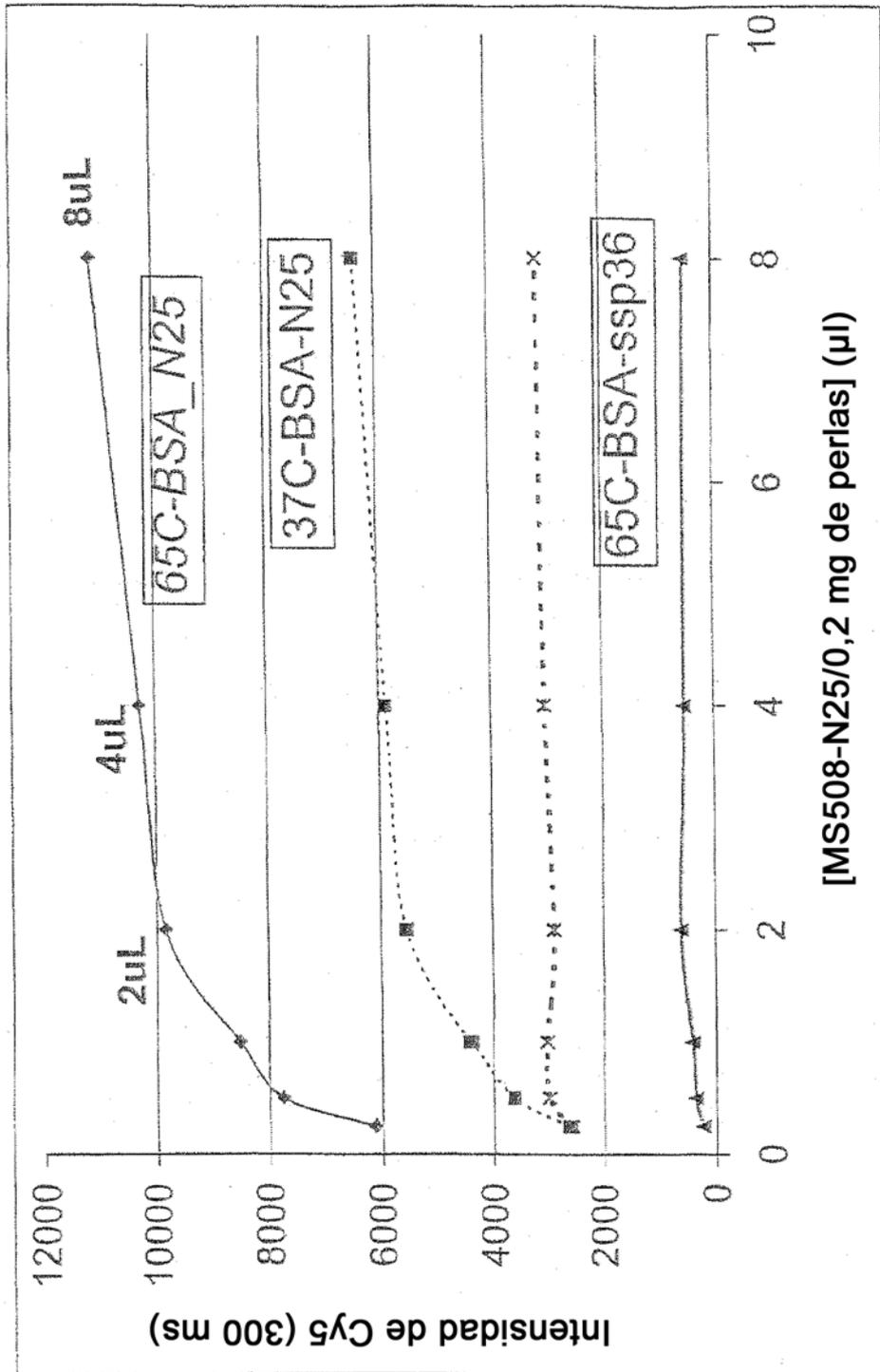


Fig. 2

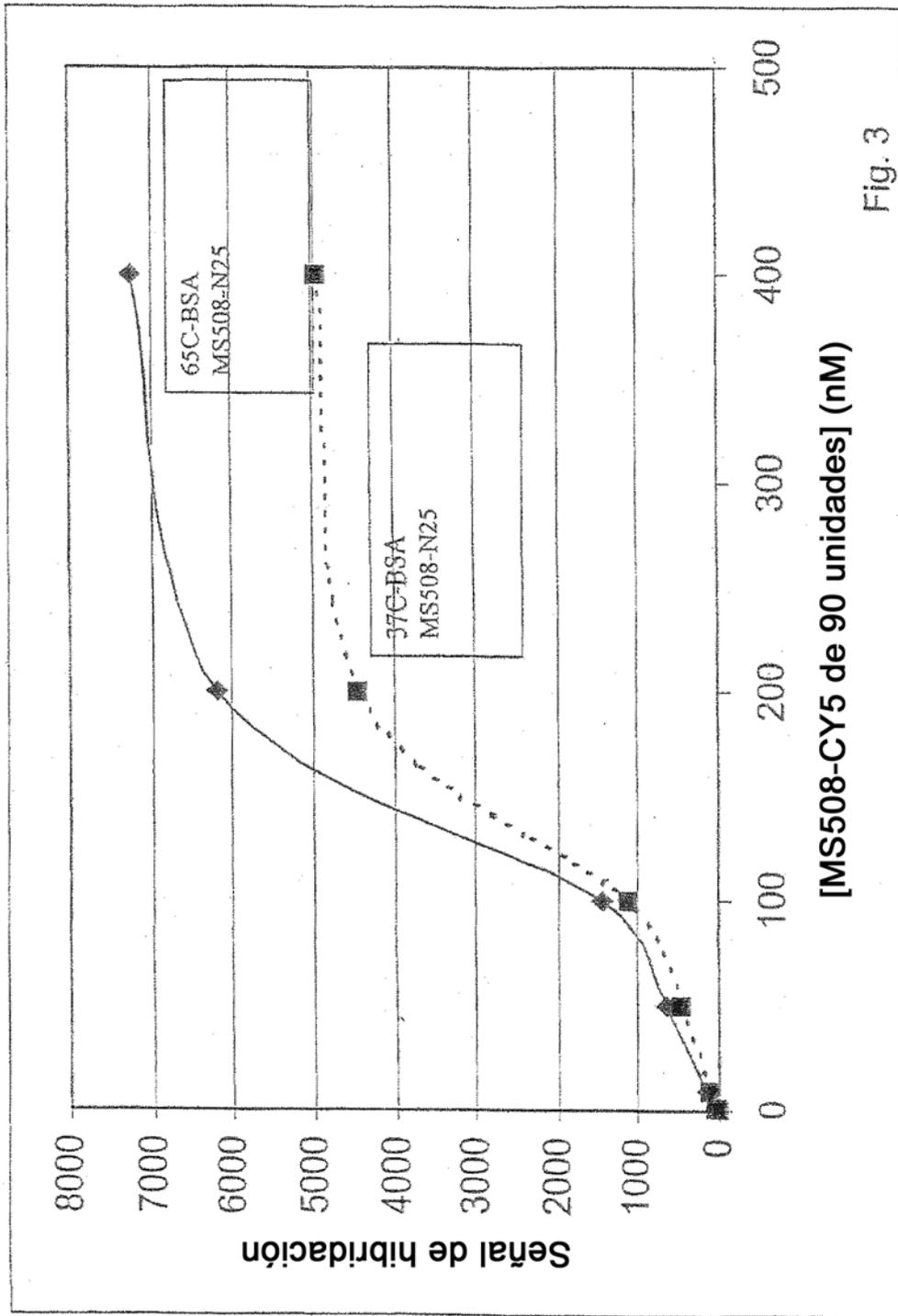
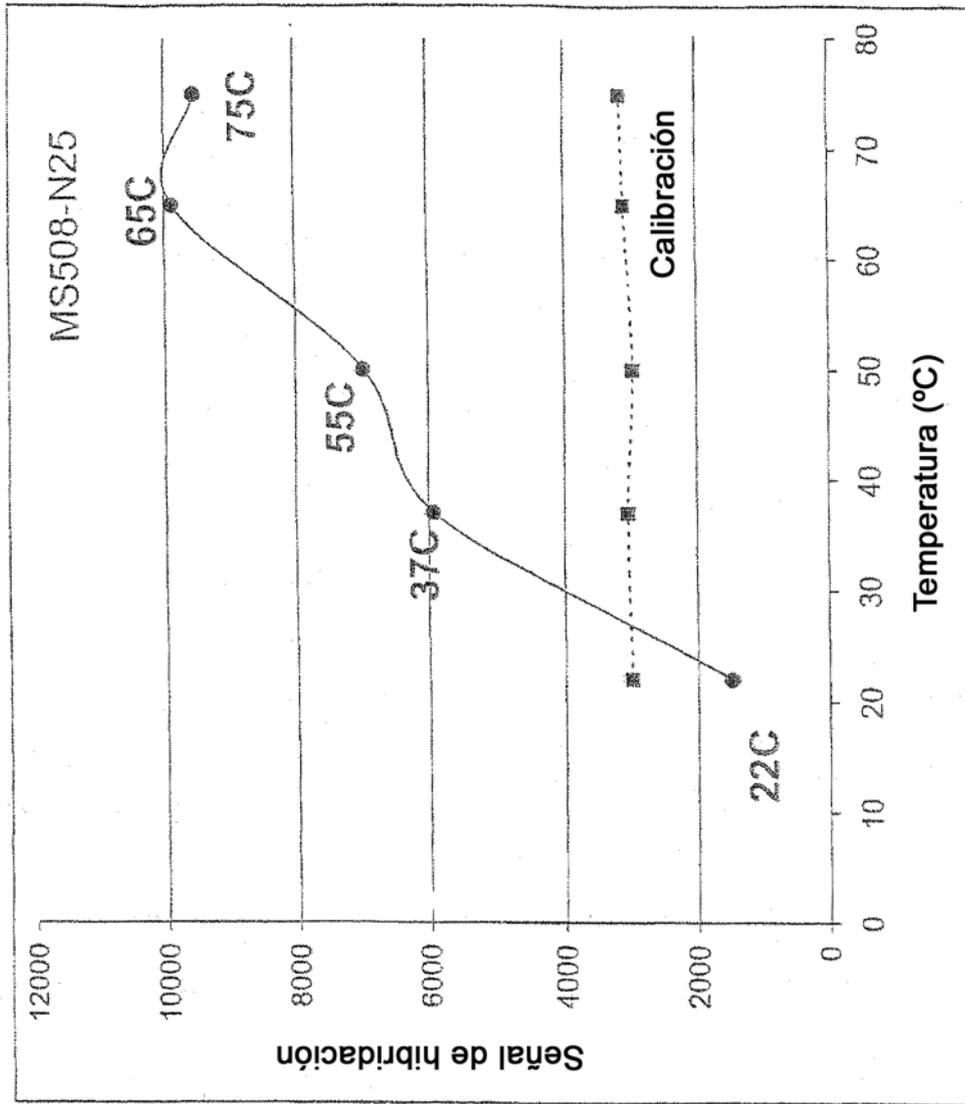


Fig. 3

Fig. 4



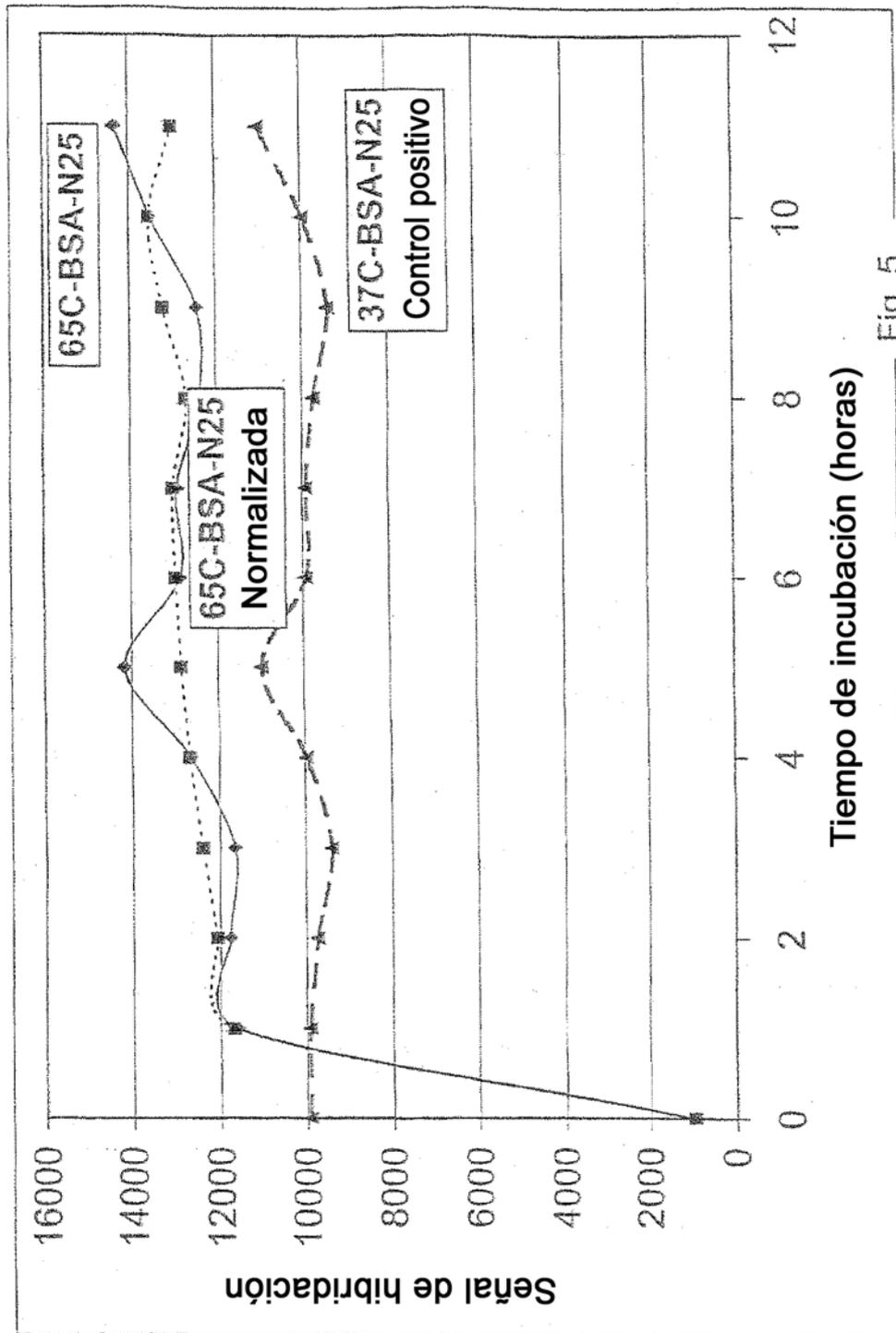


Fig. 5

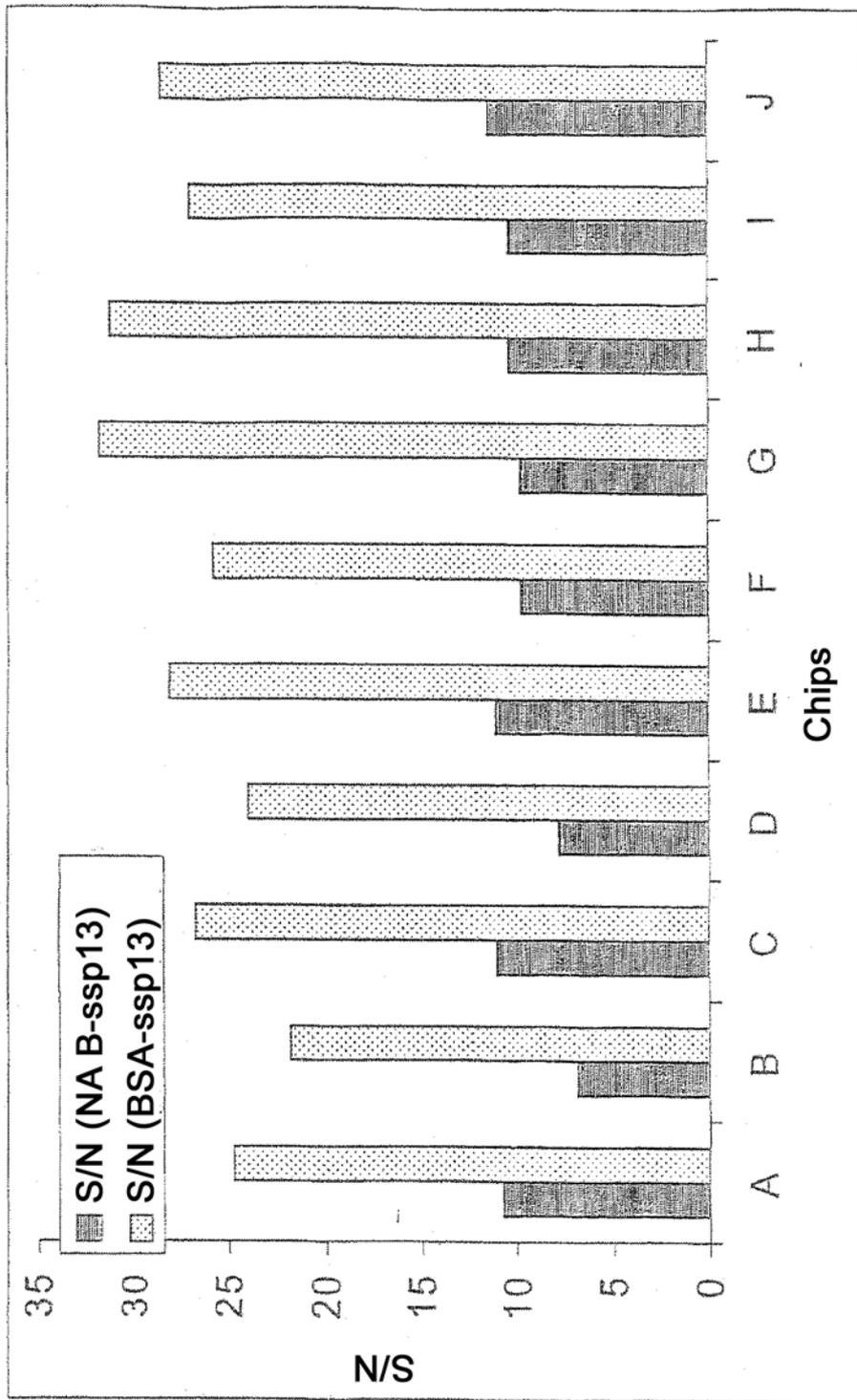


Fig. 6A

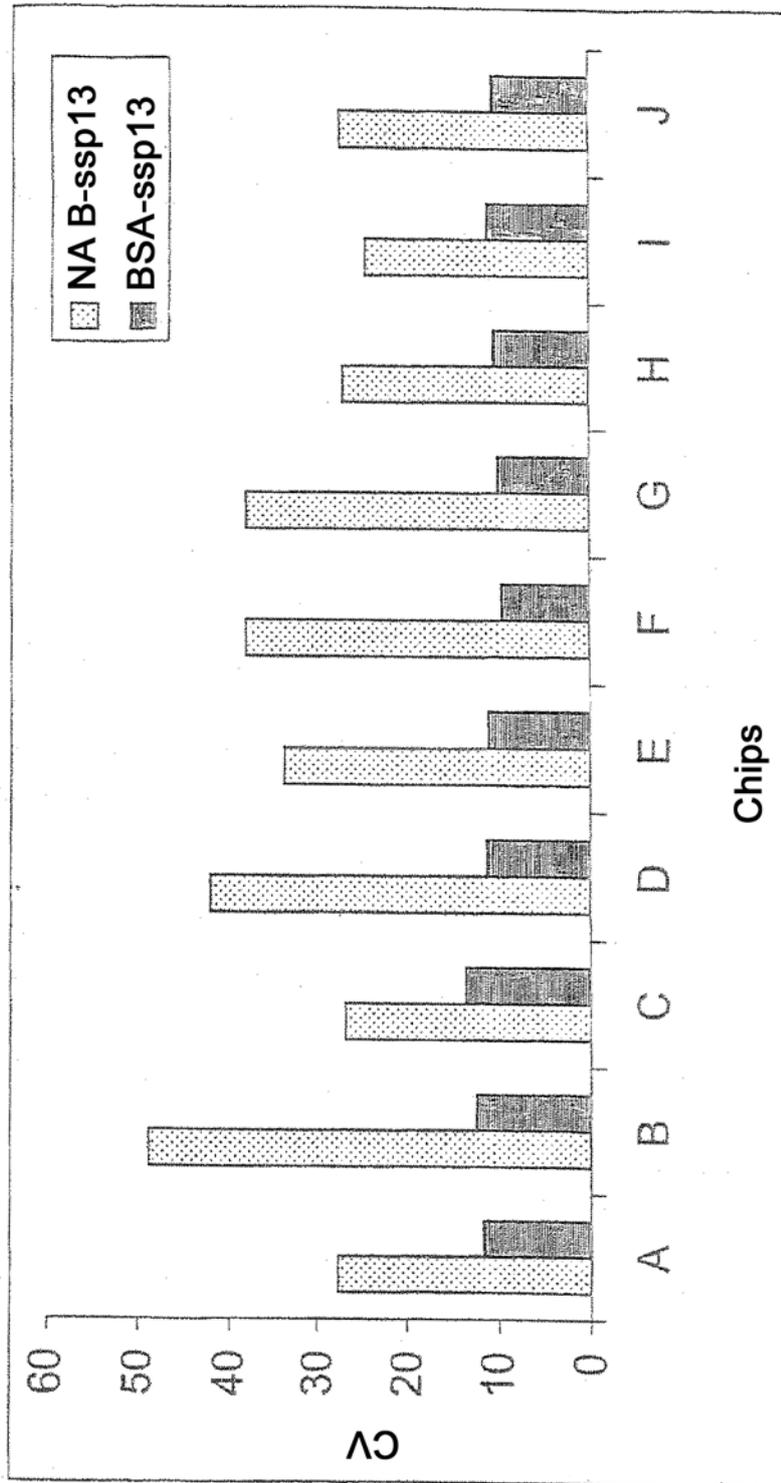


Fig. 6B

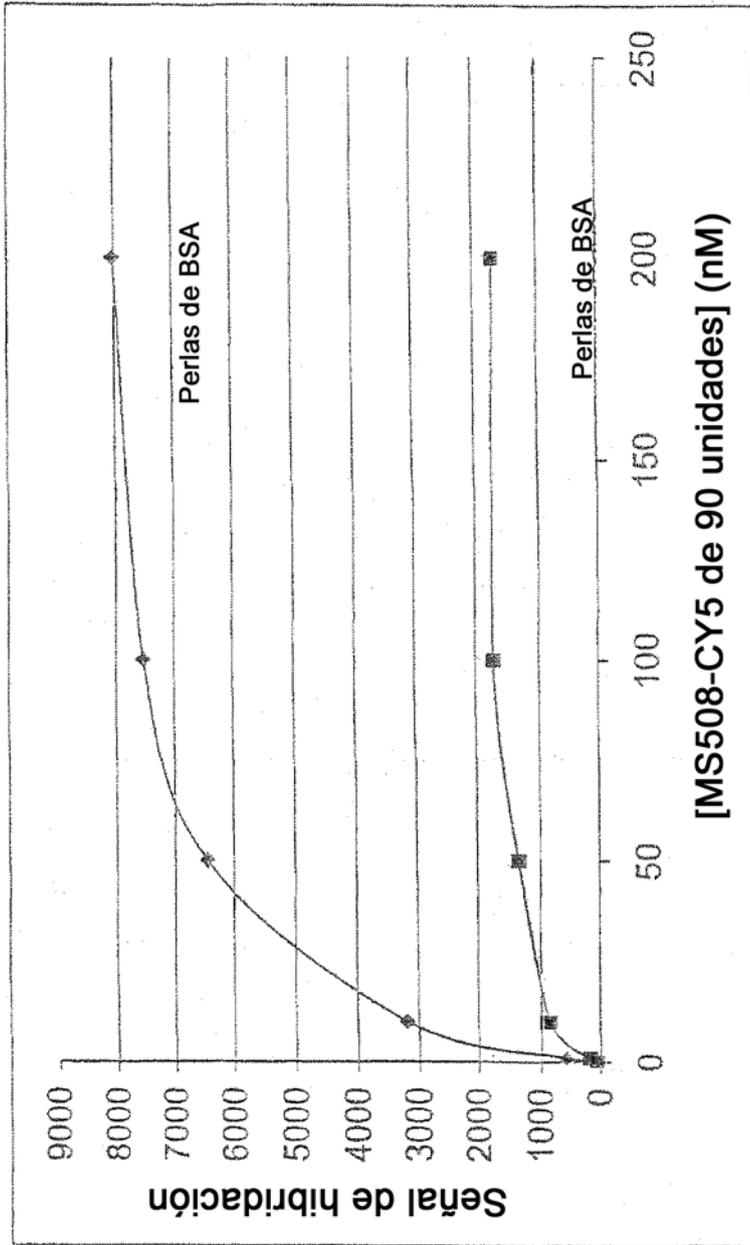


Fig. 7