

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 352**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

G02B 6/00 (2006.01)

G02B 6/12 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2006 E 06719536 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2012 EP 1851337**

54 Título: **Purificación y análisis de ADN en superficies formadas mediante nanoingeniería**

30 Prioridad:

26.01.2005 US 43561

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

06.03.2013

73 Titular/es:

**REED, MICHAEL W. (33.3%)
3575 NE 180TH ST.**

**SEATTLE WA 98155, US;
WEIGL, BERNHARD H. (33.3%) y
BARDELL, RONALD L. (33.3%)**

72 Inventor/es:

**WEIGL, BERNHARD, H.;
BARDELL, RONALD, L. y
REED, MICHAEL, W.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 397 352 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

Purificación y análisis de ADN en superficies formadas mediante nanoingeniería

5 **Antecedentes de la invención**1. **Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere en general a la purificación de ADN, en particular, al uso de superficies formadas mediante nanoingeniería en la purificación y análisis de ADN.

2. **Descripción de la técnica anterior**

15 Se requiere tecnología para simplificar el aislamiento, manipulación y determinación del AND genómico para aplicaciones en diagnóstico medico o de biodefensa portátiles. La calidad del ácido nucleico aislado de tejido humano es crucial para que los datos del análisis genético sean reproducibles, precisos y proporcionen información. Dado que la importancia comercial de los productos para aislamiento de ADN ha aumentado se han realizado muchos trabajos en esta área.

20 Una técnica en la que se han realizado muchos progresos es el uso de dispositivos microfluidos para realizar análisis genéticos. Se dispone de muchos formatos de ensayo en micromatriz y comparten la capacidad para permitir la interrogación simultánea de un gran número de dianas genéticas a partir de una única muestra.

25 Ya se han desarrollado ensayos de fase en solución sensibles para medir la concentración del ADN bicatenario (ADNs) usando moléculas de unión (MU) a ranuras minoritarias fluorogénicas. Cuando no hay ADN presente, la molécula puede rotar libremente en solución, lo que es crucial para su fondo fluorescente bajo. Tras la unión al ADNds, el compuesto asume una conformación planar rígida en la ranura minoritaria hidrofóbica que ha aumentado la fluorescencia. Cuidadosamente sometiendo a ingeniería la unión de las MU fluorogénicas a las superficies se puede medir la cantidad de ADN a medida que se transfiere a través de un dispositivo microfluídico.

30 Los documentos US 2001/026921, WO 2005/066343, US 2003/138941, US 5, 587,128, US 2004/ 152 085 y Joon-Ho Kim y col.: Proceedings of the IEEE 15th Annual International Conference on Micro Electro Mechanical Systems. MEMS 2002. Las Vegas, NV, Jan. 20 - 24, 2002; [IEEE International Micro Electro Mechanical Systems Conference], New York, NY: Ivol. Conf. 15, 1 January 2002 (2002-01-01), páginas 133-136; Boom y col., J. Cl. Microbiol., vol. 28, páginas 495-503, 1990 and Vogelstein y col., PNAS. USA, vol. 76, páginas 615-619, 1979 divulgan el uso de superficies modificadas para captura de ácido nucleico.

35 Por tanto, se proporciona un objeto de la presente invención para proporcionar un dispositivo microfluídico que aísla de forma simultánea el ADN genómico, mide la cantidad del ADN purificado y distribuye las soluciones de ADN estandarizado de concentración específica para el análisis campo abajo.

También se proporciona un dispositivo microfluídico para aislar y preparar ADN en el que el coste y la complejidad del dispositivo se minimizan.

45 Se describe un dispositivo microfluídico que pueda capturar simultáneamente ADN bicatenario (ADNs) de campos biológicos y medir la cantidad de ADN inmovilizado.

También se describe la síntesis de agentes de unión (MU) a ranuras minoritarias fluorogénicos con grupos ligadores electrofílicos o nucleofílicos y demostrar el incremento de la fluorescencia en presencia de ADNds.

50 Estos y otros objetos de la presente invención se pondrán de manifiesto con mayor facilidad a partir de las descripciones y figuras siguientes.

Breve descripción de las figuras

55 La FIG. 1 es una representación de la estructura de Hoechst 33258 unido a un dúplex de ADN sintético de 12 unidades;

La FIG. 2 muestra la estructura de análogos reactivos de H33258 desarrollados para la unión a ligadores en sondas de ADN;

60 La FIG. 3 es una representación de la interacción de dos fluidos que fluyen dentro de un dispositivo microfluídico;

La FIG. 4 es una representación de varias superficies modificadas con amina con agentes de unión (MU) a ranuras minoritarias fluorogénicos.

La FIG. 5 muestra la síntesis de MU fluorogénicas con grupos reactivos;

65 La FIG. 6 es una representación de la activación de las superficies de cristal modificadas con aminas de una lámina con cloruro cianúrico en una solución orgánica;

La FIG. 7 muestra posibles diseños de cámaras para un dispositivo microfluídico para usar en la presente invención;

La FIG. 8 es una vista frontal de una tarjeta microfluídica adecuada para usar en la presente invención;

La FIG. 9 es una vista en despiece ordenado de una tarjeta microfluídica con sus capas separadas.

Las FIGS. 10 A-E, en conjunto, representan una vista frontal de la tarjeta de la FIG. 9 que muestra la secuencia de eventos de la tarjeta durante el uso;

La FIG. 11 muestra la síntesis de un pigmento de Hoechst fluorogénico con un ligador de hexilamina unido;

La FIG. 12 es un gráfico que muestra la fluorescencia de la molécula BB-NH² frente a BB-OH excitada a 360 nm.

La FIG. 13 es un gráfico que muestra la fluorescencia a 460 nm para cuatro superficies de bisbencimida diferentes; y

La FIG. 14 es un gráfico que muestra la cantidad de ADN unido frente a la cantidad de ADN ofrecida para cubreobjetos de cristal y de plástico.

Descripción de las realizaciones preferidas

Ya se han desarrollado ensayos de fase en solución sensibles para medir la concentración del ADNds usando moléculas de unión (MU) a ranuras minoritarias fluorogénicas (Hoechst 33258). Cuando no hay ADN presente, la molécula puede rotar libremente en solución, lo que es crucial para su fondo fluorescente bajo. Tras la unión al ADNds, el compuesto asume una conformación planar rígida en la ranura minoritaria hidrofóbica que ha aumentado la fluorescencia. Cuidadosamente sometiendo a ingeniería la unión de las MU fluorogénicas a las superficies se puede medir la cantidad de ADN a medida que se transfiere a través de un dispositivo microfluídico. Se usa química de conjugación para colocar los fluoros sobre estructuras macromoleculares diseñadas para maximizar la flexibilidad conformacional y acceder al ADN diana.

La molécula Hoechst 33258 tiene una estructura policíclica que puede formar una estructura con forma de media luna que es isohelicoidal con la ranura minoritaria de ADN de forma B. La FIG. 1 muestra la estructura de RMN en solución de Hoechst 33258 unido a un dúplex de ADN sintético de 12 unidades (número ID de la estructura de PDB: 1Q5X). El extremo fenol de la molécula con forma de media luna es un punto de unión conveniente para la unión en grupos conjugados. La estructura en solución acuosa es flexible y relativamente no fluorescente. La excitación de la molécula sin unir con luz a 356 nm da una fluorescencia débil a 492 nm. No obstante, cuando se unieron al ADNds, los anillos de bencimidazol se fijan en una conformación planar y se desarrolla un sistema aromático extenso que emite una fuerte fluorescencia a 458 nm. La molécula se oculta de las moléculas de agua en la ranura minoritaria y esto incrementa adicionalmente la fluorescencia. Estas propiedades fluorogénicas de H33258 han conducido al desarrollo de ensayos sensibles para medir las concentraciones de ADNds y, como un ensayo simple, para el recuento de células.

Ha habido mucho interés en la estructura de H33258 unido al ADN. La MU se sujeta en su sitio mediante una combinación de interacciones hidrofóbicas, fuerzas de van der Waals y puentes de hidrógeno mediante los residuos de imidazol. La fuerte unión de H33258 a las ranuras minoritarias puede también proporcionar un mecanismo para aislamiento directo del ADNds. Se prefiere la unión a las ranuras minoritarias de las MU a las secuencias ricas en adenina/timina (A/T) y las constantes de unión a ADN pueden ser órdenes de magnitud mayores que otros agentes de PM pequeño tales como intercalantes. Los agentes fluorogénicos intercalantes también se han explorado extensamente. Un ejemplo de esta clase de agentes de unión a ADN es el bromuro de etidio, que se usa frecuentemente en biología molecular para teñir ADN en geles tras electroforesis. Los pigmentos de metidio se han unido a partículas de sefarosa para proporcionar un producto de aislamiento de ADN. Los pigmentos intercalantes como el metidio no son una unión tan fuerte como la clase de pigmentos de unión a las ranuras minoritarias. El metidio se unió a partículas de sefarosa usando un ligador de espermita catiónica y esto, sin duda, mejoró la unión del ADN. Además, el etidio solo muestra un pequeño incremento en el rendimiento cuántico tras la unión a ADNds. Las propiedades fluorescentes de las partículas de sefarosa-metidio no se describieron.

Los pigmentos intercalantes de tipo cianuro son mucho más fluorogénicos que los intercalantes de etidio. El naranja de tiazol (TO) es un pigmento de cianuro asimétrico compuesto por dos estructuras de anillos aromáticos bicíclicos. Cuando se excitan con luz a 509 nm, estas dos estructuras pueden rotar libremente entre sí y casi no hay fluorescencia. No obstante, en presencia de ADNds, el TO se intercala entre los pares de bases y fuerza a los sistemas de anillo a convertirse en planares. Se forma un sistema aromático extenso que emite una fuerte fluorescencia a 533 nm. El TO no se une tan estrechamente al ADNds como los agentes de unión a ranuras minoritarias, pero dos moléculas de TO se pueden unir para formar fuertes bis-intercalantes de unión.

Se han desarrollado ensayos de unión a ADN sensibles en base a las propiedades fluorogénicas de los pigmentos de tipo cianuro. El TO también muestra un incremento de hasta 3.000 veces de la fluorescencia en presencia de ARN. Esta propiedad es interesante y puede ser aplicable a un dispositivo de aislamiento de ARN.

Estos compuestos fluorogénicos se han unido a oligonucleótidos para crear sondas de ADN que pueden monitorizar la formación de ADNds en ensayos de hibridación. Se han desarrollado varios derivados de H33258 reactivos para

la unión a sondas de ADN. La FIG. 2 muestra varios análogos de H33258 reactivos que se desarrollaron para la unión a ligadores sobre sondas de ADN. Por ejemplo, análogos de bromoacetilo de H33258 se conjugaron a oligonucleótidos modificados con sulfhidrilo. Se han desarrollado ensayos de unión a ADN sensibles en base a las propiedades fluorogénicas de los pigmentos de tipo cianuro. El TO también muestra un incremento de hasta 3.000 veces de la fluorescencia en presencia de ARN. Esta propiedad es interesante y puede ser aplicable a un dispositivo de aislamiento de ARN.

Estos compuestos fluorogénicos se han unido a oligonucleótidos para crear sondas de ADN que pueden monitorizar la formación de ADNds en ensayos de hibridación. Se han desarrollado varios derivados de H33258 reactivos para la unión a sondas de ADN. La FIG. 2 muestra varios análogos de H33258 reactivos que se desarrollaron para la unión a ligadores sobre sondas de ADN. La hibridación a dianas de ADN monocatenario complementario dio una mayor afinidad de unión y un incremento de hasta 23 veces la fluorescencia tras la unión. La mejor eficiencia de unión (Temperatura de fusión del ADN) era específica de la secuencia. Cuando las regiones de A/T se localizaban cerca del punto de unión del ligando, la TF aumentó espectacularmente, lo que indica los fuertes efectos de unión a ADN de H33258. Se puede usar una química sintética similar para preparar análogos reactivos de estos pigmentos fluorogénicos y conjugarlos con las superficies de cristal o de plástico modificadas con amina.

Los conjugados de pigmentos de cianuro de los oligos también dieron la fluorescencia prevista desencadenada por la hibridación tras la adición de hebras complementarias de ADN. La fluorescencia varió con la secuencia terminal del dúplex formado. La unión de TO a los dúplex de ADN se sabe que es específica de secuencia. Los análogos de éster de NHS de pigmentos de cianuro se hicieron reaccionar con oligonucleótidos modificados con amina para dar sondas de ADN que se usaron en ensayos de PCR en "tiempo real" fluorogénicos. Se observó un incremento de 20 veces de la fluorescencia con los conjugados oligonucleotídicos. Las aplicaciones de las sondas de ADN de MGB y de los conjugados oligonucleotídicos fluorogénicos de tipo cianuro se complicaron mediante unión específica de secuencia de los pigmentos. La medición de la unión del ADNds no se debería ver afectada por la especificidad de secuencia de los sitios de unión, ya que el foco son las poblaciones heterogéneas de fragmentos genómicos de ADN.

Los ácidos nucleicos tienen una afinidad muy alta por superficies de cristal en presencia de concentraciones elevadas de soluciones de sales caotrópicas y comercialmente se dispone de una serie de productos de aislamiento de ADN basados en cristal. Estos productos son sencillos de usar pero requieren múltiples etapas de pipeteo, tinos de Eppendorf o placas de 96 pocillos y acceso a equipamientos tales como agitadores vorticiales y centrifugas. Las operaciones tienen lugar en un laboratorio abierto y requieren volúmenes de muestras relativamente grandes para evitar problemas de evaporación de soluciones. Normalmente, las concentraciones de ADN se miden mediante espectrofotómetros de UV-vis y se requiere una buena técnica para obtener resultados reproducibles. No obstante, se ha demostrado el uso de superficies de cristal para aislar ADN de varias muestras biológicas.

Una aplicación precoz de la unión del ADN al cristal fue para el aislamiento de ADN purificado mediante electroforesis de geles de agarosa. La capacidad de unión del ADN de las superficies de cal sodada plana o de cristal de borosilicato fueron comparables: aproximadamente 300 ng de ADN por 800 mm². 800 mm² es aproximadamente el área de superficie de una cámara formada entre un portaobjetos de cristal para microscopio y un cubreobjetos de 20 x 20 mm. La mayoría de las aplicaciones de aislamiento del ADN macrofluidoico usan cristal en polvo de tunos o fibras, dióxido de silicio o los esqueletos de sílice de tierras diatomeas, ya que estos soportes tienen un área de superficie mucho mayor que las superficies planas. Un dispositivo microfluidoico puede usar superficies de cristal plano de unión menor, ya que los volúmenes de las soluciones son más pequeños (sin problemas de evaporación) y la cantidad de ADN capturado requerido para el análisis genómico basado en PCR es muy pequeña. El cristal plano está disponible en varias composiciones, tamaños y asperezas y también puede grabarse si se necesita más superficie.

El análisis en fase de solución del ARNm o el ADN se puede conseguir durante la PCR usando sondas oligonucleotídicas de ADN portadoras de grupos indicadores fluorescentes en un extremo y una molécula inactivadora fluorescente en el otro. En un formato (el ensayo TaqMan), las sondas son oligos monocatenarios cortos que han sido digeridos por la actividad 3'-exonucleasa de la Taq polimerasa. El otro formato fluorogénico (ensayo de Molecular Beacon) usan oligos con forma de horquilla con moléculas adyacentes de flúor e inactivadoras en el tronco. Las horquillas se abren en presencia de hebras de ADN complementarias para dar una señal fluorescente. Cada uno de estos formatos fluorogénicos se puede usar para monitorizar el progreso de la PCR, ya que cada ciclo de amplificación con éxito proporciona un incremento en la señal fluorescente. Estos dos formatos basados en PCR son ideales para las plataformas basadas en microfluidoicos, ya que el límite inferior del tamaño del ensayo solo viene dictado por problemas de manipulación (secado de volúmenes pequeños) y resolución de los instrumentos disponibles. Un fluorímetro de ciclado térmico (de alto rendimiento) popular es el ABI7900HT, que puede analizar placas de 384 pocillos, con 10 µl por pocillo para cada gen que se mide durante la PCR. Se recomiendan 10 pg – 10 ng de ADN genómico por pocillo en función de la eficiencia del sistema de PCR y la calidad del ADN.

Los portaobjetos de cristal para microscopio son un sustrajo adecuado para las micromatrices de ADN. Se dispone de muchos formatos de ensayo en micromatriz y comparten la capacidad para permitir la interrogación simultánea de un gran número de dianas genéticas a partir de una única muestra. Las matrices de oligonucleótidos sintéticos se han sintetizado directamente de soportes de cristal o se han preparado mediante unión de punto final de sondas sintéticas modificadas. El cristal modificado con amina es un sustrato popular para la unión de punto final. El gamma aminopropil silano (GAPS) es un reactivo volátil que se puede usar para funcionalizar las superficies de cristal y hay varios fabricantes de portaobjetos de GAPS. La superficie recubierta con amina de los portaobjetos de GAPS se puede activar usando ligadores bifuncionales para crear una superficie electrofílica que reacciona con soluciones de oligos modificados con amina. Se pueden usar variaciones de esta química de conjugación para unir los pigmentos de unión a ADN fluorogénicos.

La densidad de la unión de los oligonucleótidos es un factor importante en el rendimiento de la hibridación. Se pueden alcanzar densidades altas de oligos mediante síntesis directa del cristal, pero se ha demostrado que la hibridación de las dianas de ADN marcado en realidad disminuyó cuando las sondas de captura estaban demasiado fuertemente empaquetadas. El rendimiento de la hibridación también mejoró cuando la longitud del ligador entre el punto de unión del cristal y la secuencia de oligonucleótidos se alargó. Los ligadores de polietilenglicol (PEG) de hasta 80 átomos de longitud continuaron mejorando la señal de hibridación. Esto muestra la importancia de los ligadores largos entre el soporte sólido y la sonda de ADN con el fin de imitar el rendimiento de fase.

La unión de las sondas de ADN a las superficies de cristal a través de ligadores de polietilenglicol mejoró el rendimiento. Comercialmente se dispone de ligadores macromoleculares de PEG con varios grupos funcionales (Quanta, Biotec, Powell, Ohio) y se han usado principalmente para unir los fármacos proteicos para mejorar las propiedades farmacocinéticas. Otras estructuras macromoleculares se han usado para mejorar el rendimiento de las sondas de ADN inmovilizadas. Por ejemplo, se han unido balizas moleculares modificadas con biotina a soportes de cristal recubiertos con avidina para usar en análisis de ADN específico de secuencia. El uso de avidina o estreptavidina como espaciadores para alejar el ADN de la superficie de cristal es probablemente importante para la función de las sondas. Otro tipo de ligadores macromoleculares a considerar son los polímeros dendriméricos. Estas moléculas disponibles comercialmente (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) se sintetizan en capas alternas de grupos amino y grupos carboxilato en función de la "generación" de síntesis. Las estructuras tridimensionales de estas moléculas están bien controladas y las propiedades se entienden bien. Las estructuras dendriméricas ricas en amina son análogas a las proteínas histonas que son cruciales para el empaquetamiento del ADN en las células. Se han usado con éxito para la transfección de secuencias de ADN en células para las posibles aplicaciones en terapia génica. Se cree que los ligadores dendriméricos proporcionarán armazones excelentes para presentar moléculas de MB inmovilizadas en soluciones ricas en ADN. Las películas biosensoras que contienen ligadores dendriméricos y moléculas de detección de ADN fluorogénico (Sytox 13, Molecular Probes) se usaron para medir los niveles de bacterias vivas en superficies de plástico. Estos materiales no contenían un enlace covalente entre el ligador, el pigmento fluorogénico o la superficie de plástico, pero se mantenían juntas por fuerzas hidrófobas.

La tecnología de micromatrices de ADN proporciona ensayos miniaturizados que se benefician del procesamiento de microfluidos encerrados. Por ejemplo, un amplificador químico de micromáquinas accionado con un flujo continuo demostró una amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de un fragmento de 176 pares de bases de 20 ciclos. Se ha demostrado la amplificación por PCR de dianas de ADN genómico de glóbulos blancos capturados tras un dique en la cámara de flujo a partir de sangre entera en microchips de silicio-cristal. Se ha desarrollado un procedimiento en matriz de densidad moderada usando matrices en circuitos de ADN para secuenciación diagnóstica de productos de PCR con el fin de reducir sus costes y su complejidad durante el uso. Los aislados clínicos resistentes a antibióticos se detectaron visualmente en un plazo de una hora tras la amplificación por PCR. Otra aplicación es la identificación a base de secuencias de ADN de plantas medicinales tóxicas usadas en la medicina tradicional china. En 2001, Petrik revisó el uso de dispositivos de micromatrices desarrollados inicialmente para proyectos genómicos para detección selectiva en masa de donaciones de sangre para el virus de la hepatitis C. Se consiguió un sistema integrado para análisis por PCR combinando elementos termoeléctricos duales de Peltier con separación por tamaño en electroforesis y detección en un microchip. Usando un esquema de inyección de concentración de ADN se pudo detectar productos de PCR en tan solo diez ciclos térmicos. Se desarrolló un cartucho microfluídico para preparar esporas para análisis mediante PCR por sonicación, adición de reactivo para PCR a las esporas rotas e introducción de la mezcla en un tubo de PCR. El procesamiento y detección del ADN de la spora se completó en 20 minutos. Se ha desarrollado un dispositivo microfluídico integrado que combina amplificación por PCR estocástica de una única molécula molde de ADN seguido de análisis electroforético capilar de los productos. Un histograma de las áreas pico normalizadas de repetidos análisis de PCR reveló la cuantificación debido a copias sencillas viables de la molécula molde en el reactor. Se desarrolló un circuito microfluídico para detectar ARN amplificado mediante amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico (NASBA). Se detectaron muestras de *Cryptosporidium parvum* y eran claramente distinguibles de los controles sin separar el ARN amplificado de la mezcla NASBA. Se ha desarrollado un sistema microfluídico automático para análisis de ADN en nanolitros directamente de las células del carrillo, incluidas todas las etapas necesarias para analizar el ADN; inyección, mezclado, lisis, PCR, separación, determinación del tamaño y detección. Se estableció la posibilidad de una miniaturización adicional del sistema. Se ha desarrollado un sistema a base de circuitos microfluídico integrado para las pruebas de control de calidad de un producto de terapia génica o adenoviral. Los tamaños del análisis de identidad viral determinan el tamaño y cuantifica los fragmentos de ADN y requiere 100

veces menos la muestra que el procedimiento en gel de agarosa.

Si se desea desarrollar un dispositivo de aislamiento de ADN que procesará un volumen pequeño de sangre humana (< 20 μ l-9 y liberar muestras de ADN genómico estandarizadas para análisis genético. Se puede desarrollar una tarjeta de microfluídicos de un solo uso que se puede insertar en un instrumento dirigido por una microbomba que controla el flujo de fluido a través de varias cámaras de procesamiento del ADN. El ADN inmovilizado y cuantificado se libera en solución para su uso inmediato o se almacena para análisis futuros. La capacidad para medir la captura y liberación del ADN inmovilizado en el dispositivo por fluorescencia permitirá el control interno del procedimiento de este nuevo sistema de procesamiento de ADN. La tecnología se puede desarrollar en un producto autónomo para uso general en investigación de biología molecular o se puede incorporar en dispositivos más sofisticados para simplificar el análisis genético para aplicaciones biomédicas. Las soluciones normalizadas de ADN purificado y desnaturalizado que se aíslan con el dispositivo de un solo pocillo desarrollado se pueden distribuir mediante canales microfluídicos a varios formatos de placas con micropocillos para análisis genético mediante PCR en tiempo real o micromatrices de ADN. En la FIG. 3 se pretende mostrar la física a microescala necesaria para desarrollar dispositivos biomédicos miniaturizados que se pueden usar para el aislamiento del ADN genómico de las células.

En la FIG. 3 se muestra la interacción entre la sangre entera y otro fluido que fluye dentro de los canales de un dispositivo microfluídico en el que se prevé aislar el ADN de la sangre entera. Se prevé que la física de microescala usada en el desarrollo de dispositivos médicos miniaturizados se pueda usar para aislar ADN genómico de las células. En referencia ahora a la FIG. 3, en una primera corriente 50 que contiene partículas pequeñas 52 en sangre entera 54 y una segunda corriente 56 que contiene partículas pequeñas 58 en una solución transparente 60 se introducen en un canal común 62, en el que forman una interfaz de difusión laminar (IDFL). En función de su coeficiente de difusión, las partículas 52, 58 comienzan a difundirse a través de la IDFL, difundiendo las partículas más pequeñas 58 con mayor rapidez. El dispositivo se puede usar para extraer partículas pequeñas de sangre entera o para introducir un reactivo en la sangre entera de un modo continuo predecible.

Una observación preliminar de estudios de pigmentos de Hoechst también es pertinente a esta aplicación. Una gota de pigmento de Hoechst en soluciones de agua o tampón muestra un incremento de la fluorescencia a medida que se seca la mancha. Esto se refiere al "contenido de hidratación" del ambiente de flúor y los efectos sobre el fondo fluorescente. El flúor debe estar bien hidratado para un fondo bajo y destaca la importancia de los recubrimientos de superficie hidrofílicos.

El foco inicial será la síntesis y el análisis de soportes sólidos fluorogénicos para la unión y medición del ADNds. Las MU fluorogénicas con grupos funcionales reactivos de amina se prepararán primero usando variaciones de procedimientos conocidos. Estos agentes se inmovilizarán en plástico o cristal modificado con amina y la fluorescencia se medirá antes y después del tratamiento con ADN. Se evaluarán varias estructuras de ligadores con respecto a su capacidad para medir la fluorescencia frente a la concentración de ADN. Las superficies fluorogénicas con MU unidas se someterán a ingeniería para proporcionar un bajo fondo fluorescente y una buena unión del ADN. En la FIG. 4 se muestran ilustraciones de superficies típicas que se van a estudiar. Se explorarán variables tales como soporte sólido (cristal o plástico), química de unión y grupos de terminación. Se examinará la estequiometría (densidad de la unión) de las MU fluorogénicas para determinar la superficie con el mejor intervalo dinámico para la medición del ADN. La capacidad de unión al ADN también se examinará.

En referencia ahora a la FIG. 4, el dispositivo 100 tiene una superficie modificada con amina 102 con ligadores a ranuras minoritarias fijados (MU) 104. Las aminas que no reaccionan se pueden dejar para proporcionar una superficie catiónica. El dispositivo 110 muestra que las aminas que no reaccionan se pueden tapar mediante succinilación para proporcionar una superficie aniónica 112. El dispositivo 120 muestra que las MU 104 se pueden extender en solución fijando primero un ligador que contiene una amina polimérica (dendrimeros de explosión, diamino-PEG, poli-L-lisina) a la superficie 122 y reaccionando después con derivados de las MU. Junto Con el desarrollo de las superficies fluorogénicas requeridas se prevé un dispositivo microfluídico para aislamiento de ADN. Se obtendrán muestras de ADN de varios tamaños (Sigma) y se determinará la eficiencia de la captura mediante medición de la fluorescencia en fase sólida y en fase de solución usando los mismos compuestos fluorogénicos. La liberación del ADN del dispositivo se monitorizará para garantizar que la pureza y la recuperación del ADN son buenos. Las condiciones para la captura y liberación del ADN se medirán en un lector de placas de fluorescencia. Una vez ejecutados los experimentos de capacidad de unión al ADN y de lavado se puede construir un dispositivo microfluídico. Una vez desarrollados los soportes fluorogénicos se pueden combinar las funciones de captura y medición de ADN del dispositivo.

Dado que se dispone de varios soportes sólidos de amina modificada se pueden preparar los derivados con grupos funcionales electrófilos activos, tales como grupos de yodoacetato, grupos de cloruro cianúrico, grupos de éster de NHS y otros restos amina reactivos. Estos son dos abordajes sintéticos que se ha demostrado que proporcionan análogos de H33258 con las "asas" electrófilas o nucleófilas deseadas que pueden reaccionar con grupos funcionales complementarios sobre el soporte sólido. La vía más directa es desde el sistema de anillo heterocíclico completamente ensamblado de H33258. Se ha demostrado que la reacción de un derivado de bromoalquilo de PEG reacciona con H33258 en condiciones básicas para dar el éter de arilo con un elevado rendimiento. H33258 está disponible en Aldrich Chemical Co. (500 mg = \$220,80). El ligador de hexilamina protegida con t-butoxicarbonilo se sintetiza fácilmente y se ha elaborado un derivado de tosilato. El derivado de bromo será fácilmente accesible y se

hará reaccionar con H33258, como se muestra en la FIG. 5. En referencia ahora a la FIG. 5, Hoechst 33258 se trata con un derivado de Boc de alquilación. El grupo aminoalquilo nucleofílico (R=H) se puede inmovilizar directamente en las superficies electrofílicas. Como alternativa, el grupo amino se puede convertir en un grupo electrófilo, tal como el derivado de cloruro cianúrico, como se muestra en la FIG. 5, para inmovilizar las superficies nucleofílicas. El Boc se elimina mediante tratamiento con ácido diluido y después se neutraliza con base para dar el grupo hexilamina principal (R = H). La amina primaria nucleofílica puede reaccionar de forma selectiva con electrófilos en solución con poca competencia de alquilación mediante la amina terciaria. Esta química debería ser aplicable a la modificación de superficies sólidas que están recubiertas con grupos funcionales electrofílicos. Como alternativa, se puede hacer reaccionar al análogo de hexilamina H33258 con un ligador bifuncional que deja un residuo electrofílico. El cloruro cianúrico se comporta como un ligador bifuncional para unirse a grupos funcionales que contienen amina, El tercer grupo de cloro restante no reacciona después de la unión de los dos grupos amino. Esta química de conjugación se puede usar después para la síntesis de superficies modificadas. Otra alternativa es unir el H33258 catiónico a superficies aniónicas, como las formadas por los grupos de ácido carboxílico. Estas superficies pueden ser adecuadamente estables y flexibles para permitir la respuesta fluorogénica deseada con ADN.

Como la mayoría de las químicas de fase sólida, un gran exceso de reactivo (con respecto a los grupos de superficie disponibles) se puede conseguir con facilidad y las superficies se lavan fácilmente para eliminar el exceso de reactivo. Por tanto, las eficiencias de acoplamiento pueden ser bastante altas (se puede conseguir un empaquetamiento denso). El área de superficie de los sustratos de cristal y de plástico, la química de inmovilización, el tipo de ligador y la densidad de los compuestos fluorogénicos "que se pueden unir" (fluoros) se optimizará. Los ligadores dendríméricos disponibles comercialmente, poli-L-lisina y polietilenglicol diaminas deberán colocar los fluoros lejos de la superficie y hacia el ADNds en solución. El objetivo es maximizar la flexibilidad conformacional de los fluoros inmovilizados (para minimizar el fondo) y maximizar la accesibilidad al ADNds (para maximizar la unión y la cinética del ADN).

Los soportes de cristal y de plástico modificados con amina están disponibles en portaobjetos para microscopio de 2,54 x 7,62 cm (1 x 3 pulgadas) y son un sustrato habitual para las micromatrices de ADN. La mayoría de los portaobjetos de cristal están hechos de cristal de cal sodada (Erie Scientific, Portsmouth, NH) y están modificados con grupos aminopropilsilano (γ) para dar una densidad uniforme de las aminas primarias. Los portaobjetos GAPS también están disponibles con otros tipos de cristal (Corning Glass) o con mayor rugosidad (Erie). Los portaobjetos recubiertos con aminopropilo también están disponible (Nunc, Dinamarca) para usar. Las películas de poliéster (Mylar) funcionalizadas con aminas también están disponibles como láminas (Diagnostic Laminations Engineering, Oceanside, CA or Adhesive Research, Inc., Glen Rock, PA) y también se examinarán. Estos sustratos se usarán directamente para inmovilización de los análogos electrofílicos de las MU y se "activarán" con ligadores bifuncionales para dar una superficie electrofílica. La FIG. 6 muestra un posible sistema de química de conjugación. La activación del cloruro cianúrico se deberá examina, así como otros ligadores bifuncionales alifáticos (Pierce Chemical Co.). Los portaobjetos de cristal se pueden activar en disolventes orgánicos anhidros con electrófilos hidrofóbicos tales como cloruro cianúrico para evitar la hidrólisis de reactivos y conseguir densidades más altas de modificación electrofílica. Por tanto, se puede esperar una elevada carga de aminas PEG (o de otras poliaminas). Primero se intentará el acoplamiento directo de electrófilos fluorogénicos de MU (por ejemplo, el cianurato de la FIG. 5) y esta superficie fluorogénica (sin ligador) deberá caracterizarse y usarse como control para estudios de fluorescencia de las diversas superficies.

Los portaobjetos de plástico requieren condiciones de activación más suaves y acoplamiento de carbodiimida o el uso de ligadores éster activados. Comercialmente están disponibles macromoléculas de PEG que contienen ésteres de NHS en cada extremo. Los dendrímeros de policarboxilato disponibles comercialmente se pueden acoplar posiblemente a soportes que contienen amina usando química de carbodiimida (EDC) hidrosoluble. Los dendrímeros hidrofílicos PAMAM de generación 3.5 y 4.5 de son particularmente atractivos, ya que estas moléculas tienen 64 y 128 carboxilatos en superficie, respectivamente. Estas moléculas no exhiben la densa "explosión" que afecta a los dendrímeros grandes. Tras bloquear las aminas residuales sobre la superficie (con anhídrido acético), los carboxilatos del ligador se pueden activar de nuevo con EDC y acoplar a las MU que contienen hexilamina, como se puede ver en la FIG. 5. Tras un exhaustivo lavado, la cantidad de MU unida covalentemente al portaobjetos se mide mediante la absorbancia sobre el lector de placas. El cromóforo Hoechst 33258 absorbe a 356 nm y el lector de placas Bio-Tek se puede fijar con filtros adecuados para medir esta longitud de onda directamente sobre portaobjetos para microscopio. Los portaobjetos se pueden secar y evaluar para futuros usos. La estabilidad de las monocapas de los pigmentos fluorescentes sobre las superficies (condiciones de almacenamiento) deberá investigarse.

Las estructuras de ligador macromolecular actuarán como armazones para mostrar los sensores de las MU fluorogénicas al ADNds en solución. Las propiedades fluorescentes de las estructuras de la superficie se examinarán en presencia y ausencia de ADNds. Es importante que las superficies estén completamente hidratadas cuando se evalúen las propiedades de unión al ADN fluorogénicas, ya que se sabe que los derivados de H33258 brillan cuando se secan en cristal. Los tiempos de equilibrio son más rápidos en un entorno microfluidico, lo que puede ser una ventaja. El fondo fluorescente de las diversas estructuras de ligador se medirá primero uniendo una "cámara de perfusión" a la superficie del portaobjetos de interés. Estas son simples cestas de caucho que se adhieren a los portaobjetos, después se cubren con un cubreobjetos que tiene un puerto de entrada y un puerto de salida. Una vez

construida la cámara, se introduce mediante pipeteo la solución de analitos de interés y se pueden sellar los puertos. Se usará un tamaño de cámara de 200 µl de tamaño.

5 Se obtendrán muestras de ADN de varios tamaños de una fuente externa (Sigma Chemical Co.). Es probable que el ADN genómico tenga que fragmentarse para evitar marañas a medida que pasa por los microcanales en las condiciones de flujo suave usadas en el dispositivo microfluídico. La fragmentación del ADN genómico se consigue fácilmente pasando la solución varias veces a través de una aguja de 18 gauge. También se considerarán patrones de PM de varias longitudes (40 kb, 4000 pb, 400 pb y 40 pb). En primer lugar se añadirá tampón neutro sobre el sustrato fluorogénico de interés y se mide el fondo fluorescente (a 458 nm y 492 nm) en el tiempo sobre el lector de placas (excitación = 356 nm). Se conseguirán medidas de fondo estables cuando el recubrimiento con la MU se hidrate completamente. Después se introducirán varias concentraciones de ADNds (medidas mediante A_{260} , 50ug/ml de ADNds = 1 unidad de DO) en la cámara de perfusión, garantizando el lavado completo de la cámara entre lecturas. La fluorescencia a 458 nm (característica de la unión al ADNds) deberá aumentar de un modo lineal a medida que la concentración de ADN aumenta. Es probable que la densidad de la MU esté relacionada con el intervalo dinámico de la medición, lo que debe considerarse. Como se ha descrito anteriormente, la densidad del empaquetamiento de las MU se determina a partir de la A_{356} del sustrato. El dispositivo microfluídico manipulará soluciones de ADN altamente concentradas y, por tanto, el umbral es una concentración "umbral" de ADN para la fluorescencia. Si la concentración de ADN está por debajo del umbral de fluorescencia, se proseguirá con el procedimiento de aislamiento. Asimismo, si la señal de fluorescencia está por encima del umbral, se ha alcanzado al concentración de ADN mínima requerida. Obsérvese que la detección de ADN usando soportes de cristal fluorogénicos se examinará en concentraciones salinas fisiológicas en las que la unión de ADN por el cristal debería ser mínima.

25 Junto con el desarrollo de superficies fluorogénicas, se deben examinar los parámetros requeridos para una inmovilización eficiente y la liberación de ADNds del cristal usando volúmenes pequeños de soluciones. La liberación de ADNds en volúmenes pequeños de tampón se optimizará mediante modelado matemático. Las etapas de procesamiento en la unión del ADN al cristal depende de la naturaleza de la muestra biológica y existen muchas variaciones en los procedimientos. Las etapas descritas más adelante se procesaron para fuentes ricas en ADN y partículas de sílice. Primero se lisan las células añadiendo una solución 2M de tiocianato de guanidinio ((GuSCN) como tampón (pH 6,4). Esta solución salina caotrópica también elimina las proteínas histonas del ADN genómico, inactiva las nucleadas y dirige la formación del complejo ADN-sílice. El complejo ADN-sílice inmovilizado se agita en vórtex y se centrifuga (esto probablemente fragmente las hebras largas de ADN) y los residuos celulares se lavan con más tapón GuSCN. Por último, el ADN-sílice se seca y el ADN purificado se eluye en un tampón con niveles bajos de sal y se mide mediante absorbancia a 260 nm. Aunque el procedimiento es sencillo, estas etapas requieren trabajo y mano de obra humana para garantizar que las partículas de sílice son homogéneas tras la agitación en vórtex. Un formato de microfluídico deberá reestructurar el procedimiento como se describe en la Tabla A a continuación:

TABLA A

1. lisan las células, eliminar las histonas y unir el ADN al cristal con niveles elevados de GuSCN
 2. lavar el cristal unido a ADN con niveles elevados de GuSCN
 3. liberar el ADN unido del cristal con sal fisiológica
 4. leer la concentración del ADN liberado en la cámara con sustrato fluorogénico
 5. liberar el ADN del sustrato fluorogénico y formular para usar en ensayos basados en PCR
- 40 Para evaluar la capacidad de unión al ADN de los sustratos de cristal (portaobjetos de microscopio) solo se examinarán las etapas 2, 3, 4 y 5. Las etapas de procesamiento se pueden ejecutar en cámaras de perfusión con cubreobjetos de cristal. La mezcla de varios tamaños y concentraciones de ADN con niveles altos de GuSCN es crucial para la unión al ADN. El objetivo es aproximar la capacidad de unión del ADN publicada de 300 ng entre las superficies de cristal de un portaobjetos y un cubreobjetos. Tras la unión se drena la cámara del contenido alto en GuSCN y se llena con sal fisiológica. Después de alcanzar el equilibrio, el ADN unido deberá estar libre en solución y se recogerá de la cámara. Tras la liberación se mide un alícuota del ADN concentrado usando el procedimiento fluorogénico publicado con H33258. Dado que el ADN se usará en última instancia para los ensayos basados en PCR, los tampones de elución serán consistentes con esta aplicación.
- 50 La capacidad de unión al ADN de los sustratos de MU fluorogénicas también se examinará. Se usará el mismo sistema de la cámara de perfusión para examinar diversas concentraciones de ADN. La capacidad de unión se examinará usando diversos tampones que se encontrarían en el último dispositivo. De interés concreto es la condición liberada de ADNds de los sustratos recubiertos con MU. Es probable que los dúplex de ADN unido tengan que desnaturalizarse para ser liberado de los sustratos, ya que este es el caso con las perlas de captura de ADN con metidio. Se usaron soluciones de NaOH diluidas en este caso y, por último, las soluciones de ADN desnaturalizado se neutralizaron con acetato amónico. Como alternativa se puede usar calor o solución salina a niveles muy bajos para desnaturalizar el ADN.

Los datos de unión y liberación producidos se usarán como la base para el modelo de multifísica que guiará el diseño del dispositivo microfluídico. Este modelo calculará la unión, difusión, advección a la superficie y las concentraciones locales resultantes de sal y ADN basadas en la geometría del prototipo, las propiedades del disolvente y el soluto, y el comportamiento de unión caracterizado por los datos generados. El diseño del dispositivo con el mejor rendimiento previsto pasará a ser el diseño del prototipo deseado. El rendimiento global se comparará con las predicciones del modelo, que proporcionarán información de la física local en el interior del dispositivo que no se puede obtener experimentalmente.

En función de las propiedades de las diversas superficies son factibles varios diseños, como se puede observar en la FIG. 7. Por ejemplo, puede ser que un soporte de MU fluorogénica 150 pueda servir para un propósito doble para unión a ADN y medición análoga al uso de partículas de metidio. Las superficies de cristal pueden tener mayor capacidad de unión y un diseño de una sola cámara 152 podrá combinar una superficie de captura de cristal con una superficie de MU fluorogénica para la medición del ADN. Puede ser que se requieran condiciones diferentes para la unión y medición del ADN y un dispositivo 154 que use dos cámaras será el mejor diseño. Los cálculos preliminares sugieren que un diseño de una sola cámara con unión de ADN sobre una superficie de cristal y medición de las MU sobre una superficie opuesta de plástico, como se ilustra en la FIG. 8, será capaz de capturar y medir 84 mg de ADN, incluso con una superficie de cristal lisa (una superficie de cristal áspera podría unir significativamente más ADN).

La FIG. 8 muestra un dispositivo microfluídico de 62 por 40 por 3.55 mm que contiene una cámara de unión a ADN de 5 μ l, un canal de residuos de 750 μ l y un canal de 25 μ l para retener el ADN liberado al final del procedimiento. Los fluidos se insertan mediante pipeta a través de un puerto de inyección. El fluido procede hacia el canal de residuos o el canal de ADN liberado dependiendo de si está abierto el orificio de residuos o un puerto de salida. El ADN liberado se puede eliminar de la tarjeta mediante pipeta desde un orificio para producto o un puerto de salida. La FIG. 9 muestra la vista en despiece ordenado de las 4 capas de laminado que constituyen el dispositivo. La capa 180 está compuesta por vinilo de 0,125 mm; la capa 182 es una capa adhesiva de 0,025 mm; la capa 184 es PPMA de 3,175 mm; la capa 186 es ACA de 0,100 mm; la capa 188 es vinilo de 0,125 mm y la capa 190 consta de una inserción deslizable de cobertura de Pyrex que encaja en la capa 180. Cada capa contiene 3 orificios de registro a efectos de alineación. Las capas 182 y 186 contienen adhesivo que mantiene las capas del dispositivo juntas a prueba de fugas.

Las etapas de procesamiento de la Tabla A se ilustran secuencialmente en las FIGS. 10A-E. La FIG. 10A muestra el dispositivo microfluídico tras la inyección con pipeta de una mezcla de ADN niveles altos de GuSCN que contienen células de muestras lisadas. Después de lavar con niveles altos de GmSCN pasado a través de un canal de unión hasta el canal de residuos, la cámara se aclara con sal fisiológica, el ADN liberado del cristal mediante sal se fija a las MU de brillan de un modo tal que se puede leer la concentración de ADNds. Por último, el agua desionizada (DI) se pipetea a través del canal de unión para desnaturar el ADN y llevarlo al canal de ADN liberado para la distribución final del purificado desde la cámara, como se muestra en la FIG. 10E. En este punto se puede abrir un orificio para recuperar el ADN. El dispositivo es lo bastante pequeño como para que encaje fácilmente en un lector de placas de 96 pocillos y se diseña de un modo tal que las localizaciones centrales de 6 pocillos están dentro del canal de unión para múltiples lecturas precisas de la concentración de ADN. Al final del proceso, los grupos de las MU fluorogénicas inmovilizadas (probablemente ahora no fluorescentes) se dejarán sobre el soporte sólido y se desecharán con el resto del dispositivo en los residuos de laboratorio.

Ejemplos

Se ejecutó la síntesis del pigmento de Hoechst fluorogénico con una hexilamina unida. En referencia ahora a la FIG. 11 se muestra la síntesis. A menos que se mencione lo contrario, los reactivos se obtuvieron de Sigma-Adrich. Se obtuvieron disolventes anhidros en frascos de cierre hermético. Se cortaron tiras de TLC de 7 cm de longitud de láminas de aluminio recubiertas con sílice de 5 x 7 cm (Merck) y generalmente se visualizaron mediante fluorescencia usando una lámpara UV manual de longitud de onda larga para irradiar. La movilidad de la mancha fluorescente respecto al frente del disolvente (R_f) se midió para el ensayo de TLC. El patrón de Hoechst 33258 (bisbencimida, BB-OH) usado para los ensayos de unión a ADN fluorescente se obtuvo en un kit de cuantificación de ADN comercializado por Sigma. El kit contiene bisbencimida (10 mg/ml en agua), 10 x de tampón de ensayo fluorescente (10 x de FAB= Tris HCl 100 mM, EDTA 10 nM, NaCl 2M, pH 7,4) y un patrón de ADN (ADN de timo de ternero fragmentado, 1 mg/ml en 1 x FAB). Este kit se usó como patrón para la medición de la determinación fluorogénica de ADN mostrada en la FIG. 12.

El material de partida de aminohexanol protegido con butiloxicarbonilo (Boc) se adquirió de Sigma y 500 mg se convirtieron en el bromuro de alquilo deseado de acuerdo con un procedimiento publicado (Keller y Haner, Helv. Chim. Acta, 76 (1993) 884-892). El producto se aisló mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice para dar 292 mg (rendimiento del 45 %) del producto en forma de un líquido amarillo claro. La separación del producto deseado de otros contaminantes se vio dificultada por una falta de un buen indicador de TLC para el bromuro de alquilo. La tinción en una cámara de todo funcionó con mala sensibilidad. TLC (2:1 hexanos/etilacetato): R_f de de ROH= 0,17, R_f de RB= 0,67.

El pigmento Hoechst 33258 (bisbencimida, BB-OH) se adquirió en Aldrich como una sal de trihidrocloruro (pentahidrato). 9,5 mg del pigmento (15,2 μ moles) se disolvieron en 5 ml de DMF seco en un matraz de fondo redondo seco de 15 ml. 36,5 mg (265 μ moles) de carbonato potásico y 7,1 μ l (8,5 mg, 30,4 μ moles) del la bromohexilamina protegida con Boc. La mezcla se agitó magnéticamente a 53 grados durante 6 horas y a temperatura ambiente durante 2 días. La TLC (metanol al 10 %, etildiisopropilamina al 5 %, diclorometano al 85 %) mostró una mezcla de manchas fluorescentes azules cuando se irradió con una lámpara de UV de longitud de onda larga (365 nm). El BB-OH de partida ($R_f = 0$) se convirtió en el producto deseado ($R_f = 0,3$) y un producto lateral de mayor movilidad ($R_f = 0,5$). La solución en DMF del sobrenadante se decantó y el carbonato potásico residual se lavó con 2 ml adicionales de DMF. La mezcla combinada se concentró mediante evaporación rotatoria al vacío. El residuo se disolvió en 2 ml de metanol al 5 %, etildiisopropilamina al 5 %, diclorometanol al 90 % y se aplicó a una columna en gel de sílice de 2 x 10 cm (230-400 mesh) empaquetada con en el mismo disolvente. Después de desechar los primeros 50 ml se recogió el producto lateral de mayor movilidad en -75 ml. El progreso de la cromatografía se pudo seguir usando una lámpara UV manual. El % de metanol en el eluyente se incrementó hasta un 10 % y el producto deseado se aisló en 90 ml de disolvente. La eliminación del disolvente en el evaporador rotatorio dio 10,5 mg de sólido amarillo (rendimiento teórico= 9,5 mg). El producto fue una banda fluorescente azul principal mediante TLC con únicamente restos de los otros contaminantes fluorescentes. El producto se disolvió en 2 ml de deuterocloroformo para RMN futuras. Una porción de 1 ml de la solución de $CDCl_3$ se desprotegió como se describe más adelante.

A 5 mg de BB-NHBoc en 1 ml de $CDCl_3$ se añadió ácido trifluoroacético (1 ml) desde una ampolla de cristal sellada. La solución homogénea se guardó en un vial de cristal de Dram 1. Tras la desprotección se realizó TLC (metanol al 35 %, etildiisopropilamina al 5 %, diclorometano al 60 %). El BB-NHBoc de partida ($R_f = 0,7$) se convirtió en una sal de menor movilidad ($R_f = 0,5$) que se desprotegió lentamente hasta un producto de movilidad menor ($R_f = 0$). Tras 24 horas, un alícuota de 100 μ l de la mezcla de reacción se convirtió en la base libre eliminando el exceso de TFA en el evaporador rotatorio, redisolviendo en metanol y añadiendo una cantidad pequeña de carbonato potásico. La forma en base libre de BB-NH₂ obtenida a temperatura ambiente mostró una única banda fluorescente principal ($R_f = 0,07$) y un resto de contaminantes fluorescentes. La mayor parte de la mezcla de reacción se convirtió en la base libre como se ha descrito anteriormente y se disolvió en 2 ml de metanol:cloroformo 2:1). El producto no se pesó ((-1,7 mg/ml), pero se calculó en rendimiento por comparación con la absorbancia UV del pigmento bisbencimida (BB-OH) de partida.

Los espectros UV-vis de una solución de 10 μ M de BB-OH en 1 x FAB tenían un máximo de absorbancia a 340 nm (0,18 unidades). Se preparó una solución de BB-NH₂ disolviendo 4,3 μ l de la solución de ~1,7 mg/ml en 995,7 μ l de 1x FAB. El máximo de absorbancia fue a 342 nm (0,075 unidades). Se asumió que BB-OH y BB-NH₂ tenían el mismo coeficiente de extinción y se calculó la concentración de la muestra UV-vis de BB-NH₂ (10 μ Mx (0,075/0,18) = 4,4 μ M). Esto da una concentración medida de la solución de -1,7 mg/ml de 0,7 mg/ml (0,98 mM). El rendimiento de BB-NH₂ (2,1 mg, 2,9 μ moles) corresponde a 38 % de rendimiento del BB-OH de partida. Este ensayo es más preciso para la determinación del rendimiento que pesar cantidades pequeñas ya que la presencia de sales y ácido trifluoroacético invisible (mediante RMN) podía añadir errores.

La fluorescencia de la molécula de BB-OH indicada en 220 en la FIG. 12 cambia desde una emisión débil a 492 nm a una emisión fuerte a 458 nm en presencia de ADNds. El kit de cuantificación de ADN de Sigma (basado en BB-OH) se usó para generar una curva estándar en un lector de placas de fluorescencia Bio-Tek FL600. El ensayo se realizó en placas de fondo transparente de 96 pocillos de acuerdo con el protocolo suministrado. Se usó una concentración de BB-OH de 0,1 μ g/ml como tampón indicador para cada patrón de ADN (20 – 1.000 ng/ml). Los resultados se muestran en la FIG. 12.

La FIG. 12 muestra que BB-NH₂, indicado en 222, ha retenido las propiedades de detección de ADN fluorogénico del pigmento bisbencimida. La modificación del fenol en la molécula de Hoechst 33258 no alteró la absorbancia de UV-vis ($\lambda_{\text{máx}} \sim 340$ nm) y el análogo modificado con hexilamina da una fuerte señal fluorescente (Detección a 460 nm, anchura de la hendidura del filtro 40 nm). El ligador de hexilamina mejora la fluorescencia específica del ADN, quizá por la mayor afinidad por el ADN con la amina primaria catiónica. La molécula de BB-NH₂ tiene grupos amino catiónicos en cada extremo de la estructura planar de la bisbencimida, de modo que lo ancla en el ligador de ranura minoritaria del ADN. Se ha demostrado que otros agentes de afinidad por el ADN (como oligonucleótidos) funcionan como sondas fluorogénicas en solución.

Se consideraron varias sustancias químicas de inmovilización para la preparación de superficies de MU. Tres componentes mayoritarios en el diseño de las superficies de detección de ADNds son:

1. Indicador, sólo es fluorescente en presencia de ADNds; el ligador se une a las moléculas espaciadoras con poco fondo fluorescente
2. Sustrato. Transparente en las regiones de interés del espectro; se recubre fácilmente con moléculas espaciadoras/indicadoras.
3. Espaciador, conjugado fácilmente al indicador fluorogénico y el sustrato; permite el acceso de la MU fluorogénica al ADNds son hidrancia estérica.

Los indicadores de ADN de BB-OH y BB-NH2 descritos en la FIG. 12 tienen las propiedades de fluorescencia específicas de ADN deseadas y tienen grupos funcionales únicos que pueden servir como puntos de unión. La reacción con electrófilos, tales como ésteres activados o cloruro cianúrico, se puede producir en múltiples posiciones en las moléculas y estas reacciones laterales pueden disminuir la fluorescencia específica de ADN deseada. Las estructuras "dañadas" en la región de unión del ADN en forma de media luna pueden alterar la fluorescencia específica de ADN. Ambas Moléculas tienen un grupo de alquilamina terciaria cíclica en un extremo que se puede alquilar. Los grupos de imidazol también presentan un posible sitio de alquilación. Varias estructuras de superficie pueden tener una fluorescencia específica de ADN deseable, pero es ventajoso tener una estructura de superficie homogénea y reproducible para dar una fluorescencia específica de ADN consistente. El ligador de BB-NH2 contiene un grupo de hexilamina primaria que se puede hacer reaccionar de forma selectiva con electrófilos. En caso necesario, el grupo del ligador se puede extender con un ligador de polietilenglicol. Quantum Biodesign vende un ácido carboxílico protegido con Boc que protegería un ligador hidrofílico y conformacionalmente flexible para la unión del BB flúor al soporte sólido (sustrato).

El interés en sustratos plásticos (mylar) se ha desvanecido cuando se descubrió que se produce una fluorescencia de fondo significativa a 460 nm cuando se irradia con luz a 360 nm. También se descubrió que la cinta Scotch™ (usada para sellar puertos en el dispositivo) tenía una fluorescencia significativa a 460 nm. Por tanto, el experimento se centró en sustratos de cristal. Existe bastante literatura y varias sustancias químicas para la inmovilización de oligonucleótidos a portaobjetos de 1 x 3 cm para micromatrices de ADN. Los portaobjetos recubiertos con amina (aminopropilsilano) se obtuvieron de Sigma como sustrato para nanoingeniería del ligador y las moléculas indicadoras. También se examinó otra sustancia química para portaobjetos disponible comercialmente (CodeLink™ de Amersham Biosciences). Estos portaobjetos tienen una estructura de ligador extendida que termina en grupos de éster activado (N-hidroxisuccinimidaéster). Los portaobjetos CodeLink reivindican "permitir la inmovilización de los oligonucleótidos terminados en amina y proporcionan hibridación sin la necesidad de ligadores PEG largos". Ya que el BB-NH2 flúor podría reaccionar directamente con esta superficie, se examinó primero.

La inmovilización del BB-NH2 se intentó bajo un cubreobjetos en los portaobjetos 3D-Link a pH 8,5. Se adquirió una cámara de hibridación de múltiples pocillos (Grace Bio-Labs) que permite hasta 16 pocillos por portaobjetos para su examen simultáneo. Después de reaccionar varias veces, los portaobjetos se lavaron para eliminar el exceso de BB-NH2 con tampón y se taponaron usando el mismo procedimiento con cubreobjetos. El aclarado final con 1xFAB tuvo lugar antes de la evaluación de las propiedades de unión al ADN fluorogénico.

Las propiedades del indicador BB-NH2 pueden mejorar, probablemente. El fondo fluorescente a 460 nm es una propiedad clave que se puede optimizar si una liberación alta de fondo o mala de ADNds es un problema, por lo que se explorarán otras superficies usando los mismos portaobjetos recubiertos con amina. Una variable clave que se explorará con los portaobjetos CodeLink es el efecto del taponamiento de los extremos con varias aminas tras la inmovilización de BB-NH2. Esto alterará las propiedades moleculares en la interfaz de la molécula fluorogénica de BB, el espaciador y el ADNds en solución. La naturaleza de esta interfaz es probable que afecte a la unión de flúor a ADNds y la cinética de unión del ADN a la superficie sólida. CodeLink recomienda el taponamiento terminal con etanolamina 50 mM, lo que debería dar un recubrimiento de superficie neutra. El taponamiento terminal con diaminas u otras poliaminas podría dar una carga positiva neta a la superficie del portaobjetos y unirse al ADN de forma irreversible (sin liberación). Por otro lado, estas cargas positivas podrían acelerar la tasa de unión o incrementar la concentración local del ADNds (señal mejor). El taponamiento terminal de los ésteres activados con grupos de lisina daría una superficie de aminoácido zwitteriónico que no es atractiva para el ADN, de modo que "pasiva" la superficie. Otro procedimiento para introducir grupos carboxilato sobre la superficie es simplemente hidrolizar los ésteres de NHS tras la inmovilización del BB-NH2. Dado que la inmovilización tendrá lugar a un pH alto (8,5), manteniendo los portaobjetos en este tampón durante la noche probablemente hidrolice los ésteres de NHS sobre la superficie del portaobjetos. Esto daría una carga negativa neta en la interfaz de la superficie del portaobjetos y el ADN y puede afectar a la señal fluorescente y de fondo. Esto se puede usar como un procedimiento para inmovilizar los indicadores fluorogénicos catiónicos.

Los portaobjetos CodeLink se obtuvieron de Amersham Biosciences y se usaron de acuerdo con el protocolo siguiente. Se usó un único portaobjetos para el examen de 16 reacciones de inmovilización diferentes. Una cesta de caucho de silicona de 16 pocillos se adhirió a la placa usando un sistema de pinza en "formato de 96 pocillos" (ProPlate™ Grace Bio-labs). Los pocillos cuadrados que se crean en el portaobjetos contienen un volumen de hasta 300 ul y se pueden cubrir con una película de sellado adhesiva de plástico (suministrada). La superficie del portaobjetos con éster activado está boca arriba y el nombre "CodeLink" del portaobjetos está en la parte superior de los pocillos 1 y 2 a efectos de orientación. Se prepararon soluciones de BB-OH (1 mg/ml en agua) y BB-NH2 (0,7 mg/ml en metanol) como se ha descrito anteriormente. Como solución para taponamiento terminal se usó bicarbonato a pH 8,5 (0,1 M) que contiene 3 mg/ml de aminoetanol (50 mM).

La solución de BB-NH2 (100 ul) se mezcló con 300 ul de metanol y se diluyó con 600 ml de bicarbonato sódico a pH 8,5 (0,1M). Esta solución (70 ug/ml) se usó para preparar soluciones de 7 ug/ml de BB-NH2 y 0,7 ug/ml en bicarbonato a pH 8,5. Las soluciones tenían una fluorescencia de color verde claro en una lámpara de UV de longitud de onda larga (356 nm). A partir de la solución de 1 mg/ml se preparó una solución de 10 ug/ml de BB-OH en bicarbonato a pH 8,5. Los 16 pocillos en la superficie del portaobjetos CodeLink se trataron del siguiente modo:

- pocillos 1-4, 0,7 ug/ml de BB-NH2; pocillos 5-8, 7 ug/ml de BB-NH2; pocillos 9-12, 70 ug/ml; pocillos 13-16, 10 ug/ml de BB-OH. Después de llenar los pocillos (0,2 ml por pocillo), el módulo del portaobjetos se cubrió con película adhesiva y se mantuvo a temperatura ambiente durante 18 horas (en oscuridad). La película se retiró, de cada pocillo se retiraron las soluciones que contienen BB y se añadieron 0,2 ml de solución de taponamiento terminal y se
- 5 volvieron a sellar los pocillos. Tras 7 horas, la solución de taponamiento terminal se retiró de cada pocillo y se retiró la ceta del portaobjetos para lavar. El portaobjetos se empapó en 40 ml de metanol al 40 %, bicarbonato sódico al 60 % (0,1M) en un tubo de centrifuga de 50 ml 20 minutos; se retiró y se empapó en 1 x FAB durante 20 minutos. Se retiró el portaobjetos y se analizó en el lector de placas fluorescentes.
- 10 Se caracterizó la sensibilidad y precisión de las superficies indicativas de ADN. La evaluación de las superficies de portaobjetos que contienen BB-NH2 se examinó usando los patrones de ADNds anteriormente descritos y un formato de ensayo de lector de placas similar. Se evaluaron los pocillos tratados con BB-NH2 y los pocillos tratados con BB-OH evaluados previamente. La ceta de silicona de 16 pocillos se volvió a montar encima de los portaobjetos tratados y CodeLink. El tampón 1xFBA residual se eliminó de la superficie del portaobjetos golpeando
- 15 en un Kimwipe (quedaban algunas gotas). Cada uno de los 4 pocillos para cada mezcla de inmovilización se rehidrató con una de las soluciones siguientes: 1.000 ng/ml de ADN, 200 ng/ml de ADN, 1xFAB, sin líquido. Las soluciones preparadas recientemente se examinaron para 460 nm de fluorescencia del modo normal (lectura del fondo, sensibilidad= 115). Después de leer los pocillos se eliminó el ADN lavando con agua desionizada y se volvió a medir.
- 20 Toas las superficies de los portaobjetos tratados con BB mostraron un incremento de la fluorescencia a 460 nm en presencia de ADNds como se muestra en la FIG. 13. Las reacciones de inmovilización con la concentración más alta de BB-NH2 (70 ug/ml), mostrada a 230, mostró la mayor señal de fluorescencia. No obstante, este alto nivel de carga también dio un fondo fluorescente alto (> 50.000 recuentos sin ADN). La reacción de inmovilización a 7 ug/ml,
- 25 mostrada a 232, dio el mejor rendimiento. Se observó una respuesta a la dosis a 200 ng/ml de ADN. El nivel más bajo de BB-NH2 en la reacción de inmovilización, mostrada a 234, también dio una respuesta a la dosis 200 ng/ml de ADN. Aunque las señales eran bajas, incluso el indicador BB-OH, mostrado a 236, dio el incremento deseado en 460 nm de fluorescencia con mayor concentración de ADN. Después de lavar el ADN de los pocillos con agua, los pocillos no mostraron pruebas de fluorescencia específica de ADN a 460 nm. Todos los pocillos con el mismo nivel de flúor inmovilizado tenían una fluorescencia similar.
- 30 No existe un pigmento fluorescente en solución en los datos de la FIG. 13. el ensayo de unión al ADN usa el BB-NH2 o BB-OH inmovilizado. Todas superficies muestran alguna señal fluorescente a 460 nm en la región de inmovilización de BB-NH2, incluso en ausencia de ADN. Cuando se introduce el ADNds en la superficie de indicación, la fluorescencia a 460 nm aumenta. Se puede usar una región control de la superficie del portaobjetos (sin ADN) para permitir la resta del fondo.
- 35 El BB-NH2 flúor inmovilizado da una buena respuesta a la dosis en presencia de ADNds. La fuerza de la señal fluorescente a 460 nm es aproximadamente la misma que la respuesta a NN-NH2 en solución, pero el fondo es más alto (véase la FIG. 13). La principal ventaja del BB-NH2 inmovilizado es el requisito de volumen pequeño. Al contrario que el volumen de 200 ul del pocillo para el ensayo en fase de solución solo se requiere bastante solución de ADN para humidificar completamente la superficie de BB inmovilizada. Esto permitirá la preparación de dispositivos microfluídicos para la purificación del ADN.
- 40 Otros han mostrado el uso de superficies de cristal para purificar el ADN de las mezclas biológicas complejas y estos resultados se han verificado usando el ensayo de BB fluorogénico. Las etapas requeridas para el dispositivo microfluídico se muestran a continuación en la Tabla B. El ensayo de BB en fase de solución se usó para determinar la unión de ADN y liberar niveles de cristal no modificado.
- 45

TABLA B

1. lisar las células, eliminar las histonas y unir el ADN al cristal con niveles elevados de GuSCN
2. lavar el cristal unido a ADN con niveles elevados de GuSCN
3. liberar el ADN unido del cristal con sal fisiológica
4. leer la concentración del ADN liberado en la cámara con sustrato fluorogénico
5. liberar el ADN del sustrato fluorogénico y formular para usar en ensayos basados en PCR

- 50 El tiocianato de guanidinio (10M) se examinó en el ensayo de unión a ADN fluorogénico y se descubrió que daba un fondo fluorescente a 460 nm con concentraciones elevadas. Otro caotropo habitual para la unión del ADN al cristal es el yoduro sódico (12M). Tenía fondo bajo, pero es más caro que el perclorato sódico y es más difícil de manipular (la solución se decolora). Por tanto, se escogió el perclorato sódico (6M) para el desarrollo. Se prepararon
- 55 soluciones de 50, 500 o 5000 ng de ADN en 0,1 ml en perclorato sódico 6M (pH 8 Tris). Estos volúmenes de 0,1 ml se transfirieron a placas de Petri de poliestireno y cubreobjetos de 22x22 mm (de cristal o de plástico) se colocaron encima. Tras 1,5 horas a temperatura ambiente, los portaobjetos se inclinaron cuidadosamente y se eliminó el líquido residual. Se colocaron en Kimwipes (ADN boca abajo) para eliminar todas las gotas residuales. Cada

5 portaobjetos se transfirió a un volumen de 0,1 ml de 1 x tampón de ensayo de fluorescencia en una palca Petri (1 x FAB: Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 200 mM, pH 7,4). Tras 4 horas a temperatura ambiente, los portaobjetos se retiraron y el lado del ADN se lavó cuidadosamente con 0,15 ml de 1 x FAB. El tampón combinado de cada portaobjetos se llevó a 0,27 ml con 1x FAB y se añadieron 30 ul de una solución de 1 ug/ml de bisbencimida (BB-OH) (en 1 x FAB). Volúmenes de 200 microlitros de cada portaobjetos se transfirieron a un micropocillo (fondo transparente) y las muestras se leyeron en un lector de placas Biotek FL-600. La fluorescencia se leyó a 460 nm y la concentración del ADN se determinó a partir de una curva estándar.

10 En referencia ahora a la FIG. 14, se muestra la eficiencia de la captura de ADN y liberación desde los cubreobjetos. Los cubreobjetos de plástico no muestran unión del ADN a 250. La eficiencia de la captura de ADN y liberación desde los cubreobjetos de cristal, mostrada a 252, es mayor para cantidades menores de ADN. A 50 ng de ADN por cubreobjeto se recuperaron 7,2 ng (eficiencia del 14 %). A 500 ng de ADN por cubreobjeto se recuperaron 68 ng (eficiencia del 14 %). A 5000 ng de ADN por cubreobjeto se recuperaron 113 ng de ADN (eficiencia del 2%). Estos Resultados muestran que los cubreobjetos de cristal son superficies adecuadas para la purificación de ADN

15 microfluídico y al menos 68 ng de ADN se pueden recuperar con eficiencia de una muestra de 500 ng. Las tarjetas del prototipo se han optimizado para adición manual-pipeta de soluciones y se puede conseguir un caudal de 100 ul por minuto con un experto y Rainin 200 ul Pipettman. Es más difícil alcanzar caudales más lentos (importante para minimizar la formación de burbujas), pero se usó con éxito un pipeteador de 200 ul para llenar el canal de unión del ADN (20 ul) sin introducir burbujas.

20 Las tarjetas que se han comentado anteriormente tuvieron éxito con algunas variaciones pequeñas. Los canales revestidos de cristal humidificaron los pocillos con caudales bajos y se pudo eliminar el fluido introduciendo flujo de aire a través de los canales. El pocillo para recolección de ADN se diseñó para recolectar todo el ADN purificado para análisis usando un lector de placas fluorescentes. Con las superficies de BB inmovilizadas, el pocillo para

25 recolección de ADN se puede diseñar para proporcionar un canal de perfil bajo que se puede configurar fácilmente para distribuir el ADN a otros canales tras el análisis fluorescente. Dado que el pigmento BB fluorogénico se inmoviliza, el ADN purificado no se contamina con el flúor indicador cuando se transfiere a las cámaras de análisis de ADN corriente abajo.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo (160) que comprende:
 - 5 (a) un puerto de entrada (168);
 - (b) un puerto de salida (170); y
 - 10 (c) un único canal de unión (162) en comunicación líquida con el puerto de entrada y el puerto de salida, en el que dicho canal de unión tiene una sección transversal rectangular, y una pared superior, una pared inferior, y dos paredes laterales, y en el que una o dos de dichas paredes es una superficie de cristal lisa sin modificar para unión de ácidos nucleicos y las otras paredes son de plástico.
2. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que los ácidos nucleicos son ADN bicatenarios o ADN monocatenarios.
3. dispositivo de la reivindicación 1, en el que los ácidos nucleicos son ARN.
- 15 4. El dispositivo de la reivindicación 1 que además comprende medios para cuantificar los ácidos nucleicos.
5. Un procedimiento para capturar ácidos nucleicos de soluciones salinas caotrópicas, que comprende pasar una solución salina caotrópica que contiene ácidos nucleicos a través de un dispositivo (160) de acuerdo con la
20 reivindicación 1, de modo que la solución que contiene ácidos nucleicos se pone en contacto con la superficie de cristal lisa sin modificar para proporcionar ácidos nucleicos inmovilizados.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que los ácidos nucleicos inmovilizados son ADN bicatenarios o ADN monocatenarios.
- 25 7. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que los ácidos nucleicos inmovilizados son ARN.
8. El procedimiento de la reivindicación 5, que además comprende lavar los ácidos nucleicos inmovilizados.
- 30 9. El procedimiento de la reivindicación 5 u 8, que comprende liberar los ácidos nucleicos inmovilizados de la superficie de cristal para proporcionar ácidos nucleicos liberados.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, que además comprende cuantificar los ácidos nucleicos liberados.

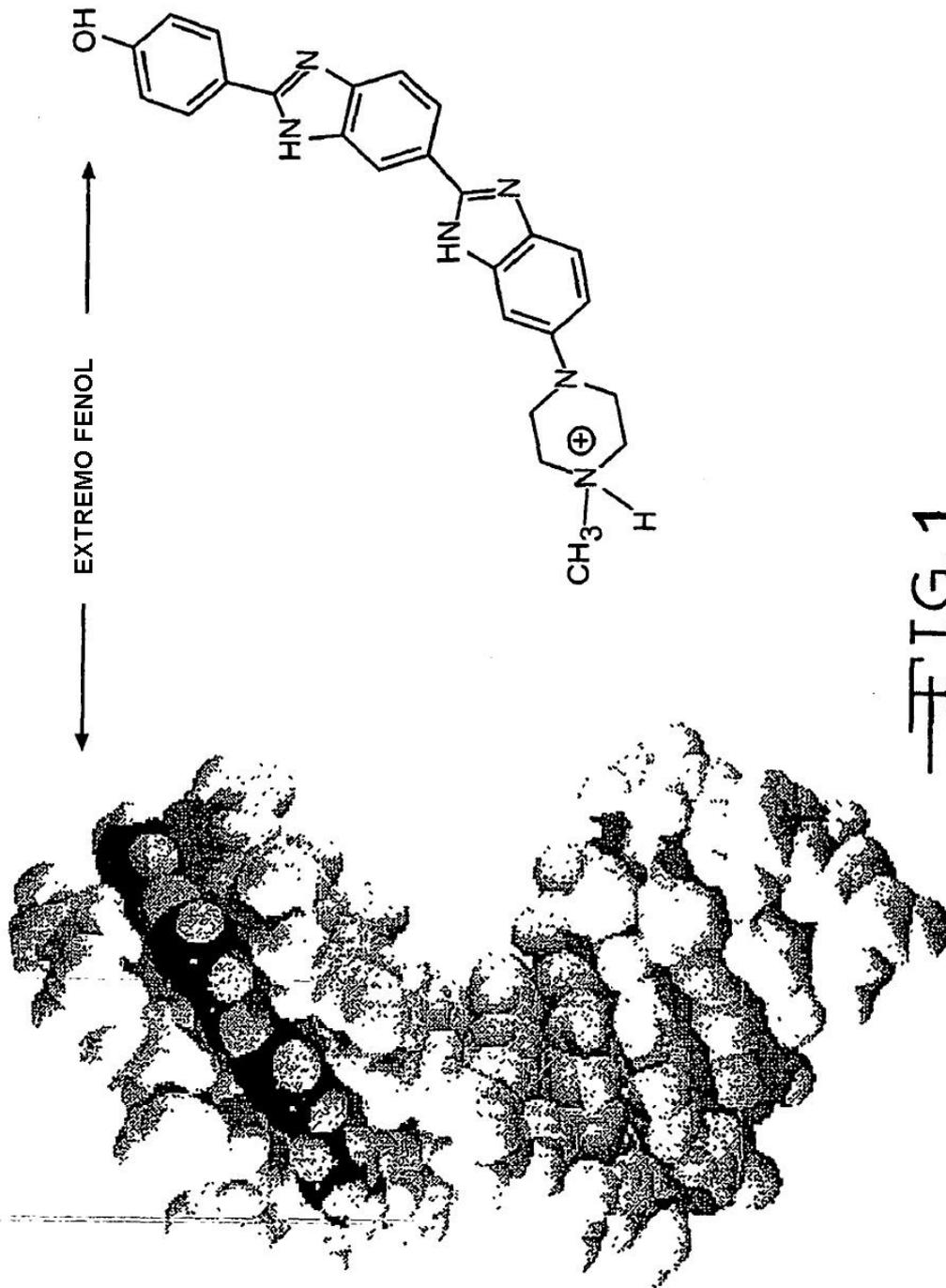


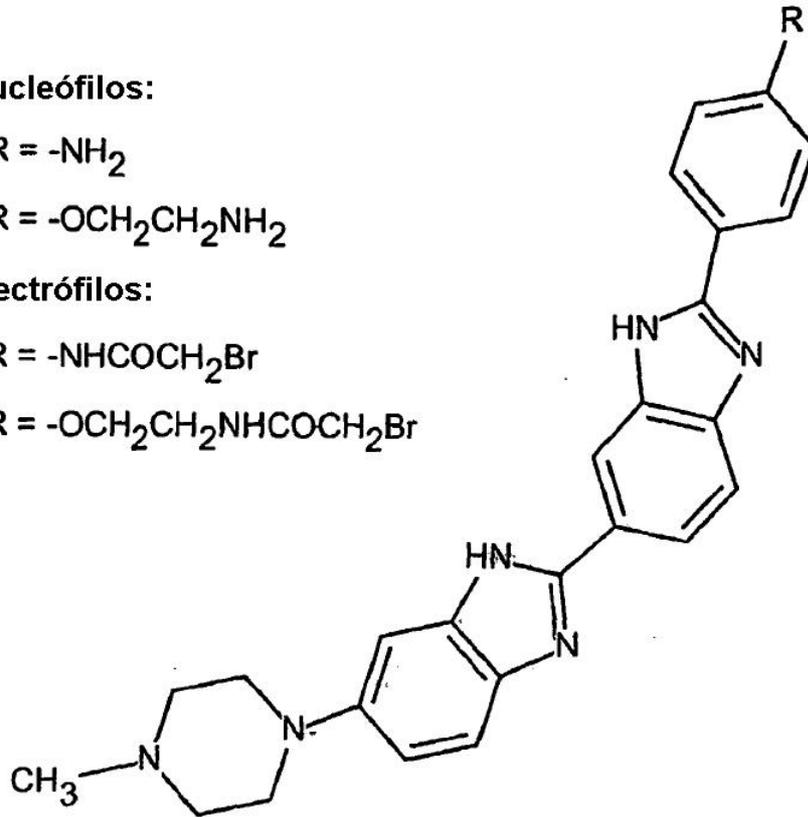
FIG. 1

Nucleófilos:

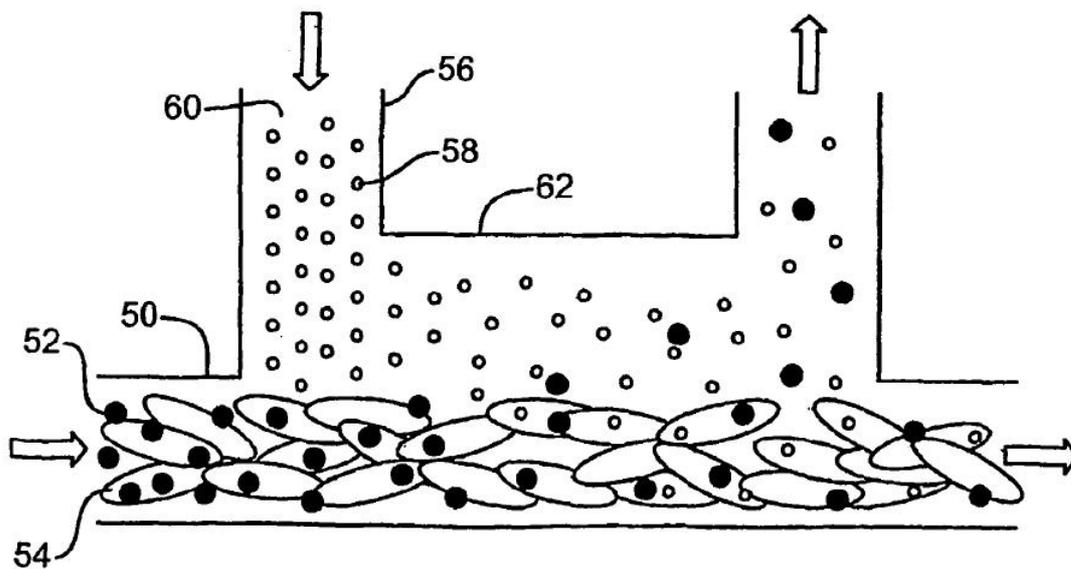
1. R = -NH₂
2. R = -OCH₂CH₂NH₂

Electrófilos:

3. R = -NHCOCH₂Br
4. R = -OCH₂CH₂NHCOCH₂Br



—FIG. 2



—FIG. 3

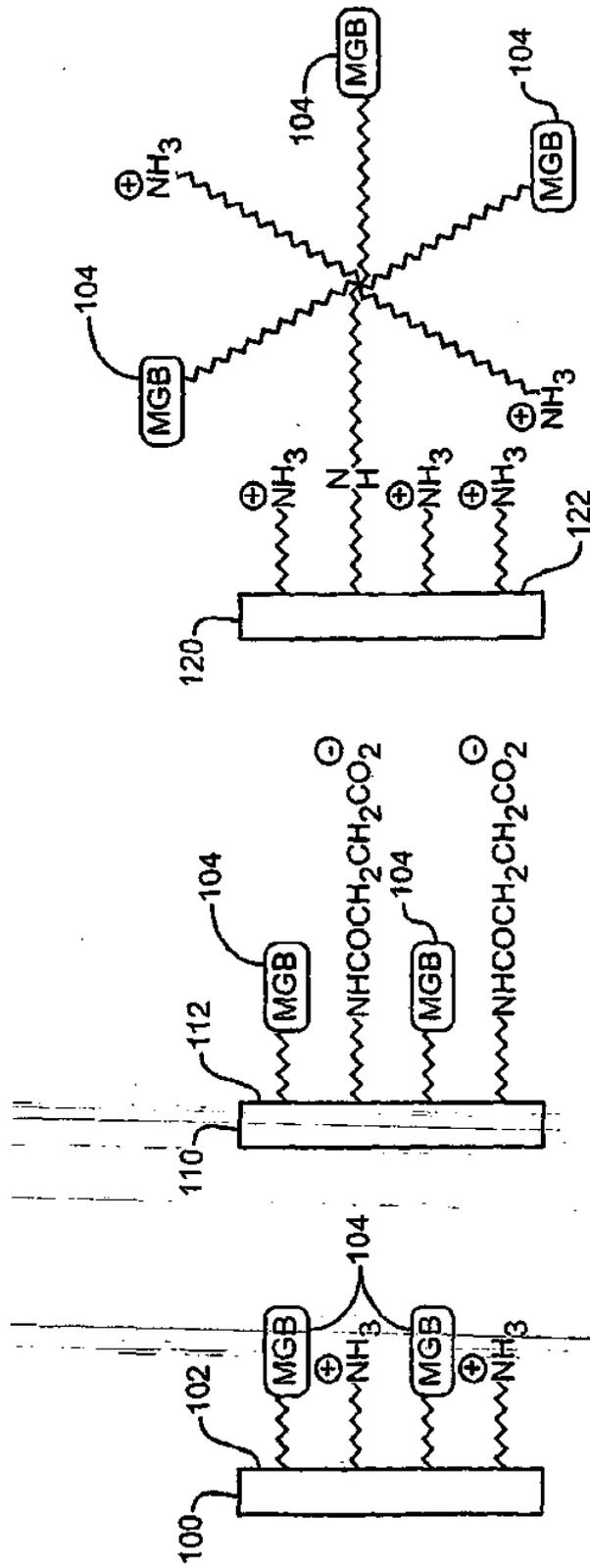


FIG. 4

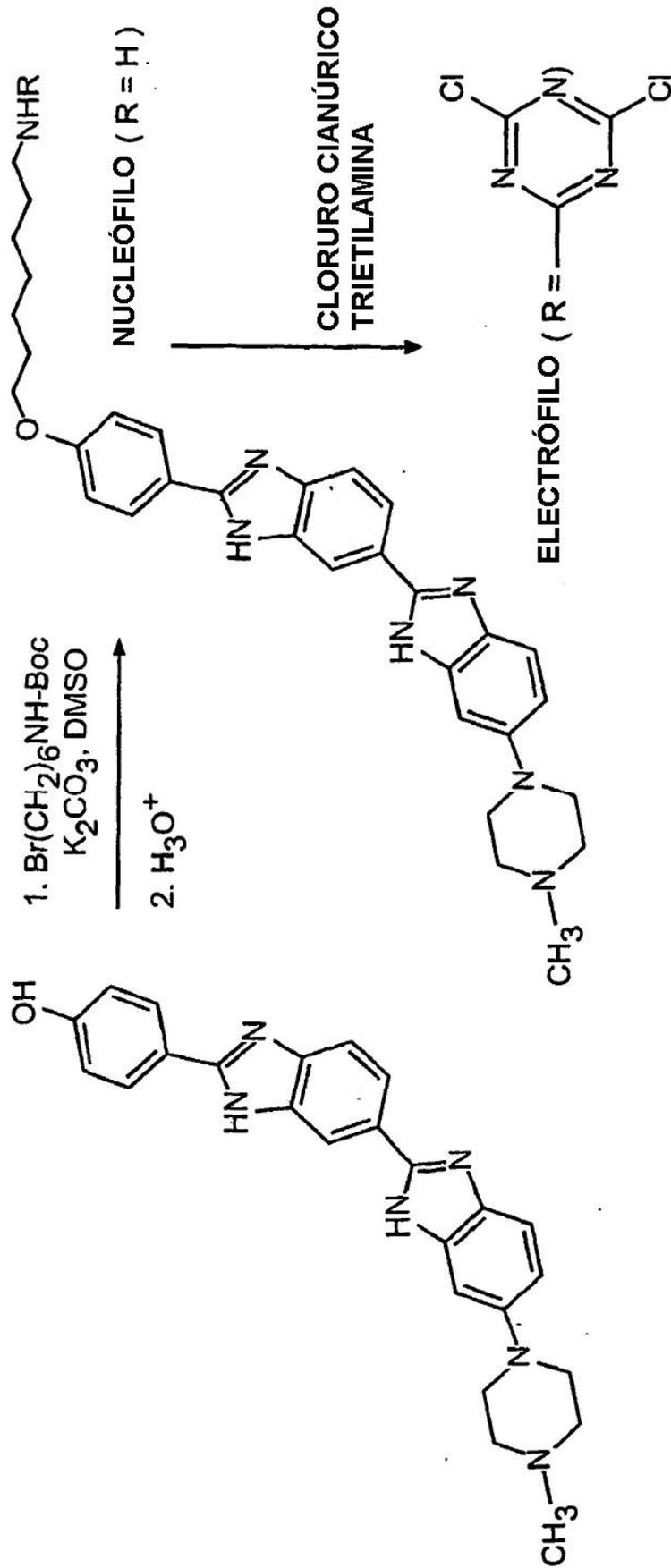


FIG. 5

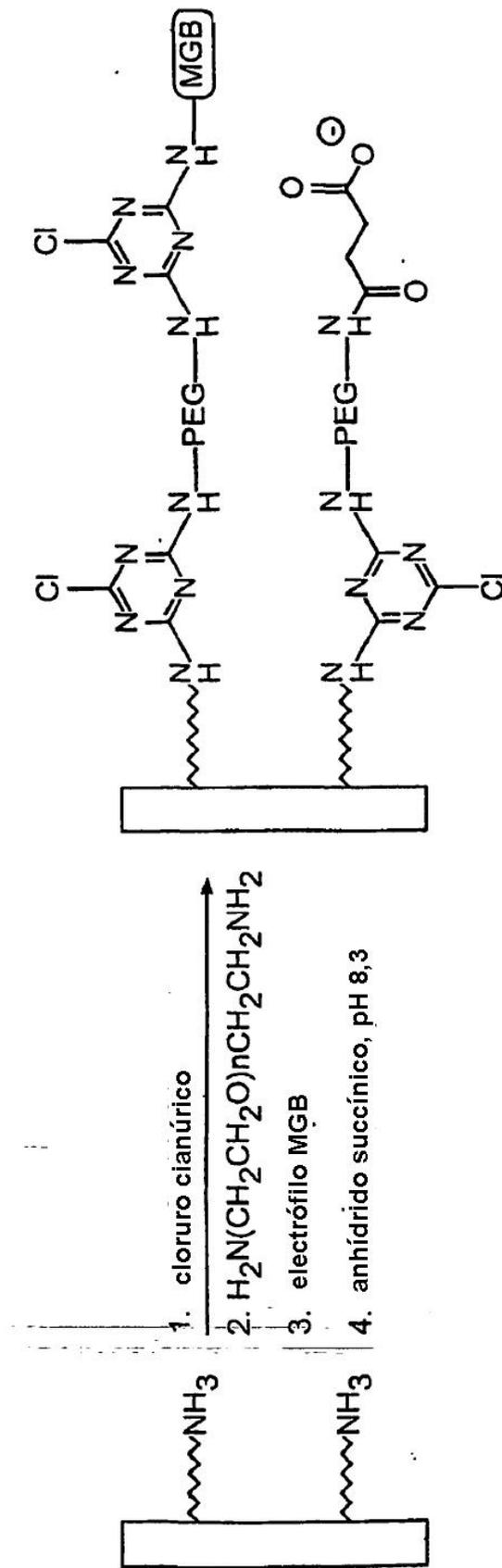


FIG. 6

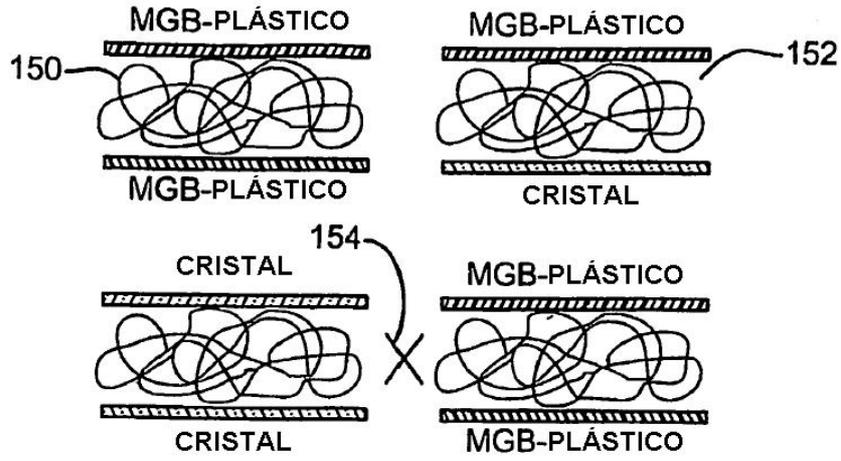


FIG. 7

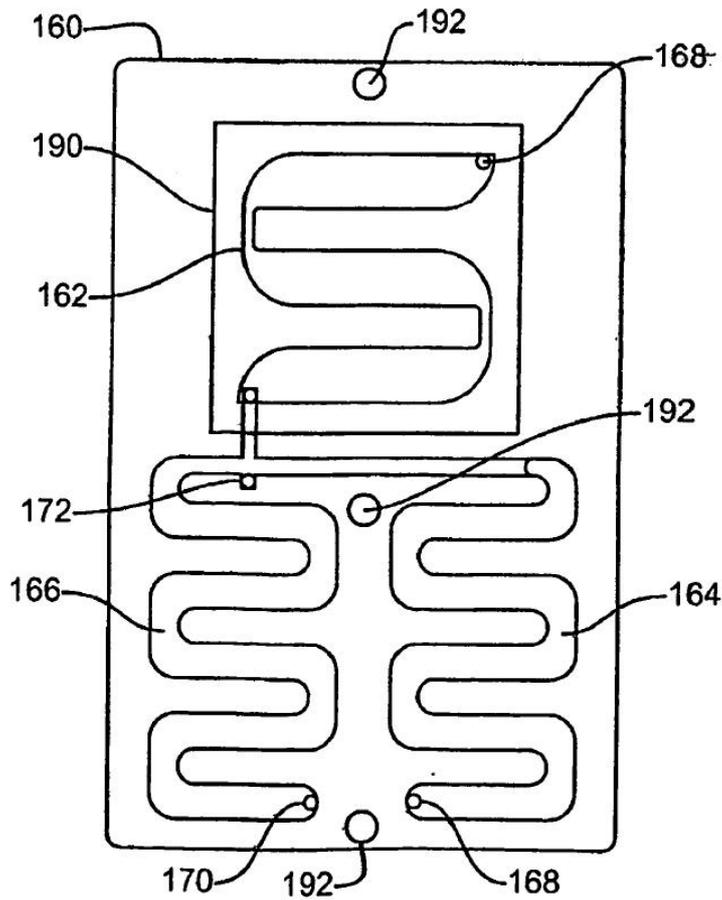


FIG. 8

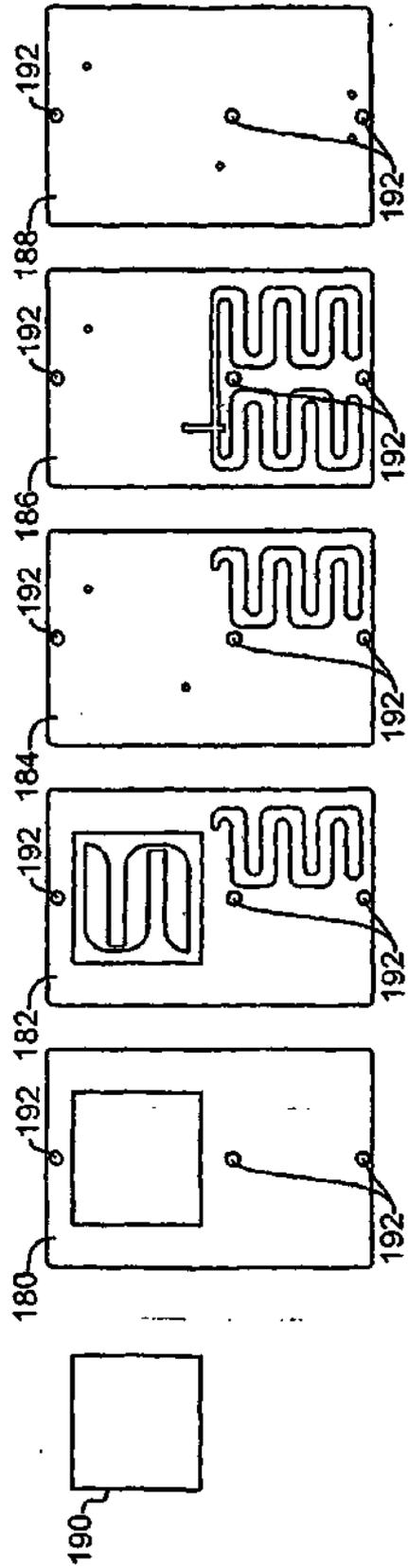
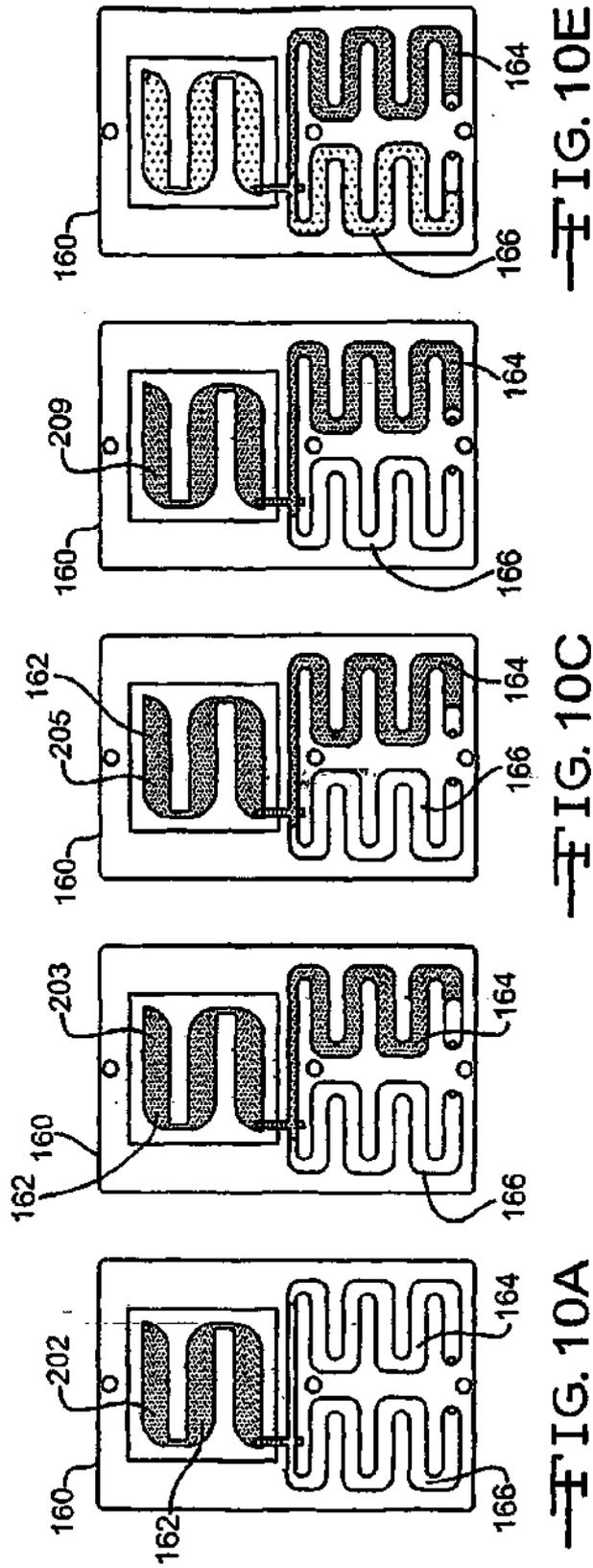


FIG. 9



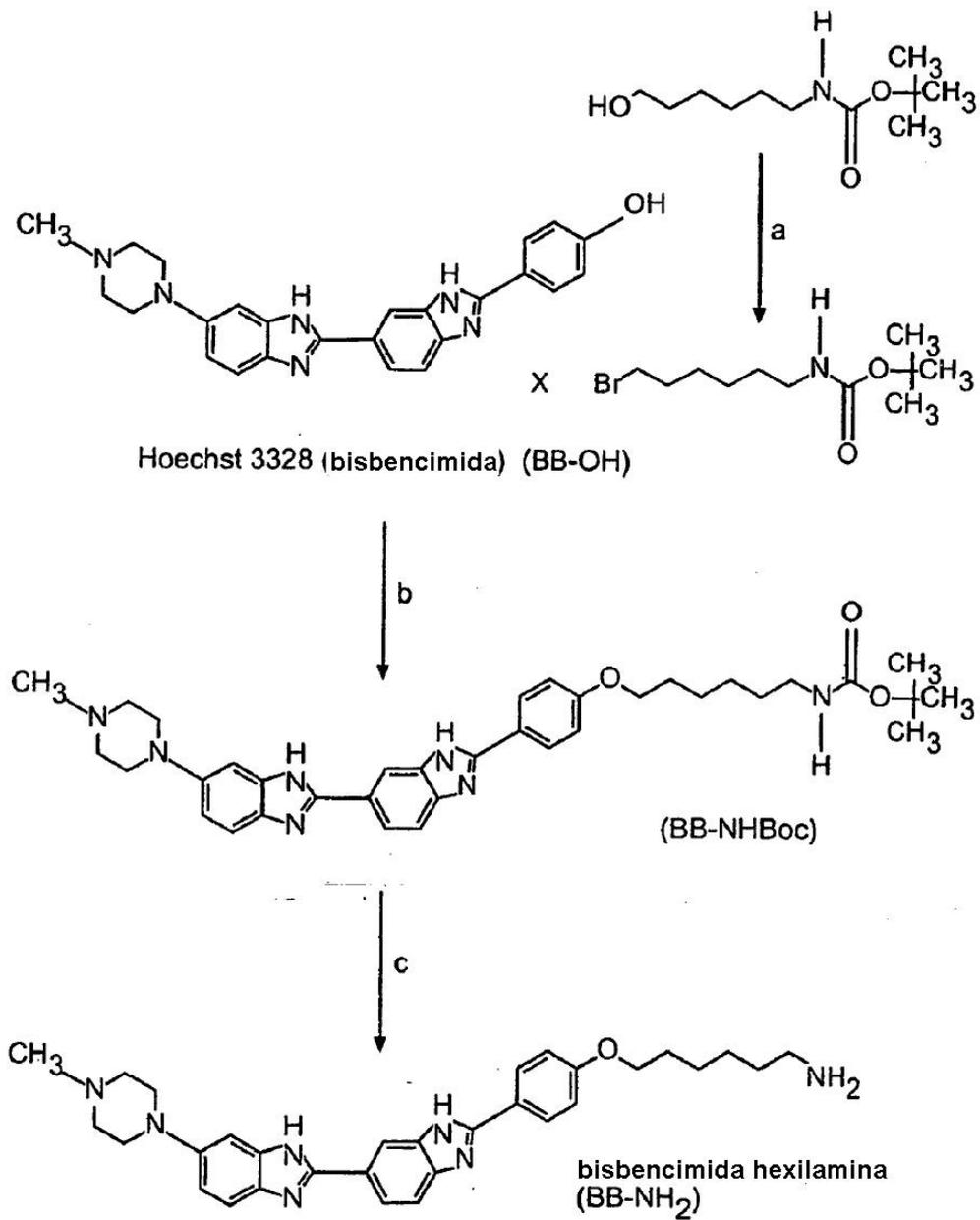


FIG. 11

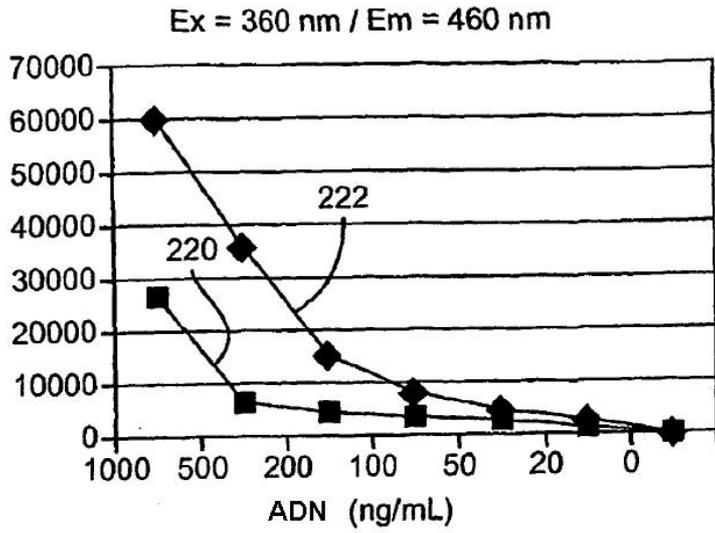


FIG. 12

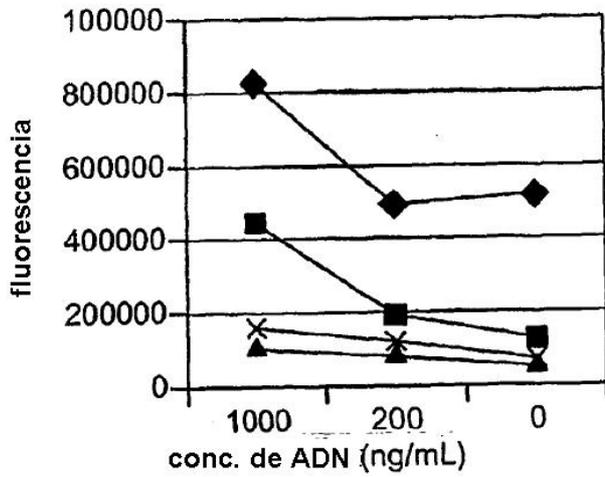


FIG. 13

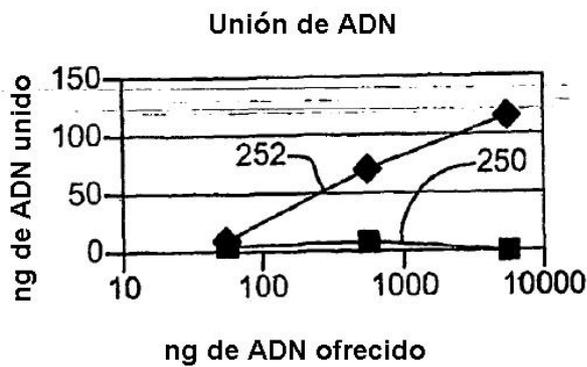


FIG. 14