

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 934**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2008 E 08852553 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2012 EP 2209918**

54 Título: **Procedimiento para la calibración de un elemento sensor**

30 Prioridad:

20.11.2007 DE 102007055386

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

01.03.2013

73 Titular/es:

**SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT (100.0%)
WITTELSBACHERPLATZ 2
80333 MÜNCHEN, DE**

72 Inventor/es:

**FRIEDRICH, KATJA;
GUMBRECHT, WALTER;
PAULICKA, PETER;
STANZEL, MANFRED y
WEBER, RENEE**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 396 934 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la calibración de un elemento sensor

La presente invención hace referencia a un procedimiento, así como a una configuración, para la calibración de elementos sensores, sobre todo para la calibración de elementos sensores en configuraciones de micromatrices.

5 En la analítica de ácidos nucleicos, el desarrollo de métodos basados en micromatrices ha alcanzado avances importantes en los últimos años. Una configuración de micromatrices es una configuración de una matriz de moléculas de sondeo, las cuales se colocan en un sensor, en posiciones individuales que se pueden direccionar, de manera que cada posición en la configuración de matrices forma un elemento sensor con el cual se puede detectar una molécula diana. En la analítica de ácidos nucleicos por lo general se utilizan oligonucleótidos de sondeo como
10 moléculas de sondeo, las cuales, por ejemplo en una configuración en forma de chip, son inmovilizadas ("sustraídas") en una matriz en forma de trama sobre un soporte. Mediante hibridación con un ácido nucleico diana complementario se produce el enlace con el oligonucleótido de sondeo. Este enlace se puede detectar luego mediante varios procedimientos alternativos, de forma que debido al suceso de enlace se puede captar la presencia del ácido nucleico diana (Z) y, dado el caso, también cuantificarla. Como métodos de prueba se utilizan
15 procedimientos ópticos, electroquímicos, magnéticos y otros que sean adecuados.

En el caso de los procedimientos ópticos, el ácido nucleico diana o el híbrido de ácido nucleico diana y oligonucleótido de sondeo se marcan por medio de un marcador lo que conlleva una señal detectable ópticamente. Esto puede ser un colorante, un fluoróforo, un cromóforo, un colorante intercalante, un colorante fluorescente o similar. Al generarse un suceso de enlace, en la posición direccionable del respectivo oligonucleótido de sondeo se
20 puede captar una señal que se puede detectar ópticamente, por ejemplo por una cámara CCD, que puede representar toda la matriz.

En el procedimiento de comprobación electroquímico, los oligonucleótidos de sondeo pueden ser inmovilizados sobre un sensor electroquímico. El ácido nucleico diana o el híbrido de oligonucleótido de sondeo y ácido nucleico diana se marcan con un marcador, el cual modificará localmente las características electroquímicas en el elemento
25 sensor en la posición del respectivo oligonucleótido, de manera tal que se pueda medir una señal eléctrica, por ejemplo una tensión, un flujo de corriente, un cambio capacitancia o similar. Un procedimiento como este es conocido por la solicitud DE 101 26 341. En dicho procedimiento, el ácido nucleico diana se marca con biotina. Luego de la hibridación del ácido nucleico diana y el oligonucleótido de sondeo, el ácido nucleico diana enlazado se marca con fosfatasa estreptavidina-alcalina y se le ofrece a la fosfatasa alcalina un sustrato enzimático, el cual en la
30 conversión por medio de la fosfatasa genera un producto que modifica localmente la conductividad, de manera que entre los electrodos sobre los que se encuentra inmovilizado el oligonucleótido de sondeo se puede medir un aumento de corriente local.

En el procedimiento gravimétrico se detecta una señal, la cual se genera mediante la modificación de la masa durante la hibridación del ácido nucleico diana y el oligonucleótido de sondeo. Se conocen, por ejemplo, el
35 procedimiento FBAR y el procedimiento Kantilever.

En una detección magnética, el oligonucleótido de sondeo es inmovilizado sobre un elemento sensor magnético, por ejemplo un sensor GMR. El ácido nucleico diana o el híbrido del oligonucleótido de sondeo y el ácido nucleico diana puede ser marcado, por ejemplo, con partículas paramagnéticas, por ejemplo nanopartículas de óxido de hierro, de manera que en la posición del oligonucleótido, durante el enlace del ácido nucleico diana, se puede detectar una
40 modificación de las características magnéticas.

Un problema que surge en todos los principios de detección se basa en el hecho de que entre los elementos sensores individuales pueden surgir diferencias cualitativas, que justamente en procedimientos de medición altamente sensitivos y cuantitativos o semi-cuantitativos pueden conducir a potencias de señal de diferentes intensidades. También mediante otras influencias exteriores, por ejemplo variaciones o gradientes en la temperatura
45 o variaciones de temperatura o corriente determinadas por la fluídica en la superficie sensora, puede suceder que no todos los elementos sensores en una configuración de micromatrices presenten la misma sensibilidad, o que habiendo la misma concentración del ácido nucleico diana (z) no envíen la señal con la misma intensidad de señal. Se sabe, por ejemplo, que los elementos sensores que se encuentran en el margen de una configuración de micromatrices se comportan de manera diferente a los elementos sensores que se encuentran en la zona media de
50 una configuración de micromatrices.

Para un funcionamiento fiable, libre de errores, de análisis basados en micromatrices es necesario, por lo tanto, un control de calidad que también sea fiable y libre de errores. Éste debe contener especialmente todos los elementos básicos de un control positivo y negativo. Para esto, un elemento sensor correspondiente debe ser calibrado, en caso ideal, mediante una calibración de dos puntos, es decir que cada sensor debe ser cargado no solo con la

muestra que se debe determinar, sino también con dos muestras conocidas (concentraciones) y las respectivas señales de medición deben ser registradas.

5 Sobre todo para los sistemas de micromatrices con una gran cantidad de elementos sensores o posiciones direccionables, este modo de proceder es muy difícil de llevar a la práctica, ya que un sistema de calibración de dos puntos por lo general requiere medidas complejas y muy costosas. En la técnica se suele solucionar y eludir este problema previendo diferentes posiciones de elementos sensores como elementos sensores de control (puntos de control) en la configuración de micromatrices. Sin embargo, lo mencionado tiene la desventaja de que se debe suponer que los diferentes sensores se comportan de manera absolutamente idéntica y que los puntos de control previstos sean representativos para todos los elementos sensores.

10 La solicitud WO 2005/064012 publica un sistema de matrices con campos de medición y campos de control separados, donde en los campos de control hay otras moléculas captadoras aparte de las presentes en los campos de medición. La solicitud 2006/115851 A1 publica un procedimiento para la utilización de controles como calibradores para el sistema de micromatrices donde determinadas cantidades de controles se suministran al sistema bajo condiciones de hibridación y donde éstos enlazan de manera inespecífica con moléculas captadoras.

15 El objeto de la presente invención consiste en la realización de una calibración de dos puntos simple y económica que pueda realizarse con un mismo elemento sensor, el cual también se utiliza como sensor para un ácido nucleico diana. Acorde a la invención, este objetivo se logra mediante el procedimiento conforme a la reivindicación 1. Desarrollos ventajosos de la invención se describen en las reivindicaciones secundarias.

20 La presente invención hace referencia a un procedimiento para la calibración de un elemento sensor acorde a la reivindicación 1, que presenta:

25 a) Puesta en contacto del elemento sensor con una mezcla que contiene ácido nucleico de control (K) y ácido nucleico diana (Z), donde la temperatura de fusión del ácido nucleico de fusión $T_m(K)$ es menor a la temperatura de fusión del ácido nucleico diana $T_m(Z)$, donde $T_m(K)$ es la temperatura por debajo de la cual el ácido nucleico de control (K) se hibrida con el oligonucleótido de sondeo inmovilizado y donde $T_m(Z)$ es la temperatura por debajo de la cual el ácido nucleico diana (Z) se hibrida con el oligonucleótido de sondeo inmovilizado;

b1) hibridación de la mezcla con el oligonucleótido de sondeo en una temperatura $T[p] < T_m(K)$ y detección de una señal de control positiva;

b2) modificación de las condiciones de astringencia en $T=T[mess]$, de manera que:

$$T_m(K) < T[mess] < T_m(Z),$$

30 y detección de una señal de medición; y, de manera opcional

c) modificación de las condiciones de astringencia, de manera que $T[n] > T_m(Z)$ y detección de una señal de control negativa.

$T_m(K)$ es la temperatura de fusión del ácido nucleico de control en las condiciones del disolvente preestablecidas.

$T_m(Z)$ es la temperatura de fusión del ácido nucleico diana en las condiciones del disolvente preestablecidas.

35 $T[n]$ es la temperatura, en la cual se realiza la medición de la señal de control negativa.

$T[p]$ es la temperatura en la cual se realiza la medición de la señal de control positiva.

$T[mess]$ es la temperatura en la cual se realiza la medición de una señal de medición.

40 Preferentemente, la modificación de las condiciones de astringencia se logra aumentando la temperatura. De manera alternativa se puede lograr mediante una modificación de las condiciones del disolvente o mediante la modificación de una combinación de las condiciones del disolvente y la temperatura.

Acorde a otro aspecto de la invención se pueden medir varias señales de medición de 1 hasta n en diferentes temperaturas $T[mess\ 1-n]$, donde $T_m(K) < [mess\ 1-m] < T_m(Z)$.

Acorde a otro aspecto de la presente invención, el procedimiento se puede realizar para varios elementos sensores ubicados en una configuración de matriz.

Acorde a otro aspecto de la presente invención se puede marcar ácido nucleico diana y ácido nucleico de control con un marcador detectable.

5 El ácido nucleico diana y el ácido nucleico de control pueden ser marcados directamente (por ej. con un colorante, enzima o similar), pero también pueden ser marcados de forma indirecta (por ejemplo con biotina, una secuencia de reconocimiento para un segundo socio de enlace con marcador o similar).

Acorde a otro aspecto de la invención, el marcador detectable puede ser un marcador enzimático, el cual puede convertir un sustrato en un producto detectable por el elemento sensor.

Acorde a otro aspecto de la invención, antes del paso (a) se puede poner en contacto el elemento sensor con un producto detectable, para detectar una primera señal de calibración.

10 Acorde a otro aspecto de la invención, en otro elemento sensor, sobre el cual está directamente inmovilizado un marcador detectable, se puede detectar adicionalmente una señal de compensación de temperaturas en cada una de las temperaturas $T[p]$, $T[mess]$, $T[mess\ 1-n]$ y $T[n]$.

15 Acorde a otro aspecto de la invención, el elemento sensor puede ser un elemento sensor electroquímico y el ácido nucleico diana y el ácido nucleico de control pueden ser marcados con un marcador detectable, el cual es un marcador enzimático, que transforma un sustrato en un elemento detectable por el elemento sensor.

El marcador enzimático puede ser, sobre todo, una fosfatasa.

20 Acorde a otro aspecto de la invención, la temperatura de fusión $T_m(K)$ del ácido nucleico de control (K) es, preferentemente, unos 5° C menor, mejor aún si es por lo menos unos 10° C menor a la temperatura de fusión $T_m(Z)$ del ácido nucleico diana (Z). Acorde a otro aspecto de la invención, como ácido nucleico de control puede ser utilizada, preferentemente, una composición de ácido nucleico que presente secuencias de decaoligonucleótido aleatorias. También es posible la utilización de 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, ó 15-meros randomizados. Sobre todo se prefieren oligómeros biotinilados. También son posibles ácidos nucleicos de control que porten una secuencia de reconocimiento específica, que enlaza con una secuencia complementaria específica en el oligonucleótido de sondeo del elemento sensor, donde esa secuencia complementaria del oligonucleótido de sondeo no enlaza con el

25 ácido nucleico diana.

Se revela además una configuración que presenta:

- por lo menos un elemento sensor con un nucleótido de sondeo inmovilizado allí, a través del cual se puede detectar con el elemento sensor el enlace de un ácido nucleico diana (Z), donde un complejo enlazado de oligonucleótido de sondeo y ácido nucleico diana presenta una temperatura de fusión $T_m(Z)$;

30 - medio de calentamiento y/o refrigeración para modificar la temperatura en el elemento de sondeo;

- por lo menos un ácido nucleico de control, el cual puede formar un complejo enlazado con el nucleótido de sondeo, que presenta una temperatura de fusión de $T_m(K) < T_m(Z)$.

35 Acorde a otro aspecto de la invención, la configuración presenta además varios elementos sensores ubicados en una configuración de matriz. Los elementos sensores pueden estar previstos como micromatrices, por ejemplo como un biochip. La configuración de matriz puede estar diseñada como parte de un dispositivo microfluídico. Un dispositivo microfluídico es un dispositivo en el cual se pueden manejar fluidos, sobre todo líquidos, en volúmenes en el rango de microlitros,

40 Acorde a otro aspecto de la invención, el ácido nucleico de control está almacenado en la configuración como reactivo seco. Colocando un medio disolvente correspondiente (por ejemplo una solución tampón) se disuelve el ácido nucleico de control y puede enlazar con el oligonucleótido de sondeo.

Acorde a otro aspecto de la invención, la configuración está prevista en forma de un kit que abarca un dispositivo compuesto por el medio de calentamiento o refrigeración y el elemento sensor, que es por lo menos uno, y que abarca también una composición que presenta ácido nucleico de control.

Acorde a otro aspecto de la invención, el ácido nucleico de control está marcado con un marcador detectable.

45 Acorde a otro aspecto de la invención, el marcador detectable puede ser un marcador enzimático, el cual puede convertir un sustrato en un producto detectable por el elemento sensor.

Acorde a otro aspecto, el marcador detectable está directamente inmovilizado sobre otro elemento sensor.

Acorde a otro aspecto, el elemento sensor de la configuración es un elemento sensor electroquímico y el ácido nucleico de control está marcado con un marcador detectable, el cual es un marcador enzimático, que transforma un sustrato en un elemento detectable por el elemento sensor.

- 5 Acorde a otro aspecto de la invención, la configuración presenta una combinación de ácido nucleico como ácido nucleico de control, la cual presenta secuencias aleatorias de decaoligonucleótidos.

Acorde a otro aspecto, los ácidos nucleicos están biotinilados con secuencias aleatorias de decaoligonucleótidos.

- 10 En el sentido de la presente invención, un elemento sensor es un elemento que en un enlace de un ácido nucleico diana (Z) con un oligonucleótido de sondeo asociado con un elemento sensor, puede detectar una señal analizable con tecnología de medición. Esta señal puede ser una señal cualitativa o cuantitativa. Preferentemente, la señal es cuantitativa, es decir que la potencia de señal está correlacionada con la cantidad de ácidos nucleicos diana ligados.

- 15 Un oligonucleótido de sondeo es un oligonucleótido que sirve como sonda para el enlace de un ácido nucleico diana. Como oligonucleótido de sondeo se prefiere un ácido nucleico de cadena sencilla. El nucleótido de sondeo puede ser sintetizado mediante ADN, ARN o análogos nucleótidos sintéticos o modificados. Preferentemente, el oligonucleótido de sondeo tiene una secuencia definida. Preferentemente, el nucleótido de sondeo tiene un tamaño de más de 10 nucleótidos, y mejor aún si tiene más de 20 nucleótidos. Un oligonucleótido de sondeo "inmovilizado" es un nucleótido que está fijado espacialmente sobre el elemento sensor o en una cercanía espacial suficiente respecto al elemento sensor, de manera tal que bajo las condiciones en que se realizan mediciones en ese elemento sensor de sondeo, mantenga su posición junto al elemento de sondeo o en una cercanía suficiente respecto al elemento de sondeo. El oligonucleótido de sondeo puede estar ubicado directamente junto al elemento sensor, por ejemplo sobre el electrodo de un elemento sensor electroquímico o en cercanía directa respecto al elemento de sondeo; puede estar inmovilizado de manera indirecta, por ejemplo por medio de una molécula espaciadora o mediante un compartimento, es decir, mediante una delimitación o cerco. En el sentido de la presente invención, un ácido nucleico de control es un ácido nucleico que también puede hibridar con el oligonucleótido de sondeo, donde el híbrido de oligonucleótido de sondeo y ácido nucleico de control (K) presenta, sin embargo, una temperatura de fusión más baja que el híbrido de oligonucleótido de sondeo y el ácido nucleico diana (Z). Esto se consigue generalmente porque la longitud de la cadena complementaria, a través de la cual hibridan el ácido nucleico de control y el oligonucleótido de sondeo, es más corta que la longitud de la cadena a través de la cual hibridan el ácido nucleico diana con el oligonucleótido de sondeo. Esto se tratará en detalle a continuación. El concepto "hibridar" abarca la puesta en contacto de dos ácidos nucleicos (por ejemplo oligonucleótido de sondeo y ácido nucleico de control) bajo circunstancias (temperatura, valor pH, composición del tampón, concentración de sal) que permiten la formación de híbridos a través de cadenas complementarias.

- 35 El concepto "detección de una señal" abarca todos los pasos y condiciones previas necesarios para que se pueda desarrollar una señal en el elemento sensor, la cual puede indicar el enlace de un ácido nucleico con un oligonucleótido de sondeo. En una marcación directa, con una marcación del ácido nucleico diana mediante un colorante, la señal puede ser captada, por ejemplo, directamente por una cámara CCD. En el caso de una marcación indirecta, por ejemplo mediante biotinilación del ácido nucleico diana o del ácido nucleico de control, todos los demás pasos necesarios en el sentido de la presente invención (incubación con complejo de enzima estreptavidina, pasos de lavado, incubación con sustrato enzimático y medición de la señal de medición) deben estar incluidos en el concepto de "detección de una señal".

Bajo el concepto de "señal de control positiva" en el sentido de la presente invención se entiende una señal que bajo las condiciones dadas (temperatura, etc.) se corresponde con la intensidad de señal máxima, la cual se puede desarrollar en el elemento sensor. Este es el caso, por ejemplo, cuando todas las moléculas individuales de oligonucleótido de sondeo enlazaron con un socio de enlace.

- 45 Con el concepto "señal de control negativa", en el contexto de la presente invención se denomina una señal que, para el elemento sensor respectivo bajo las condiciones de medición respectivas, se corresponde con una señal mínima o un ruido de fondo. Este es el caso, por ejemplo, cuando ninguna de las moléculas individuales de oligonucleótido de sondeo enlazó con un socio de enlace al captarse la señal.

- 50 Una configuración de matriz es una configuración de elementos sensores individuales que están ordenados en posiciones direccionables.

Un marcador detectable significa, en el contexto de la presente invención, una marcación mediante la cual se puede captar directa o indirectamente una señal medible. Éste puede ser un marcador directo, es decir un colorante, un colorante fluorescente, una marcación radioactiva, etc. Pero el concepto de marcador detectable también abarca una

ES 2 396 934 T3

marcación indirecta, en la cual para la detección de una señal medible son necesarios otros paso, por ejemplo, una marcación biotinilada, una marcación mediante anticuerpos, una marcación enzimática, etc.

5 La elección de una secuencia y su longitud en pares de bases para un oligonucleótido de sondeo dependen de varias consideraciones. La longitud de una secuencia de oligonucleótidos de sondeo no puede superar una longitud determinada. Con la longitud del oligonucleótido de sondeo aumenta la temperatura de fusión del dúplex de oligonucleótido de sondeo y ácido nucleico diana. La temperatura de fusión (T_m) es aquella temperatura en la cual el oligonucleótido de sondeo se separa del ácido nucleico diana (se funde) o, expresado de otra manera, por debajo de su temperatura de fusión el oligonucleótido de sondeo se hibrida con el ácido nucleico diana. Sin embargo, en condiciones externas constantes (condiciones del medio disolvente), la temperatura de fusión de una cadena doble de ácido nucleico no depende solamente de su longitud, sino también de su composición de nucleótidos. Las formaciones de pares de bases G-C se estabilizan solamente a través de tres puentes de hidrógeno, las formaciones de pares de bases T-A sólo a través de dos. Las formaciones de pares de bases G-S son, por lo tanto, "más estables". La temperatura de fusión aumenta más con la cantidad de nucleótidos G y nucleótidos C. La temperatura de fusión se puede calcular con varios métodos, los datos se refieren, sin embargo, a °C.

15 El método GC es un método simple pero inexacto:

$$T_m (\text{°C}) = (64 + 41 * (\%GC - 16.4)) \text{°C}$$

donde %GC de la parte G y C son bases en la totalidad de las bases.

El método de "salt adjusted" (de ajustado a la sal) es algo más exacto e incluye la concentración de iones Na^+ en la carga de reacción:

20
$$T_m (\text{°C}) = (100,5 + 41 * \%GC - (820 : L) * 16,6 \log [\text{Na}^+]) \text{°C}$$

Donde L es el total de bases y donde $[\text{Na}^+]$ señala la concentración de iones Na^+ .

Otro método es el de "base stacking" (apilamiento de bases), en el cual se incluyen los valores de entalpía y entropía de la formación de la hélice durante la hibridación.

25 También otros componentes del medio disolvente tienen una influencia en la temperatura de fusión. Sobre todo cuando se utiliza formamida para controlar las condiciones de hibridación. Con la siguiente fórmula se puede estimar la temperatura teniendo en cuenta estos parámetros:

$$T_m = 81,5 + 0,41 * (\%GC) + 16,6 \log [\text{Na}^+] - (820 : L) - 0,61 * (\% \text{ Formamida}) - 1,4 (\% \text{ incompatibilidad})$$

30 Donde % incompatibilidad = porcentaje de bases mal unidas. Lo óptimo es que la temperatura de hibridación se encuentre aproximadamente a 5-10 °C por debajo de la temperatura de fusión para híbridos ADN/ADN, en los híbridos ADN/ARN con 5 °C ya es suficiente.

35 Para secuencias más cortas se utilizan otras fórmulas de aproximación. Para estimar la temperatura de hibridación, en la práctica se ha acreditado la regla (4+2): Allí, para cada citosina y cada guanina se cuentan 4 °C, para cada adenina y cada timidina se cuentan 2 °C. Esta suma, descontando 5-10 °C, da como resultado la temperatura de hibridación aproximada. Las diferentes fórmulas para el cálculo aproximado de la temperatura de fusión muestran que, además de la longitud de sondeo (longitud del rango complementario), también el contenido GC, la concentración de sal y la naturaleza del medio disolvente determinan la temperatura de fusión. La combinación de estos parámetros representa las condiciones de astringencia que deciden si dos cadenas de ácido nucleico complementarias, o por lo menos parcialmente complementarias, hibridan o no. De manera correspondiente, mediante una variación de los parámetros de temperatura, concentración de sal, composición del medio disolvente, las condiciones de astringencia se modifican y se controla la hibridación (también denominada "annealing", en inglés) o la fusión o separación de las cadenas dobles.

Entretanto hay una gran cantidad de softwares con los cuales se puede calcular la temperatura de fusión de las secuencias.

45 La invención se describe a continuación de manera ilustrativa por medio de ejemplos y de los dibujos adjuntos. En los dibujos se ve:

Figura 1: Una representación esquemática de un elemento sensor ejemplar, como el que se usa en el procedimiento acorde a la invención;

Figura 2: Una representación esquemática de una primera forma de realización de la invención;

Figura 3: Una representación esquemática de otra forma de realización de la invención;

5 Figura 4: Una representación esquemática de otra forma de realización de la invención; y

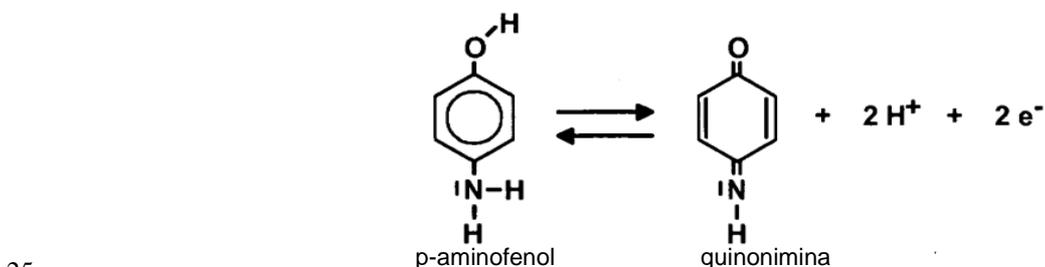
Figura 5: Una representación esquemática de otra forma de realización de la invención.

Figura 6: Una representación esquemática de otra forma de realización de la invención.

10 En la figura 1 hay un elemento sensor ejemplar con un dispositivo medidor con dos electrodos 2 y 3, donde hay además una superficie de oro 5 sobre la cual está inmovilizado un oligonucleótido de sondeo 100. De manera alternativa, los oligonucleótidos de sondeo pueden estar inmovilizados directamente sobre los electrodos 2, 3. Elementos sensores correspondientes están descritos con detalle, por ejemplo, en la solicitud DE 101 26 341 A1.

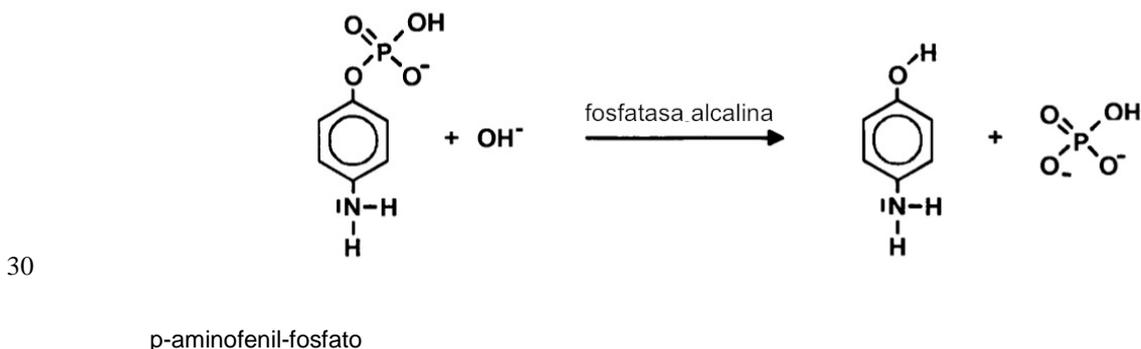
15 La figura 1 muestra de manera esquemática un sustrato 1 con una superficie plana, la cual está formada, por ejemplo, por la superficie cristalográfica de un chip de silicio. Sobre el sustrato 1 hay una matriz de detectores electroquímicos 2, 3 realizada sobre posiciones de matriz predeterminadas, con las cuales se pueden realizar ensayos bioanalíticos con reacciones enzimáticas acopladas. En particular, para los ensayos bioanalíticos un oligonucleótido de sondeo se denomina aquí con el número 100, una molécula de análisis con la cifra 200 y el denominado marcador enzimático, con el número 300. El oligonucleótido de sondeo 100 reacciona específicamente con una molécula de análisis 100 complementaria (ésta puede ser un ácido nucleico diana o un ácido nucleico de control) e inmoviliza así, de manera específica en la posición de la matriz, un marcador enzimático 300. A
20 continuación, un sustrato enzimático 400 se convierte en un producto 500 mediante el efecto catalítico del marcador enzimático.

Sobre el elemento sensor, con ayuda de los electrodos 2, 3 se puede medir el aumento/la disminución de sustrato/producto. Como producto 500 detectable se menciona, como ejemplo el par redox p-aminofenol/quinonimina:



En el proceso redox correspondiente están involucrados 2 electrodos y dos iones H⁺.

Este sistema se utiliza, por ejemplo, en reacciones de comprobación de enzimas acopladas. Allí se utiliza la enzima "fosfatasa alcalina" como marcador o sustancia de refuerzo. La fosfatasa alcalina puede dividir p-aminofenil-fosfato en p-aminofenol y fosfato:



El p-aminofenol surgido se oxida en el sistema de electrodos o bien cicla el par redox p-aminofenol/quinonimina. La señal puede ser emitida como un incremento en la intensidad de corriente (I) en el tiempo (t), donde la intensidad de señal $S = dI/dt$.

5 En la figura 2 se muestra una representación esquemática de una primera forma de realización de la invención. Un elemento sensor se carga con ácidos nucleicos de control (K) a una temperatura $T[p] < T_m(K)$, donde $T_m(K)$ es la temperatura del dúplex de oligonucleótido de sondeo y ácido nucleico de control bajo condiciones del disolvente preestablecidas. La concentración del ácido nucleico de control es lo suficientemente elevada como para que todos los oligonucleótidos de sondeo puedan ser saturados. En la temperatura $T[p]$ las moléculas de ácido nucleico de control hibridan con todos los oligonucleótidos de sondeo libres. El oligonucleótido de sondeo está etiquetado o
10 marcado con biotina (B). Ahora se añade enzima (E) conjugada con streptavidina, la cual enlaza con la biotina (B) y puede convertir un sustrato (no se muestra), de manera que en el elemento sensor se puede deducir una señal (+).

En la temperatura $T[p]$ todos los oligonucleótidos de sondeo están saturados con ácido nucleico de control, de manera que se obtiene una señal máxima como señal de control positiva.

15 A continuación se eleva la temperatura a $T[n] > T_m(K)$. Los dúplex de oligonucleótido de sondeo y ácido nucleico de control se fusionan, de manera que se liberan los ácidos nucleicos de control y (junto con la enzima) pueden ser eliminados por lavado. En la temperatura $T[n]$ todos los oligonucleótidos de sondeo vuelven a estar no saturados, de manera que no se mide ninguna señal (-) o señal de ruido de fondo y se obtiene una señal mínima como señal de control negativa.

20 Los valores para la señal de control positiva y la señal de control negativa pueden guardarse, por ejemplo, en un dispositivo de control y ser utilizados como futuros valores de referencia. De esta manera se puede realizar una calibración específica para las posiciones individuales de una micromatriz, en la cual cada posición de matriz (cada "spot" -punto-) se calibra mediante el procedimiento representado en la figura 2. Esto también puede realizarse para el control de calidad de la micromatriz.

25 En la figura 3 se muestra una representación esquemática de otra forma de realización de la invención. Un elemento sensor se carga con una muestra, la cual contiene probablemente el ácido nucleico diana (Z) para un oligonucleótido de sondeo correspondiente. Además, se incorpora ácido nucleico de control (K). La temperatura es de $T[p] < T_m(K)$, donde $T_m(K)$ es la temperatura de fusión del dúplex de oligonucleótido de sondeo y ácido nucleico de control bajo condiciones del medio disolvente determinadas (además rige $T_m(K) < T_m(Z)$). La concentración de la mezcla de ácido nucleico diana y ácido nucleico de control es lo suficientemente elevada como para que todos los oligonucleótidos diana libres puedan ser saturados con ácido nucleico diana o ácido nucleico de control. En la temperatura $T[p]$ las moléculas de ácido nucleico diana y de control hibridan con todos los oligonucleótidos de sondeo libres. El ácido nucleico de control está marcado con biotina (B). Ahora se añade enzima (E) conjugada con estreptavidina, la cual enlaza con la biotina (B) y puede convertir un sustrato (no se muestra), de manera que en el
30 elemento sensor se puede deducir una señal (+).

35 En la temperatura $T[p]$ ahora todos los oligonucleótidos de sondeo están saturados con ácido nucleico diana o de control, de manera que se obtiene una señal máxima como señal de control positiva.

40 A continuación se eleva la temperatura $T[mess]$ a $T_m(K) < T[mess] < T_m(Z)$, donde $T_m(Z)$ es la temperatura de fusión del dúplex de oligonucleótido de sondeo y ácido nucleico de control bajo condiciones de medio disolvente preestablecidas. Los dúplex de oligonucleótido de sondeo y ácido nucleico de control se fusionan, de manera que se liberan los ácidos nucleicos de control y (junto con la enzima unida a ellos) pueden ser eliminados por lavado. En la temperatura $T[mess]$ solamente los oligonucleótidos de sondeo que están cubiertos con ácido nucleico diana suministran una señal (+), que es una señal de medición para el ácido nucleico diana.

45 A continuación se eleva la temperatura a $T[n] > T_m(Z)$. Los dúplex o híbridos de oligonucleótido de sondeo y ácido nucleico diana también se fusionan, de manera que se liberan los ácidos nucleicos diana y (junto con la enzima) pueden ser eliminados por lavado. En la temperatura $T[n]$ todos los oligonucleótidos de sondeo vuelven a estar no saturados, de manera que no se mide ninguna señal (-) o señal de ruido de fondo y se obtiene una señal mínima como señal de control negativa.

El valor de la intensidad de señal del ácido nucleico diana $S[Z]$ puede expresarse entonces en relación con la señal de control positiva y la señal de control negativa, por ejemplo acorde a la siguiente fórmula:

50
$$S [Z] = (S [mess] - S [n]) / (S [p] - S [n]).$$

De esta manera, en cada calibración se puede realizar al mismo tiempo una calibración del elemento sensor, lo cual posibilita una exactitud de medición especialmente alta.

La secuencia del ácido nucleico de control está seleccionada, por ejemplo, de manera que enlaza con el oligonucleótido de sondeo a través de una secuencia complementaria más corta que el ácido nucleico diana. De manera alternativa, el ácido nucleico de control también puede presentar un contenido GC más bajo o una combinación de contenido GC bajo y secuencia complementaria enlazante más corta que el ácido nucleico diana. En las figuras 2 a 6 esto está representado esquemáticamente. Sólo por motivos de una mejor claridad en la visualización, el ácido nucleico diana está representado con cinco pares de bases aglutinantes y el ácido nucleico de control con dos pares de bases enlazantes. Preferentemente, el ácido nucleico diana enlaza a través de un rango de 15 o más, preferentemente 30 o más pares de bases enlazantes.

Cuando el ácido nucleico diana enlaza con el oligonucleótido de sondeo por medio de un rango complementario de aprox. 20 a 30 bases, para el ácido nucleico de control, el rango complementario se puede elegir, por ejemplo, con una longitud de 6 a 12 bases. Es posible elegir un ácido nucleico diana que en el rango complementario presente parcialmente una secuencia idéntica al ácido nucleico diana, de manera que enlace a través de los mismos nucleótidos en el oligonucleótido de sondeo que el ácido nucleico diana. También es posible utilizar como ácido nucleico de control oligómeros cortos con secuencias aleatorias, por ejemplo hexámeros randomizados, decámeros randomizados o similares.

Acorde a una forma de realización alternativa, el oligonucleótido de sondeo presenta un rango con una secuencia que no puede hibridar con el ácido nucleico diana, sino con el ácido nucleico de control. Acorde a otra forma de realización, este rango puede estar separado mediante un espaciador de la secuencia que enlaza el ácido nucleico diana, de manera que es posible incluso que el ácido nucleico diana y ácido nucleico de control enlacen al mismo tiempo con el oligonucleótido de sondeo. Este caso se encuentra representado, por ejemplo, en la figura 4, donde tanto el ácido nucleico de control más corto, como el ácido nucleico diana más largo pueden enlazar con un oligonucleótido de sondeo en diferentes rangos del oligonucleótido de sondeo. El procedimiento acorde a la figura 4 se realiza, por lo demás, según el procedimiento de la figura 3.

En la figura 5 se muestra una representación esquemática de otra forma de realización de la invención, en la cual se determina una curva de punto de fusión del ácido nucleico diana (Z). Un elemento sensor se carga con una muestra, la cual contiene probablemente el ácido nucleico diana para un oligonucleótido de sondeo correspondiente. Además, como en el procedimiento acorde a la figura 3, se agrega ácido nucleico de control (K). La temperatura es de $T[p] < T_m(K)$, donde $T_m(K)$ es la temperatura de fusión del dúplex de oligonucleótido de sondeo y ácido nucleico de control bajo condiciones del medio disolvente determinadas. La concentración de la mezcla de ácido nucleico diana y ácido nucleico de control es lo suficientemente elevada como para que todos los oligonucleótidos diana libres puedan ser saturados con ácido nucleico diana o ácido nucleico de control. En la temperatura $T[p]$ las moléculas de ácido nucleico diana y de control hibridan con todos los oligonucleótidos de sondeo libres. El ácido nucleico de control está marcado con biotina (B). Ahora se añade enzima (E) conjugada con streptavidina, la cual enlaza con la biotina (B) y puede convertir un sustrato (no se muestra), de manera que en el elemento sensor se puede deducir una señal (+).

En la temperatura $T[p]$ ahora todos los oligonucleótidos de sondeo están saturados con ácido nucleico diana o de control, de manera que se obtiene una señal máxima como señal de control positiva.

A continuación se eleva la temperatura paso a paso mediante $T[\text{mess } 1]$ $T[\text{mess } 2]$ etc. hasta $T[p] < T[\text{mess } 1-n] < T_m(Z)$ (Z) y donde $T_m(Z)$ es la temperatura de fusión del dúplex de oligonucleótido de sondeo y ácido nucleico diana bajo condiciones del medio disolvente preestablecidas. Los dúplex de oligonucleótido de sondeo y ácido nucleico de control se fusionan primero (como se representa en la figura 5 en $T[\text{mess } 1]$), de manera que se liberan los ácidos nucleicos de control y (junto con la enzima unida a ellos) pueden ser eliminados por lavado. En la temperatura $T[\text{mess } 1]$ solamente los oligonucleótidos de sondeo que están cubiertos con ácido nucleico diana suministran una señal, que es una señal de medición para el ácido nucleico diana. Con el aumento paso a paso de la temperatura, también los dúplex de oligonucleótido de sondeo y ácido nucleico diana empiezan a fusionarse paulatinamente (como está representado en la figura 5 en $T[\text{mess } 2]$), de manera que se puede elaborar una curva de fusión.

Finalmente se eleva la temperatura a $T[n] > T_m(Z)$. Los dúplex de oligonucleótido de sondeo y ácido nucleico diana se fusionan completamente, de manera que todos los ácidos nucleicos diana se liberan y (junto con la enzima) pueden ser eliminados por lavado. En la temperatura $T[n]$ todos los oligonucleótidos de sondeo vuelven a estar no saturados, de manera que no se mide ninguna señal (-) o señal de ruido de fondo y se obtiene una señal mínima como señal de control negativa.

Además, con para-aminofenol (pAP), que es el sustrato principal de reacción electroquímica, se puede realizar una medición de calibración inicial para determinar si todos los electrodos reaccionan ante la presencia de esta sustancia con reacción redox. De esta forma se puede verificar que todos los electrodos reaccionen a este producto con reacción redox. A continuación se elimina por lavado el para-aminofenol libre y se comienza con una secuencia de medición dependiente de la temperatura.

En la figura 6 se muestra una representación esquemática de otra forma de realización de la invención. En la línea superior está la secuencia de medición normal, descrita como para la figura 5, en resumen:

5 Hibridación con ácido nucleico diana (Z) y ácido nucleico de control (K), medición del control positivo en $T[p] < T_m(K)$, fusión del ácido nucleico de control y elaboración de la curva de fusión del ácido nucleico diana en $T[p] < T[mess\ 1-n] < T_m(Z)$ y detección de la señal del control negativo en $T[n] > T_m(Z)$. Sobre otros elementos sensores del sensor, que están diseñados como puntos para el control de la temperatura, dimensionados por separado, se colocan oligonucleótidos de sondeo, que portan una biotina (representado en la figura 6 en la línea inferior). Aquí, la enzima enlaza con los oligonucleótidos de sondeo través del complejo biotina-streptavidina a lo largo de todo el rango de temperatura medido de $T[p] < T_m(K)$, $T[p] < T[mess\ 1-n] < T_m(Z)$, $T[n] > T_m(Z)$, independientemente de la temperatura de fusión del híbrido ADN, y envía una sentencia sobre la dependencia del sistema de detección (actividad de la enzima y reacción redox electroquímica) de la temperatura. Mediante el régimen de temperatura de la señal máxima se puede corregir la intensidad de señal en el punto de medición sobre el cual se mide el ácido nucleico diana.

10 Además es posible prever puntos de control negativo adicionales que están revestidos con oligonucleótidos de sondeo con secuencias aleatorias que, por lo tanto, pueden enlazar de manera no específica a los ácidos nucleicos. De esa manera se pueden compensar, entre otras cosas, efectos de enlace no específicos y efectos de temperatura determinados con la corriente. Finalmente, cada par de sensores se calibra respecto a la conversión enzimática (rotación de sustrato) en Mol/(Litros x seg.). También aquí es posible calcular, a partir de la intensidad de señal para el punto de medición (que carga oligonucleótidos de sondeo específicos para el ácido nucleico diana) y para el punto de control negativo, una señal compensada, por ejemplo mediante la formación de un diferencial o un cociente.

20 Se indica que los ejemplos son solamente para fines de visualización y ejemplificación y que en el marco del alcance de la protección de las reivindicaciones de patente son posibles cambios y modificaciones. Sobre todo el procedimiento acorde a la invención puede ser utilizado en conjunto con otros elementos sensores y marcadores o etiquetadores, por ejemplo para elementos sensores ópticos, magnéticos o gravimétricos.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la calibración de un elemento sensor que presenta un oligonucleótido de sondeo inmovilizado, a través del cual se puede captar mediante el sensor el enlace de un ácido nucleico diana (Z), que incluye:
- 5 a) Puesta en contacto del elemento sensor con una mezcla que contiene ácido nucleico de control (K) y ácido nucleico diana (Z), donde la temperatura de fusión del ácido nucleico de fusión $T_m(K)$ es menor a la temperatura de fusión del ácido nucleico diana $T_m(Z)$, donde $T_m(K)$ es la temperatura por debajo de la cual el ácido nucleico de control (K) se hibrida con el oligonucleótido de sondeo inmovilizado y donde $T_m(Z)$ es la temperatura por debajo de la cual el ácido nucleico diana (Z) se hibrida con el oligonucleótido de sondeo inmovilizado;
- 10 b1) hibridación de la mezcla con el oligonucleótido de sondeo en una temperatura $T[p] < T_m(K)$ y detección de una señal de control positiva;
- b2) modificación de las condiciones de astringencia en una temperatura de medición $T=T[mess]$, de manera que:
- $$T_m(K) < T[mess] < T_m(Z),$$
- y detección de una señal de medición; y
- 15 c) modificación de las condiciones de astringencia, de manera que $T[n] > T_m(Z)$ y detección de una señal de control negativa.
2. Procedimiento acorde a la reivindicación 1, donde la modificación de las condiciones de astringencia se logra aumentando la temperatura.
3. Procedimiento acorde a la reivindicación 1, donde se miden varias señales de medición de 1 hasta n en diferentes temperaturas $T[mess\ 1-n]$, donde $T_m(K) < T[mess\ 1-n] < T_m(Z)$.
- 20 4. Procedimiento acorde a una de las reivindicaciones anteriores, donde el procedimiento se realiza para varios elementos sensores ubicados en una configuración de matriz.
5. Procedimiento acorde a una de las reivindicaciones anteriores, donde se marcan el ácido nucleico diana y el ácido nucleico de control con un marcador detectable.
- 25 6. Procedimiento acorde a la reivindicación 5 donde el marcador detectable es un marcador enzimático, el cual puede convertir un sustrato en un producto detectable por el elemento sensor.
7. Procedimiento acorde a una de las reivindicaciones anteriores, donde antes del paso (a) se pone en contacto el elemento sensor con un producto detectable, para captar una primera señal de calibración.
8. Procedimiento acorde a una de las reivindicaciones anteriores, donde en otro elemento sensor, sobre el cual está directamente inmovilizada un marcador detectable, se capta adicionalmente una señal de compensación de temperaturas en cada una de las temperaturas $T[p]$, $T[mess]$, $T[mess\ 1-n]$ y $T[n]$.
- 30 9. Procedimiento acorde a una de las reivindicaciones anteriores, donde el elemento sensor es un elemento sensor electroquímico y el ácido nucleico diana y el ácido nucleico de control son marcados con un marcador detectable, el cual es un marcador enzimático, que transforma un sustrato en un elemento detectable por el elemento sensor.
- 35 10. Procedimiento acorde a una de las reivindicaciones anteriores, donde la temperatura de fusión $T_m(K)$ del ácido nucleico de control (K) es por lo menos 5° C menor a la temperatura de fusión $T_m(Z)$ del ácido nucleico diana (Z).

FIG 1

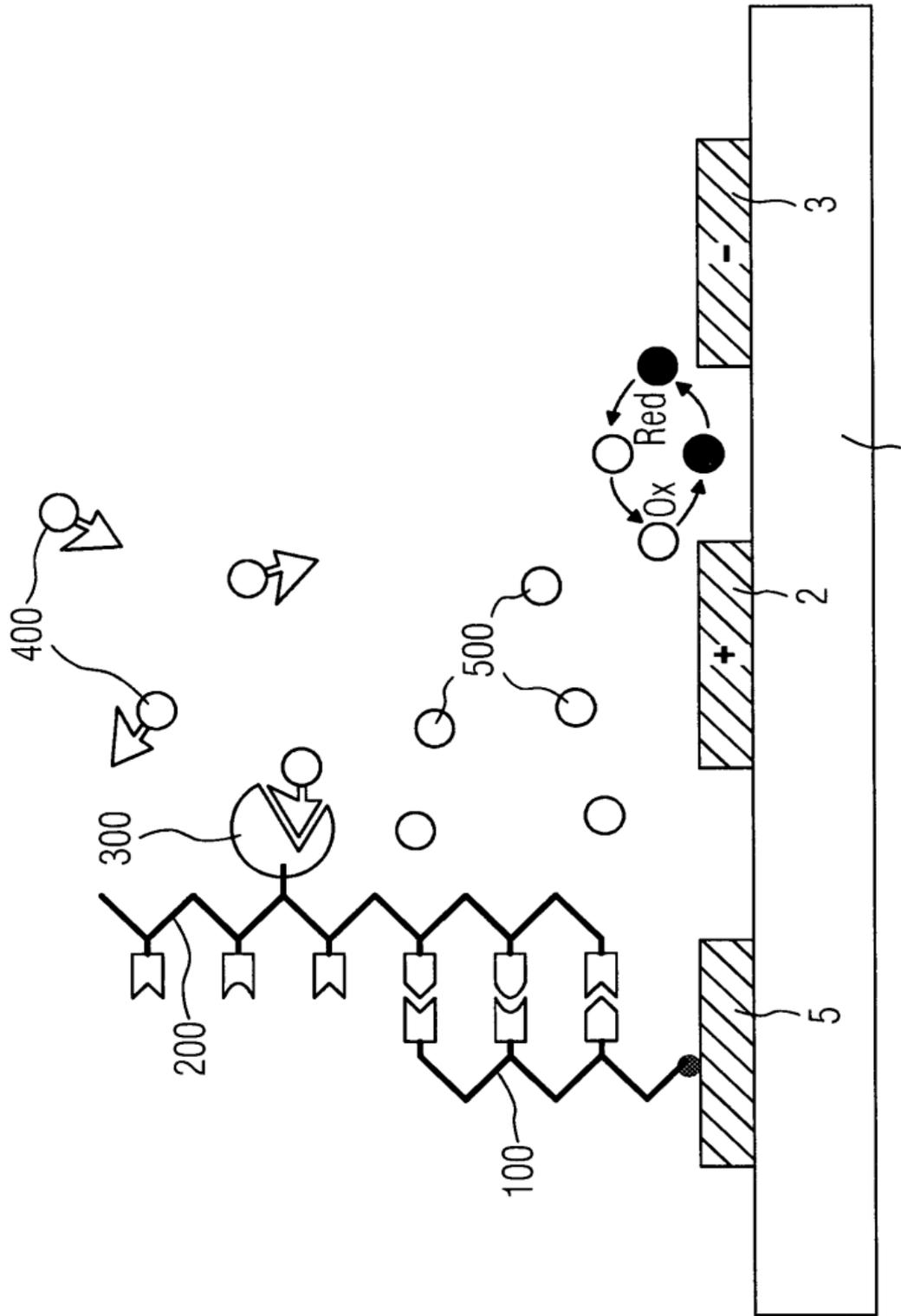


FIG 2

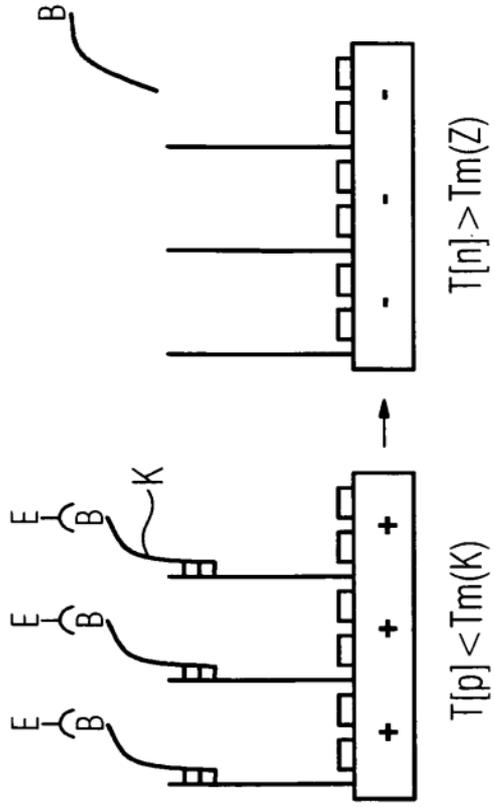


FIG 3

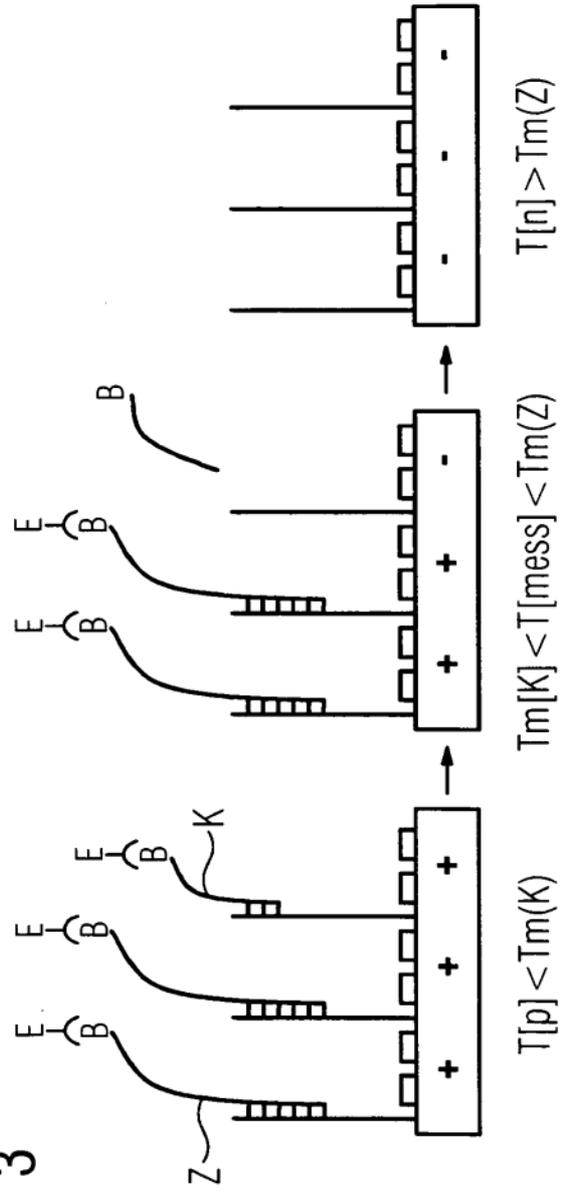
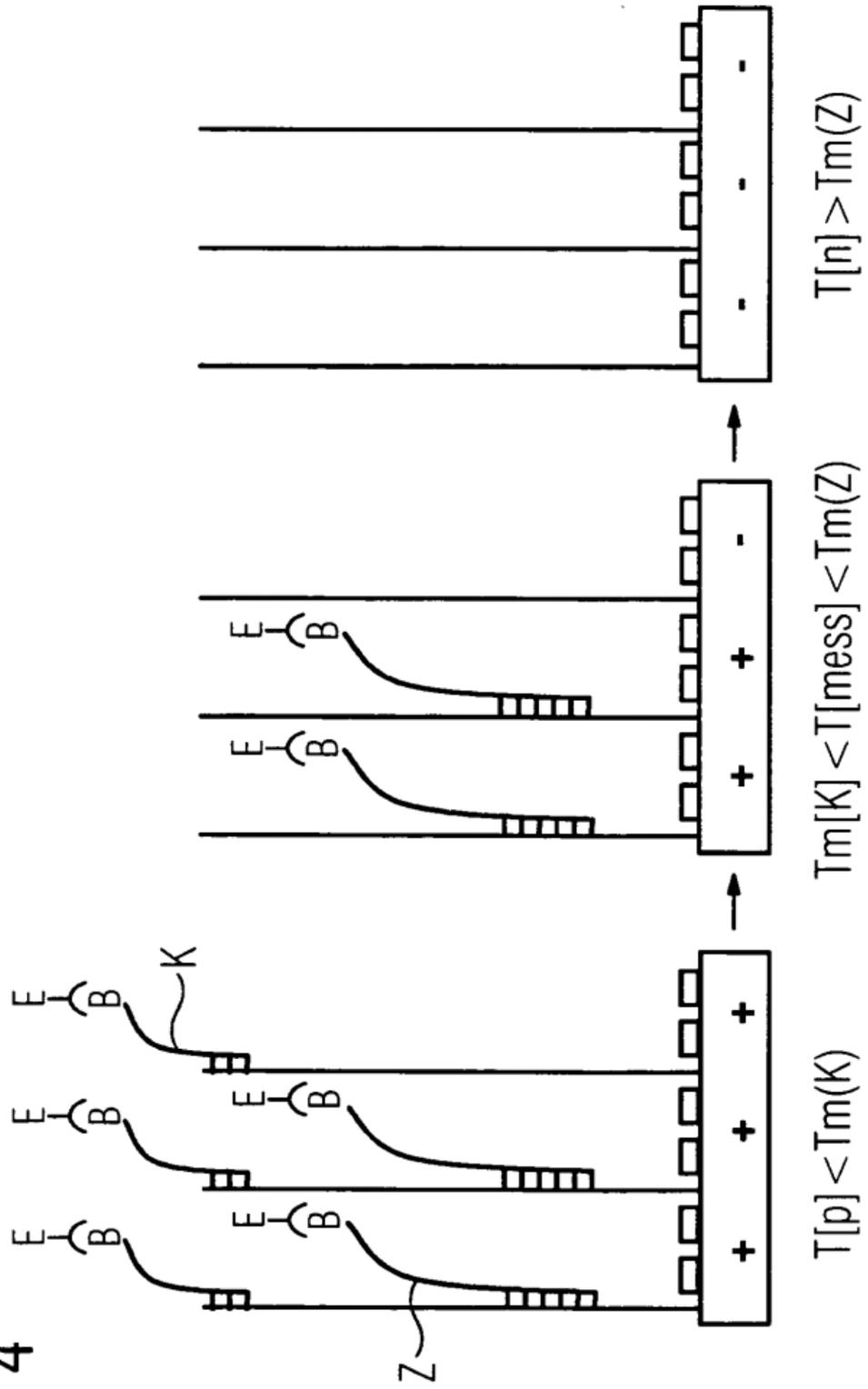


FIG 4



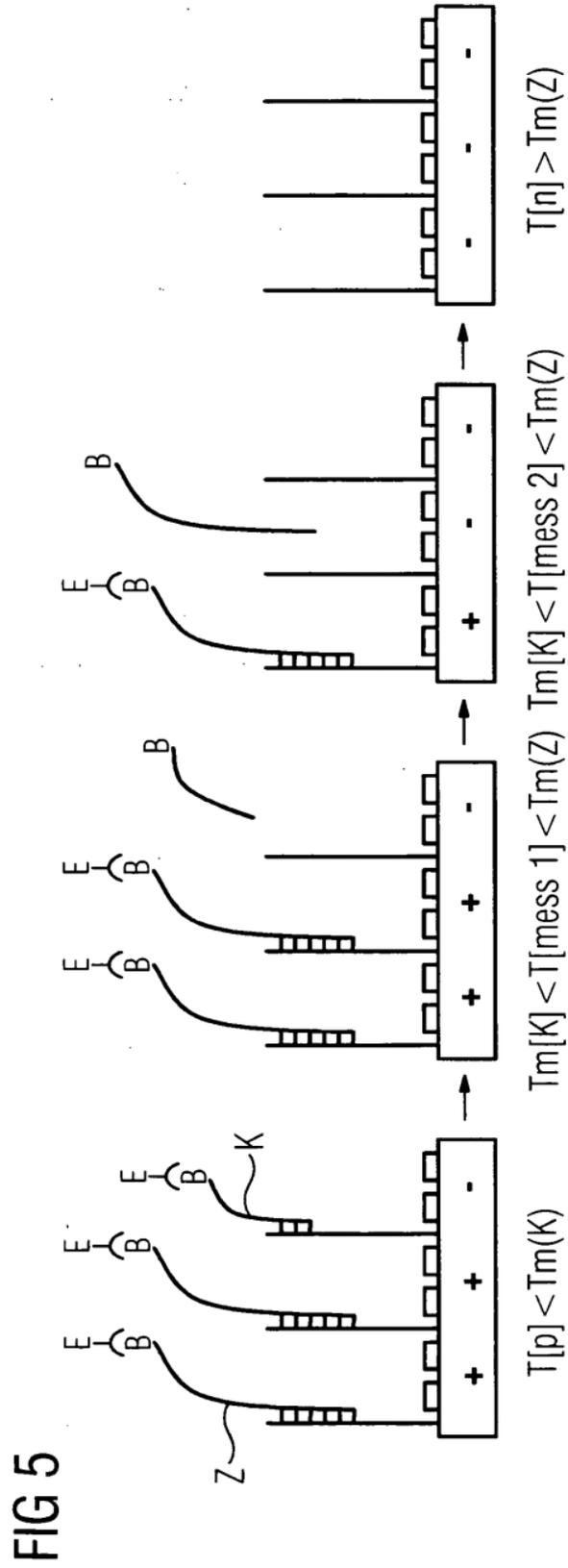


FIG 6

