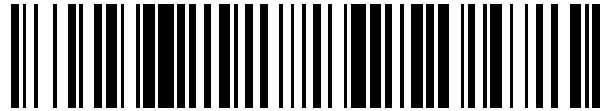


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 411 064**

51 Int. Cl.:

G01N 33/536 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2008 E 08833536 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2013 EP 2205973**

54 Título: **Método y dispositivo para bioanálisis multiplexado basado en nanotecnología de alta sensibilidad**

30 Prioridad:

26.09.2007 IT PO20070023

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

04.07.2013

73 Titular/es:

**HOSPITEX DIAGNOSTICS S.R.L. (100.0%)
VIA STORI, 6/A
I-50141 FIRENZE, IT**

72 Inventor/es:

**LIGURI, GIANFRANCO y
TRISOLINI, FRANCESCO**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 411 064 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

Método y dispositivo para bioanálisis multiplexado basado en nanotecnología de alta sensibilidad

Campo de la técnica

5 Esta invención se refiere a un método y a un dispositivo para el análisis con alta sensibilidad de analitos múltiples en muestras biológicas.

Para entrar en detalle, la invención se refiere a un método y a un dispositivo para la detección de pares complementarios de moléculas, como pares ácido nucleico-ácido nucleico (p.ej. ADN-ADN, ADN-ARN, ARN-ARN) o proteína-proteína (p.ej. antígeno-anticuerpo).

Técnica anterior

10 Es bien conocido que durante los últimos veinte años, las técnicas de biología molecular han generado un interés creciente en los campos de la biología y la medicina. En particular, hay un fuerte interés en desarrollar nuevas técnicas de bioensayos para una amplia variedad de aplicaciones, como la identificación genética, mapa del genoma y secuenciación de ADN en medicina y en otros campos del diagnóstico.

15 Entre las técnicas más conocidas, la reacción en cadena de Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) y sus modificaciones relacionadas ha sido ampliamente usada en investigación y en diagnósticos clínicos para amplificar y analizar específicamente trazas de ácidos nucleicos cuyas secuencias de nucleótidos inicial y terminal son conocidas. Esta técnica se basa en la habilidad de la enzima polimerasa del ADN para sintetizar una nueva hebra de ADN a partir de ADN desnaturalizado a ciertas temperaturas. La reacción en cadena de Ligasa (LCR por sus siglas en inglés), que se basa en la acción de una ligasa termoestable, representa la variación más común de la PCR. Estas técnicas son muy sensibles y fiables, pero también son muy costosas y requieren mucho tiempo. Además, requieren de expertos en la técnica, y no es muy fácil automatizarlas. La PCR cuantitativa (Q-PCR), que se basa en la amplificación del ADN diana, es otra modificación común de la PCR, pero solamente es posible generar datos semi-cuantitativos (número de copias de una secuencia de ADN en una muestra) y le puede afectar la presencia de inhibidores y bajo número de plantillas a copiar.

25 ELISA (siglas en inglés de Ensayo por Inmunoabsorción ligado a enzima) y sus modificaciones relacionadas es otra técnica que se usa frecuentemente en diagnóstico. Es un tipo de análisis inmunológico que, en bioquímica, se usa para detectar la presencia de un antígeno que es característico de un organismo patógeno particular, o medir la concentración de anticuerpos en plasma sanguíneo (como en ensayos de SIDA, por ejemplo). Esta técnica se basa en reacciones antígeno-anticuerpo específicas que se hacen visibles por diferentes procedimientos. En los últimos años, se han desarrollado muchas otras técnicas relacionadas con ELISA. Una de ellas es la técnica "de captura de híbridos 2", desarrollada por Digene Corp. para la detección del virus del papiloma humano (HPV), que es capaz de detectar híbridos ARN:ADN usando una señal quimiluminiscente amplificada. Estas técnicas relacionadas con ELISA; aunque sensibles y fiables, no permiten "multiplexación" (la detección simultánea de diferentes subtipos (p.ej. subtipos de HPV) en el mismo reactor). La exactitud de tales técnicas también pueden verse afectadas por la señal fluorescente usada en la detección, que tiende a ser bastante insensible, por la baja estabilidad de los tintes y por la influencia del entorno físico-químico sobre la intensidad de la señal. La detección es a menudo expansiva, también.

40 Al inicio de los años 90, las micromatrices de ADN se volvieron más importantes para la detección paralela de moléculas de ADN, particularmente en el campo de la investigación biomédica. Una micromatriz de ADN es una colección de sondas de ADN microscópicas dispuestas sobre una superficie sólida, como un vidrio o plástico, que se une a dianas complementarias adecuadas químicamente que han sido amplificadas previamente y marcadas con una molécula fluorescente, que permite la detección de señales fluorescentes generadas durante la hibridación. Estas técnicas permiten, por lo tanto, multiplexación, pero requieren previamente la amplificación del ADN diana para asegurar la sensibilidad óptima, como en el caso de la detección de mRNA amplificado por RT-PCR. Así, se ven afectados por los inconvenientes mencionados anteriormente del la PCR. Las micromatrices requieren también escáneres muy costosos y sistemas de detección sofisticados, que consisten en láseres focalizados específicos que ponen de manifiesto cada micro-mancha única. Además, no es fácil automatizar y por lo tanto no son muy útiles en diagnóstico. Además de esto, también se ven afectadas por las limitaciones mencionadas anteriormente de la detección fluorescente.

50 En los últimos años, se han desarrollado nuevas técnicas de detección derivadas del ensayo conocido "aglutinación de látex", con el objetivo de superar los inconvenientes analíticos asociados con las técnicas basadas en la fluorescencia y PCR. En este caso, la superficie de las partículas de látex se recubre con anticuerpo (o antígeno). Cuando una suspensión que contiene el antígeno complementario (o anticuerpo) a detectar se añade sobre la suspensión de partículas, provoca una aglutinación visible que permite al antígeno específico o anticuerpo ser detectado mediante un desplazamiento en la escala dimensional. Sin embargo, estos métodos no permiten multiplexación, requieren partículas más grandes (tamaño de micrómetros) y a menudo se aplican solamente a antígenos o anticuerpos específicos. Se pueden encontrar numerosas patentes sobre este campo (US6200820, US5589401, US7122384, US7169556, US5175112), pero la mayoría de estas se refieren a técnicas muy complejas y principalmente no cuantitativas.

Se describe un método de detección de ADN basado en la conductividad utilizando nanopartículas de Au funcionalizadas con oligonucleótidos por Park et al. en "Array-Based Electrical Detection of DNA with Nanoparticles Probes", Science, vol 295, páginas 1503-1506.

5 El documento W003/095973A2 describe un método de detección de analitos basado en el uso de nanopartículas marcadas para Raman que pueden activarse para proporcionar el efecto SERS.

10 Ambos métodos referidos anteriormente, para ser eficaces, necesitan una solución potenciadora de plata. El método de detección de ADN basado en la microesfera de látex y nanopartículas de oro se describe por Reynolds III et al. en "A gold nanoparticle/latex microsphere-based colorimetric oligonucleotide detection method", Pure Appl. Chem., Vol. 72, Nos. 1-2, pp 229-235, 2000. Las sondas de oro y látex se unen juntas por la hebra de ADN diana, generando un cambio de color de blanco a rojo en una membrana selectiva de tamaño por la cual el exceso de partículas de oro o no hibridadas se separan de las sondas indicadoras de látex.

Descripción de la invención

15 Así, el objetivo de esta invención es proporcionar una técnica biotecnológica analítica que sea capaz de llevar a cabo la detección de pares complementarios de moléculas, como ácido nucleico-ácido nucleico (ADN-ADN, ADN-ARN, ARN-ARN) o proteína-proteína, sin los inconvenientes de otras técnicas.

En particular, el objetivo de la invención es proporcionar un método y un dispositivo para la detección simultánea y cuantitativa de diferentes subtipos (multiplexación) de un sistema diana biológico dado (virus, mutaciones genéticas, etc).

20 Los objetivos mencionados anteriormente se consiguen usando un método y un dispositivo que explote la interacción de nanopartículas no biológicas con estructuras biológicas (como ácidos nucleicos y proteínas) para determinar incrementos dimensionales, permitiendo de ese modo la detección de una diana biológica (virus, mutaciones genéticas, etc).

25 En particular, el método y dispositivos propuestos hacen uso de una arquitectura de micromatriz de nanopartículas unidas a sondas moleculares o anticuerpos específicos, que son adsorbidos sobre una superficie sólida y preferiblemente dispuestos en una monocapa. El objetivo del sistema es detectar específicamente pares complementarios de moléculas, como pares de proteína-proteína (p.ej. complejos antígeno-anticuerpo) y pares ADN-ADN o ADN-ARN (p.ej. complejos sonda-diana). Además del uso de señales fluorescentes para detectar y cuantificar estos pares, se pueden usar preferiblemente fuentes de láser focalizado acoplado a un sistema de fotosensores. Luego se pueden explotar varias estrategias de detección, como análisis por imagen o dispersión de la luz.

30 Las ventajas y características técnicas de la invención serán más evidentes con la descripción detallada siguiente de una realización de un ejemplo no limitante.

Breve descripción de los dibujos

En los dibujos:

- 35
- La Fig. 1 ilustra esquemáticamente el propósito metodológico de la invención;
 - La Fig. 2 ilustra esquemáticamente la aplicación de la invención a la detección de varios subtipos de un sistema biológico;
 - La Fig. 3 muestra la ampliación del detalle A de la Fig. 2.

Realización preferida de la invención

40 Con referencia a la Fig. 1, para posibilitar la detección del elemento X de un par complementario de moléculas (la diana), se determina la unión a otros dos componentes Y, Z del elemento complementario del otro par (en el ejemplo ilustrado, dos elementos complementarios a dos porciones terminales diferentes de la diana), uno unido a una nanopartícula N y el otro a un soporte sólido S.

45 Más específicamente, de conformidad con la invención, las nanopartículas de látex N, que están monodispersas en la suspensión a ensayar, específicamente unida a la diana X a través de sondas moleculares complementarias Y que están fijadas a las nanopartículas. Estos complejos nanopartícula-sonda-diana difunde por movimiento browniano de la suspensión líquida a la interfase sólido-líquido y se fija sobre la superficie sólida S (p.ej. una de las superficies internas del tubo que contiene la suspensión) como una monocapa, dando como resultado la unión de la diana X a otras sondas moleculares específicas Z (que son complementarias a otras porciones de la diana), que son también adsorbidas sobre la superficie sólida.

50 En este sentido, fijando diferentes sondas sobre diferentes áreas de la superficie sólida (como se muestra a continuación), se crea una matriz de partículas, con cada área caracterizada por un complejo sonda-partícula

particular, permitiendo de este modo la caracterización específica de diferentes subtipos de un sistema biológico dado (multiplexación).

El método propuesto garantiza rigidez y fiabilidad, al igual que análisis rápido y automatización. Además, se requerirán menos tiempo y dinero para enseñar al personal, comparado con técnicas previas.

5 Se obtiene un análisis muy sensible, no por el incremento cuantitativo de material, como con la PCR, sino al explotar la señal de amplificación que se genera cuando se desplaza de una escala molecular (ácido nucleico o proteína) a una microscópica (nanopartículas de látex): de hecho, el “desplazamiento” en la escala dimensional es dos o tres veces en magnitud.

10 Un proceso adicional que incrementa la sensibilidad del ensayo es el efecto de la concentración que ocurre cuando las partículas monodispersas difunden a través de la suspensión líquida y se fijan sobre la superficie sólida como una monocapa.

15 Consecuentemente, el método y el dispositivo de acuerdo con la presente invención permiten que se cumplan dos objetivos cruciales en el campo del diagnóstico médico. El primero de ellos es el incremento de la señal, además de usar mejor el espacio sólido y la concentración selectiva de la molécula a analizar en un estado bidimensional, y segundo, la habilidad de llevar a cabo más ensayos simultáneos, en el mismo reactor y sobre la misma muestra (multiplexación), dando como resultado un considerable ahorro de tiempo, dinero y material biológico.

Además de lo mencionado anteriormente, esta última característica, en particular, es especialmente ventajosa cuando hay que detectar mutaciones genéticas en muestras humanas y pueden usarse también para genotipos de virus que son peligrosos para los seres humanos.

20 En las Figuras 2 y 3, la detección de genotipos diferentes (cuatro en este caso) del Virus del Papiloma Humano (HPV) se ilustra esquemáticamente usando un método y un dispositivo que se ajustan a la invención propuesta.

25 En este ejemplo, el genoma (G1-G4) de los varios subtipos de HPV es la diana a detectar. Las sondas (C) fijadas a las nanopartículas (N) son sondas de ADN que son complementarias de las regiones conservadas del genoma de HPV (y son por lo tanto capaces de detectar cualquier subtipo de HPV), mientras que las sondas (V1-V4) fijadas al soporte sólido (S) son sondas de ADN que son complementarias a las regiones variables del genoma de HPV (por lo tanto, pueden detectar específicamente un subtipo de HPV particular). Como consecuencia, esto permite la detección espacial de varios subtipos (multiplexación).

30 El sistema prevé el uso de un recipiente plástico (p.ej. un tubo), en el que se selecciona un área de aproximadamente 1 cm² en una de sus superficies internas (S) y se sub-divide en diferentes celdas (1-4). Un oligonucleótido diferente (V1-V4), que corresponde a una sonda de ADN particular que es complementaria a la parte variable del genoma de un genotipo de HPV específico, se fija a cada celda.

35 Luego se añadirá una suspensión que contiene nanopartículas de látex (N) que son de aproximadamente 100-300 nm de tamaño, que están unidas a sondas de ADN (C) (previamente fijadas a las nanopartículas) que son específicas para la porción conservada del genoma de HPV y, como consecuencia, relacionado con los varios subtipos de HPV, al tubo.

40 La muestra biológica se añade al tubo para que se puedan hacer las medidas cualitativas y cuantitativas de HPV. En presencia de una diana específica (p.ej. G1) (es decir la presencia de una molécula de un cierto subtipo de HPV), la unión ocurre entre la diana y una nanopartícula (N), a través de su porción de ADN conservada (C), y con una porción (1) de la superficie interna (S) del tubo, a través de su porción variable de ADN (V1), dando como resultado la fijación de las nanopartículas sobre la superficie interna del tubo (Fig. 3).

Después de lavar (si fuera necesario) para eliminar cualquier nanopartícula no unida, la detección cualitativa de los varios subtipos de HPV presentes en la muestra se llevara a cabo (p.ej. usando técnicas de dispersión de luz, análisis de imagen o técnicas de ondas evanescentes) para determinar la distribución espacial de nanopartículas que están fijadas a las sondas de oligonucleótidos de tipo específico unidas a la superficie.

45 Generando curvas de calibración derivadas de los datos experimentales, al igual que usando un algoritmo matemático específico, también es posible llevar a cabo la detección cuantitativa de cada subtipo de HPV presente en la muestra que se ensayó. La correlación probabilística y estadística de la concentración eficaz de cada subtipo específico en la muestra con el número de nanopartículas específicas que se han unido en una monocapa en el soporte sólido evita la posibilidad de sub- o sobreestimar uno o más subtipos.

REIVINDICACIONES

1. Un bioensayo multiplex de alta sensibilidad caracterizado porque comprende las etapas siguientes:
 - proporcionar un pluralidad de nanopartículas de látex o sílice;
 - aplicar al menos una sonda de un primer tipo, que tiene afinidad por al menos un analito, a cada nanopartícula;
 - 5 aplicar una pluralidad de sondas de al menos un segundo tipo, que tiene una afinidad para dicho al menos un analito, a la superficie de un soporte permitiendo la detección espacial de dicho analito;
 - mezclar dicha pluralidad de nanopartículas con una muestra fluida para determinar de este modo la unión de una o más de dichas nanopartículas a dicho analito, cuando está contenido en la muestra, como resultado de la unión ocurrida entre la sonda del primer tipo y el analito;
 - 10 poner en contacto dichas nanopartículas unidas al analito con dicho soporte para provocar la fijación a la superficie como resultado de la unión ocurrida entre las sondas de dicho segundo tipo y dicho analito;
 - detectar dicho analito analizando la señal de la luz generada por dichas nanopartículas unidas a la superficie cuando se iluminan.
- 15 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dichas sondas del primer tipo son complementarias a una región conservada de dicho analito y dichas sondas del segundo tipo son complementarias a regiones variables de dicho analito.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho soporte permite la detección espacial de diferentes subtipos de dicho analito.
- 20 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la superficie de dicho soporte se divide en una pluralidad de áreas y al menos una sonda, que es complementaria a una región variable diferente de dicho analito, se aplica a cada área, dando como resultado de este modo a la fijación de nanopartículas unidas a diferentes subtipos del analito en diferentes áreas.
- 25 5. Un método de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el que la señal de luz generada por las nanopartículas unidas a la superficie se analiza por medio de técnicas de dispersión de luz, análisis de imagen o técnicas de onda evanescente.
6. Un método de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el que dichas nanopartículas son de 100-300 nm de tamaño.
7. Un dispositivo para bioensayos multiplex de alta sensibilidad adecuado para el método de la reivindicación 1, caracterizado porque comprende:
 - 30 un receptáculo en el que la muestra fluida puede analizarse;
 - una pluralidad de nanopartículas de látex o sílice dispersas en el fluido, con cada nanopartícula fijada a al menos una sonda de un primer tipo que tiene afinidad por al menos un analito;
 - una pluralidad de sondas de al menos un segundo tipo que tiene afinidad por dicho analito y fijándose a la superficie de al menos una pared del receptáculo;
 - 35 una fuente de láser focalizado para iluminar las nanopartículas que se fijan a la superficie de la pared, que resulta de las uniones que ocurren entre las sondas unidas a las nanopartículas y el analito y entre el analito y las sondas fijadas a la superficie;
 - medios fotosensibles para detectar la señal de luz generada por dichas nanopartículas unidas a la superficie cuando se iluminan.
- 40 8. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la señal de luz generada por dichas nanopartículas unidas a la superficie se analiza por medio de técnicas dispersión de luz, análisis de imagen o técnicas de onda evanescente.
9. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en el que la superficie de dicha pared se divide en una pluralidad de áreas, estando unida cada área a al menos una sonda que es complementaria de una región diferente variable de dicho analito, dando como resultado de este modo la fijación de nanopartículas unidas a diferentes subtipos del analito en diferentes áreas.
- 45 10. Un método y un dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, para detectar diferentes genotipos de Virus del Papiloma Humano (HPV).

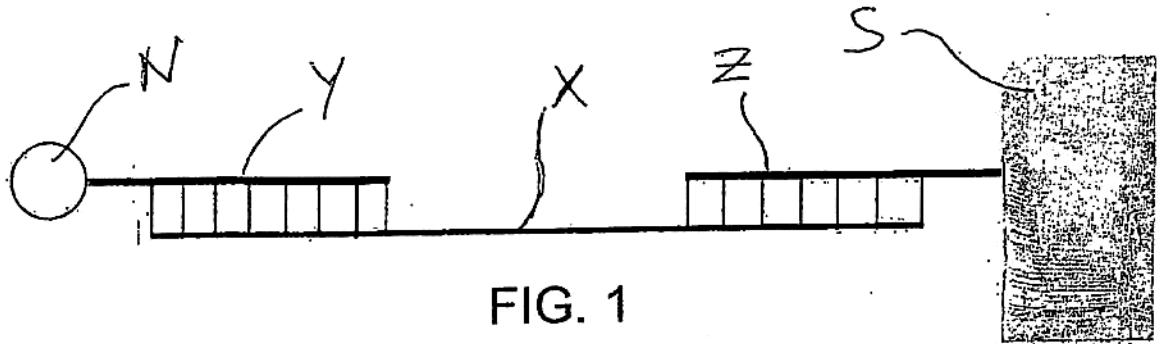


FIG. 1

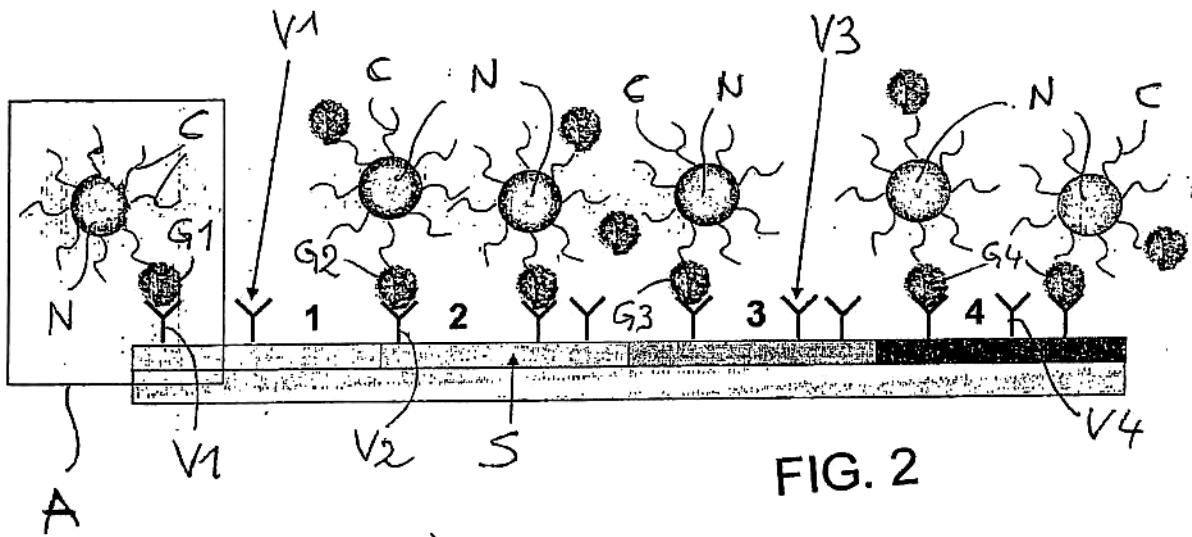


FIG. 2

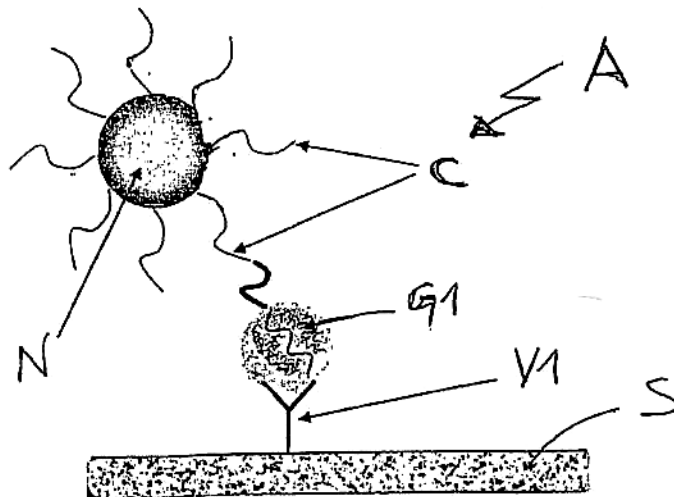


FIG. 3