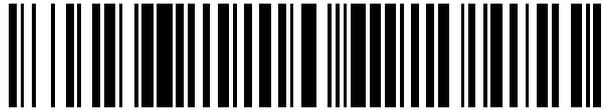


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 628**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2003 E 03813383 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013 EP 1570043**

54 Título: **Dispositivo y método para pruebas de sangre en línea usando biochips**

30 Prioridad:

**12.12.2002 US 432665 P**  
**23.12.2002 US 435287 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.11.2013**

73 Titular/es:

**NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS, INC.**  
**(100.0%)**  
**4560 HORTON STREET**  
**EMERYVILLE, CA 94608, US**

72 Inventor/es:

**CHIEN, DAVID y**  
**PHELPS, BRUCE**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO FACES, José**

**ES 2 428 628 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Dispositivo y método para pruebas de sangre en línea usando biochips

**5 Antecedentes de la invención**

La invención se refiere al campo de cribado sanguíneo y proporciona mejoras que permiten que se realice un cribado más completo, preciso y práctico, para detectar la presencia de moléculas dianas que indican la presencia de un patógeno, agente infeccioso o enfermedad metabólica. Más específicamente, la invención proporciona un método y sistema para cribado sanguíneo en línea, donde un dispositivo de captura de cribado desmontable en línea con biochips se proporciona entre una aguja de recogida de sangre y una bolsa de recogida de sangre, de tal manera que la sangre recogida fluya a través del dispositivo de captura de cribado y contacte con los biochips antes de que se recoja en la bolsa de recogida de sangre. Alternativamente, los biochips se proporcionan en una entrada de la bolsa de recogida de sangre, dentro de la bolsa de recogida de sangre o dentro de una bolsa de recogida de sangre con desviación separada.

Actualmente, los bancos de sangre usan varios ensayos individuales para analizar la presencia de múltiples agentes o moléculas asociadas con o indicativas de una enfermedad o condición. Agentes o moléculas ejemplares incluyen anticuerpos I/II anti-VHI, anticuerpos anti-VHC, antígeno de superficie VHB, anticuerpos anti-núcleo HB, enzima del hígado (ALT), sífilis y antígeno P24 VIH. Además, pueden detectarse agentes infecciosos tales como bacterias y hongos patógenos, priones y protozoos, que incluyen los agentes causantes de viruela, malaria, enfermedad del Nilo Occidental, enfermedad de Chagas, y variante de enfermedad de Creutzfeldt Jacob (CJD). También, pueden detectarse agentes no infecciosos tales como moléculas que indican desordenes metabólicos, que incluyen las moléculas medidas en varios paneles de metabolitos, que incluyen un panel lípido (colesterol, triglicéridos, LDLs y HDLs), panel de hormona de la glándula tiroideas (T3, T4, TBP y TSH) y panel de la enzima del hígado (ALT(alanina aminotransferasa), ALP (fosfatasa alcalina), AST (aspartato aminotransferasa), GGT (gamma-glutamil transferasa), LDH (deshidrogenasa del ácido láctico), bilirrubina y albúmina).

Los métodos actuales conllevan la recogida de sangre directamente en una bolsa de recogida de sangre por medio de una aguja de recogida de sangre y un conducto recolector, con una fracción de la sangre recogida segregándose cada minuto a otro compartimento para fines de análisis/cribado.

Los métodos actuales de cribado sanguíneo conllevan, por lo tanto, analizar una parte muy pequeña, o muestra, de la sangre recogida y puede no detectar de manera efectiva analitos que están escasamente dispersos en la sangre. Algunos problemas potenciales de analizar pequeñas muestras incluyen (1) distribución no homogénea del agente de la prueba (o analito), (2) microsegregación de los analitos y/o unión de los analitos con las proteínas del suero, y (3) contaminación cruzadas entre muestras recogidas para las varias pruebas que pueden realizarse, tales como en los ensayos de tecnología de ácido nucleico (NAT).

Además, la realización de múltiples ensayos individuales requiere un tiempo y esfuerzo duplicados porque la muestra debe prepararse y etiquetarse para cada ensayo individual. Además, la realización de múltiples ensayos individuales agrava el problema de etiquetar y seguir apropiadamente muestras de sangre de manera que puedan correlacionarse con el paciente o donante correcto. Por lo tanto, pueden resultar errores e inexactitudes de errores administrativos en el etiquetado, correlación y almacenaje de información generada por los múltiples ensayos individuales. Otro problema es que puede usarse demasiada sangre para las pruebas porque se requiere una muestra separada para cada una de las varias pruebas que se realizarán.

Además, la separación de una muestra de sangre recogida en partes para múltiples ensayos individuales aumenta el potencial de contaminación, debido a la manipulación adicional requerida. Por supuesto, la gestión de múltiples ensayos individuales también aumenta el riesgo de que al menos un ensayo se corrompa por la contaminación.

WO 99/56630 desvela un único dispositivo de recogida y análisis de fluido corporal integrado con componente de transferencia de muestra. La parte de recogida y la parte de análisis del dispositivo están permanentemente unidas para permitir el movimiento de pequeñas cantidades de fluido corporal bajo condiciones controladas.

GB 2339903 desvela un recipiente de fluido en forma de una bolsa de plástico flexible que contiene sangre. El recipiente de fluido tiene una entrada/salida y una válvula de sellado y está en comunicación con una dispositivo de prueba de diagnóstico de múltiples usos.

**Breve resumen de la invención**

La presente invención proporciona dispositivos de captura de cribado de acuerdo con las reivindicaciones independientes 1 y 2; un sistema de cribado de acuerdo con la reivindicación 25; y un método de cribado sanguíneo en línea de acuerdo con la reivindicación independiente 41.

La presente invención proporciona una nueva tecnología de plataforma para cribar sangre. La tecnología asegura que se analice una fracción mucho más grande de sangre recogida, incluso cada gota. Bajo métodos previos de cribado, solamente fracciones muy pequeñas de aproximadamente 450 ml de sangre recogida se usaron para cribado. Por ejemplo, se usaron 0,5 ml para análisis NAT, 20 µl individualmente para análisis anti-VIH I/II, anti-VHC, anti-núcleo HB, ALT y sífilis y 100 µl individualmente para análisis HbsAg y VIH p24. El uso de fracciones tan pequeñas crea un riesgo en el muestreo, porque las fracciones pueden no ser representativas del volumen completo de sangre recogida. Es decir, los agentes de enfermedades que están escasamente dispersos en la sangre recogida pueden no estar contenidos en una fracción o volumen pequeño. La presente invención aborda este problema al asegurar un cribado más minucioso y más completo de sangre recogida. La presente invención también permite que se puedan realizar a la vez pruebas para cientos de agentes o moléculas, en lugar de pruebas para un pequeño número de agentes o moléculas en ensayos separados.

La presente invención proporciona al menos las siguientes ventajas en comparación con los procedimientos actualmente conocidos para cribar sangre:

(1) El proceso de cribado usa una técnica de captura en línea; por lo tanto, casi no se pierde sangre recogida porque prácticamente cada gota que va a la bolsa de recogida fluye a través de, o alternativamente una muestra grande de la sangre contacta con, el dispositivo de captura de cribado y/o biochips proporcionados por la invención.

(2) La invención permite el uso de un sistema de ensayo múltiple; todos los ensayos pueden funcionar en uno o más de los biochips que contactan con la sangre.

(3) La invención puede emplear biochips de baja densidad, de manera que al añadir dianas adicionales, tales como componentes de nuevas enfermedades emergentes, es más fácil y más eficiente.

(4) Los ensayos de la invención son rápidos, debido a los tiempos de reacción minimizados que resultan del uso de micro-volumenes de muestra en un procesador de biochip.

(5) El sistema de cribado de "laboratorio en un chip" de la invención proporciona un ambiente confinado para hacer funcionar múltiples ensayos. La unidad de captura de cribado y la unidad de procesamiento de chipo están autoselladas, consumen poco espacio y reducen la oportunidad de error humano y/o contaminación que pueden ocurrir al exponer la muestra al ambiente circundante o la manipulación de la muestra adicional requerida para realizar múltiples ensayos individuales.

(6) Los sistemas de detección emplean tecnología que no solamente puede detectar la presencia de una secuencia indicativa de una enfermedad, sino que también puede detectar diferentes genotipos de cada agente así como mutaciones puntuales de las dianas capturadas.

(7) La invención puede emplear ensayos que proporcionan una lectura cuantitativa, tal como el control del número de ciclo de PCR. Por ejemplo, la tecnología PCR Taqman funciona sobre tal principio. Al usar un estándar, o calibrador (es decir, con un número de copia conocido) y al comparar una muestra de prueba con el estándar, es posible obtener un resultado cuantitativo.

#### Breve descripción de los dibujos

Los dibujos acompañantes, que se incorporan y constituyen una parte de la especificación, ilustran las realizaciones de la invención preferentes en el presente. Junto con la descripción general dada anteriormente y la descripción detallada dada más abajo, los dibujos sirven para explicar principios de la invención.

La Fig. 1A muestra una realización de la invención como un dispositivo de captura de cribado autónomo (10) como parte de un sistema de recogida de sangre del paciente a la bolsa de recogida de sangre.

La Fig. 1B ilustra una realización alternativa, en la que el dispositivo de captura de cribado que contiene uno o más biochips está situado dentro de una bolsa de recogida de sangre con desvío.

La Fig. 2 ilustra una vista más detallada del dispositivo de captura de cribado (10) en relación con la entrada de sangre (30) y el embudo (35) y filtro (40) cuando la sangre drena del filtro al conducto recolector.

La Fig. 3 ilustra un ejemplo de las varias dimensiones de los componentes del dispositivo de captura de cribado (10).

La Fig. 4A ilustra una disposición de diferentes analitos sobre una matriz tridimensional de una manera lineal latitudinal (en la dirección de flujo de sangre 20a).

La Fig. 4B muestra una matriz tridimensional usando tecnología Hypogel que aumenta el espacio para

conjugación/captura y sensibilidad.

La Fig. 4C muestra una matriz tridimensional como un biochip de cristal con pozos que contienen protuberancias en forma de vellosidades.

La Fig. 4D muestra otra realización de un biochip de cristal en el que la superficie completa del biochip es rugosa con protuberancias en forma de vellosidades.

La Fig. 5 muestra un ejemplo de biochip (20) producido por el Centro de Recursos de Selección Genética de la Universidad de Rockefeller que está diseñado para realizar un ensayo de sistema NAT.

La Fig. 6 ilustra la extracción de un dispositivo de captura de cribado (10) de un aparato de recogida de sangre.

La Fig. 7A ilustra un bioprocesador sellado que contiene dos secciones separadas selladas una de la otra, una para procesar un biochip NAT y otra para procesar un biochip de inmunoensayo.

La Fig. 7B ilustra una realización alternativa del bioprocesador en el que hay solamente un biochip con dos secciones separadas una de la otra, una para procesar el biochip NAT y una para procesar el biochip de inmunoensayo.

La Fig. 8 ilustra la relación de recipientes de reagente con los bioprocesadores.

La Fig. 9 ilustra una vista detallada de cámaras de reacción PCR y RT-PCR y la relación con los canales de reacción, que contienen dispositivos para prevenir el retroflujo de reagentes. Además, se muestran las relaciones de las cámaras de reacción con las cámaras de amplificación a la cámara de microfluidez.

La Fig. 10 ilustra una sección transversal de un canal microfluídico que contienen sustancias para preservar poli DT con una señal detectable.

La Fig. 11A ilustra una visión general de la parte de inmunoensayo del procesador del biochip como se muestra en las Figs. 7A y 7B para capturar y detectar anticuerpos en la sangre.

La Fig. 11B ilustra una realización de un método de detección de anticuerpos que utiliza canales de microfluidez especialmente recubiertos que contienen IgG anti-humano que están modificados de los canales de microfluidez de la Fig. 11A.

La Fig. 11C ilustra un método de detección de anticuerpos que utiliza canales de microfluidez especialmente recubiertos que contienen antígeno específico para un anticuerpo dirigido contra una enfermedad que tiene que detectarse que están modificados de los canales de microfluidez de la Fig. 11A.

La Fig. 12 ilustra una visión general de la parte de inmunoensayo del procesador de biochip como se muestra en las Figs. 7A y 7B para capturar y detectar antígeno en la sangre.

La Fig. 13 ilustra un aparato para simular condiciones de extracción de sangre, en el que la sangre se bombea a través de un biochip.

La Fig. 14 muestra que un biochip recubierto con un anticuerpo monoclonal contra antígeno VIH P-24 capturó el antígeno.

La Fig. 15 muestra que un biochip recubierto con proteína núcleo VIH P-24 capturó anticuerpos monoclonales anti-P-24.

### Descripción detallada de la invención

La siguiente descripción describe un sistema para cribar sangre y varios componentes de un sistema de cribado sanguíneo, incluyendo dispositivos de captura de cribado, sistemas de captura, sistemas de amplificación y sistemas de detección para agentes o componentes dianas de interés. El sistema está diseñado para detectar agentes y moléculas dianas asociados con o indicativos de una enfermedad, una condición o contaminación en sangre. Los agentes y moléculas dianas pueden estar asociados con patógenos, incluyendo virus, bacterias, hongos y priones. Tales agentes y moléculas dianas incluyen VIH (virus de la inmunodeficiencia humana) y proteínas asociadas, tales como GP120, núcleo P24, núcleo p44 y P31, y fragmentos de los mismos; VHB (virus de la hepatitis B) y proteínas asociadas, tales como núcleo, HbeAG, HbsAg, S1 y S2 y fragmentos de las mismas; y VHC (virus de la hepatitis C) y proteínas asociadas, tales como núcleo (C22), envoltura (E1E2), y NS3, NS4 y NS5 y fragmentos de las mismas; moléculas de ácido nucleico, tales como VHC (tal como en la región NTR), VIH (tal como región LTR o región de gen pol), y VHB (tal como la región pres S1/2 y S). además, los agentes dianas incluyen parvovirus B19, HGV (GBV-C), TTV, SEN-V, HHV-8, nvCJD, vCJD (prión), especie de Plasmodium, el agente causante de malaria,

especies de Flavivirus, los agentes causantes del virus del Nilo Occidental, encefalitis de San Luis, encefalitis japonesa, virus de fiebre amarilla, virus del Dengue. Además, los agentes y moléculas dianas incluyen componentes o factores sanguíneos, tales como ABO, factor RhD y anticuerpos de glóbulos rojos irregulares. El sistema emplea proteínas recombinantes para la detección de anticuerpos, anticuerpos monoclonales y policlonales para la detección de antígenos, y ácidos nucleicos para la detección de ácido nucleico.

### **Diseño del dispositivo de captura de cribado**

Como se ha señalado, la invención proporciona dispositivos de captura de cribado de acuerdo con las reivindicaciones independientes 1 y 2 para el cribado en línea de sangre que se recoge usando una aguja de recogida conectada mediante un conducto de recogida a una bolsa de recogida. El cribado “en línea” se refiere a la habilidad para cribar sangre cuando se recoge de un donante, y es posible por el uso de un dispositivo de captura de cribado con flujo de movimiento continuo. Por consiguiente, el dispositivo de captura de cribado inventivo comprende una caja que tiene una entrada para sangre recogida desde la aguja de recogida y una salida que drena la sangre desde el dispositivo de captura de cribado al conducto de recogida; la caja aloja una unidad de biochip que captura agentes o moléculas dianas de la sangre. En una realización la entrada del dispositivo de captura de cribado está directamente conectada al extremo trasero de la aguja de recogida, lo que significa que el dispositivo de captura de cribado está conectado distal al extremo de la aguja de recogida que se inserta en el donante. Alternativamente, la entrada del dispositivo de captura de cribado está conectada, a través de un conducto de recogida, próxima a la aguja de recogida, de manera que la temperatura de la sangre en el dispositivo de captura de cribado sea aproximadamente 37 °C. En otra realización más, el dispositivo de captura de cribado está situado en una entrada de la bolsa de recogida de sangre e incluso dentro de la bolsa.

En una realización, la unidad del biochip del dispositivo de captura de cribado contiene un primer biochip y un segundo biochip que están secuencialmente dispuestos entre la entrada y la salida, de tal manera que la sangre primero fluye a través del primer biochip, y después fluye a través del segundo biochip. En tal disposición, los biochips pueden estar dispuestos de un extremo a otro, de lado a lado, o de una manera apilada en paralelo. Alternativamente, los biochips pueden estar dispuestos de manera no secuencial. Preferentemente, las dimensiones del dispositivo de captura de cribado están diseñadas de tal manera que una velocidad de flujo de sangre que fluye a través del dispositivo de captura de cribado sea aproximadamente igual a la velocidad de flujo de la sangre recogida en ausencia del dispositivo de captura de cribado. En una realización, las dimensiones del dispositivo de captura de cribado están diseñadas de tal manera que la velocidad de flujo de la sangre que fluye a través del dispositivo de captura de cribado sea aproximadamente 450 ml por 10 minutos. El dispositivo de captura de cribado está preferentemente diseñado de tal manera que las dimensiones de la entrada, la salida, el área de superficie de biochips en la unidad del biochip, y la caja del dispositivo de captura de cribado permitan que la sangre recogida mantenga una velocidad constante de flujo a través del dispositivo de captura de cribado. La salida incluye opcionalmente un embudo y un filtro. En una realización, el dispositivo de captura de cribado comprende además un dispositivo anti-retroflujo que previene que la sangre fluya hacia atrás hacia la entrada. En una realización más, la entrada y salida están diseñadas para sellarse cuando el dispositivo de captura de cribado se retira de la aguja de recogida y del conducto de recogida. Pueden emplearse varios medios para sellar la entrada y salida, incluyendo clavijas, tapas, sellos de calor, abrazaderas, soldaduras y demás.

Como se usa en la descripción de esta invención, “biochip” se refiere a un dispositivo que comprende un sustrato que incorpora uno o más analitos, o componentes de reconocimiento biológico. Por ejemplo, los biochips incluyen dispositivos de medición que incorporan un analito en o con dispositivos que se preparan usando tecnologías de microlitografía o micromatrices. Los analitos incluyen ADN, ARN y proteínas (incluyendo enzimas, anticuerpos, receptores y sus fragmentos funcionales y equivalentes biomiméticos), orgánulos subcelulares, células y tejidos. El “biochip” puede tomar cualquier forma que proporcione un sustrato para incorporar analitos. De este modo, los biochips pueden tener forma de un chip, una gota, un gel, una micropartícula, una membrana, una lámina, una placa, una bola pequeña, un disco, un capilar, una fibra hueca, una aguja, una fibra sólida u otra forma capaz de proporcionar un sustrato para capturar agentes o moléculas dianas.

Los biochips pueden comprender una amplia variedad de composiciones, incluyendo cristal, plástico, silicio, oro derivado de alcanotiolato, celulosa, poliestireno poco entrecruzado y muy entrecruzado, gel de sílice, poliamida y similares.

Los biochips preferentemente son capaces de soportar una micromatriz. El término “micromatriz” se refiere al panel de analitos, o componentes de reconocimiento biológico, usados para análisis, y a la representación bidimensional ordenada del panel sobre un biochip. Los “biochips de baja densidad” contienen micromatrices de menos de 100 analitos. Los “biochips de densidad media” contienen micromatrices de 100 a 1000 analitos. Los “biochips de alta densidad” contienen micromatrices de más de 1000 analitos.

El dispositivo de captura de cribado inventivo se usa para capturar, sobre un biochip, uno o más agentes o moléculas dianas que comprenden al menos una proteína o molécula de ácido nucleico, o un fragmento de la misma, indicativa de o específica para una enfermedad o un agente infeccioso. Los agentes o moléculas dianas pueden ser antígenos, incluyendo proteínas virales, proteínas bacterianas, proteínas priones, anticuerpos y

5 complejos anticuerpo-antígeno; células bacterianas completas; células fúngicas completas; virus completos, o ácidos nucleicos, particularmente ADN. Para capturar dianas, el biochip contiene analitos, o componentes de reconocimiento biológico, que se unen con los agentes o moléculas dianas. Estos analitos pueden ser proteínas, incluyendo antígenos y anticuerpos, péptidos pequeños, oligonucleótidos, lectinas, moléculas orgánicas pequeñas, complejos metálicos inorgánicos, iones, péptidos modificados o peptidomiméticos. La selección de analitos particulares para unirse con agentes o moléculas dianas particulares es bien conocida por el experto o artesano en este campo.

10 El primer biochip del dispositivo de captura de cribado es un biochip de técnica de amplificación de ácido nucleico (NAT), en la que pueden funcionar múltiples ensayos. El primer biochip captura al menos un organismo o célula infecciosa que contiene una molécula de ácido nucleico dirigida. El organismo infeccioso puede ser un virus, bacteria, hongo, protozoo, micoplasma o prión. La célula es una célula del donante de la muestra sanguínea. El primer biochip contendrá uno o más analitos para capturar agentes o moléculas dianas. Estos analitos pueden ser proteínas, incluyendo antígenos y anticuerpos, péptidos pequeños, oligonucleótidos, lectinas, moléculas orgánicas pequeñas, complejos metálicos inorgánicos, iones, péptidos modificados o peptidomiméticos. Los analitos deberían poseer elevada afinidad de enlace para agentes o moléculas dianas, y no deberían drenar a la sangre. Pueden emplearse múltiples analitos con diferentes naturalezas químicas sobre el mismo biochip para conseguir captura y cribado simultáneos para múltiples dianas.

20 El segundo biochip del dispositivo de captura de cribado es un chip de inmunoensayo, sobre el que pueden funcionar múltiples ensayos. El segundo biochip captura antígenos y/o anticuerpos dianas. El segundo biochip también contendrá uno o más analitos para capturar agentes o moléculas dianas. Estos analitos también pueden ser proteínas, incluyendo antígenos y anticuerpos, péptidos pequeños, oligonucleótidos, lectinas, moléculas orgánicas pequeñas, complejos metálicos inorgánicos, iones, péptidos modificados o peptidomiméticos. Los analitos deberían poseer elevada afinidad de enlace para agentes o moléculas dianas, y no deberían drenar a la sangre. De nuevo, pueden emplearse múltiples analitos con diferentes naturalezas químicas sobre el mismo biochip para conseguir captura y cribado simultáneos para múltiples dianas.

30 En una realización, el primer y segundo biochip son biochips de baja densidad. En una realización más, el primer y segundo biochip son micromatrices que tienen los analitos que se enlazan con los agentes o moléculas dianas dispuestos a lo largo de la longitud de los biochips en la dirección del flujo sanguíneo sobre el primer y segundo biochip, respectivamente. Los analitos preferentemente se enlazan covalentemente con los biochips.

35 Más que contener dos biochips, el dispositivo de captura de cribado puede contener alternativamente un único primer biochip que es un biochip NAT o es un biochip de inmunoensayo o constituye tanto un biochip NAT como un biochip de inmunoensayo. Por ejemplo, un biochip que captura patógenos completos puede usarse para detectar ambas dianas de antígeno, mediante técnicas de detección de inmunoensayos, y dianas de ácido nucleico, mediante técnicas de detección NAT.

40 La superficie de biochips usados en la invención puede estar compuesta por cualquier material que permita unión covalente de ácido nucleico y/o proteínas, preferentemente en una alta densidad. Materiales ejemplares son cristal, cuarzo, biopolímeros y nanocristales semiconductores, tales como puntos cuánticos o gotas cuánticas. Cualquiera de estos materiales puede tener modificaciones en la superficie para mejorar su actuación.

45 En algunas realizaciones, el dispositivo de captura de cribado comprende una o más membranas semipermeables que aíslan los componentes celulares de la sangre del biochip, donde ocurren los hechos de enlace entre los componentes de reconocimiento biológico y los agentes o moléculas dianas. Tales membranas son permeables para agentes y moléculas dianas, pero no para células sanguíneas. Para proteger la integridad de los componentes celulares en sangre, las membranas pueden colocarse corriente arriba de un biochip o pueden envolver completamente un biochip. Las membranas pueden operar en base a la exclusión por tamaño u otro principio funcional. El fin dicta la selección de una membrana particular. Por ejemplo, las membranas que comprenden un tamaño de poro de entre 500 angstroms y 5 micrones, preferentemente 1 micrón, permitirán pasar las particular virales y las moléculas dianas, pero no las células sanguíneas.

55 También puede emplearse una o más membranas semipermeables para prevenir que los materiales drenen del dispositivo de captura de cribado a la sangre recogida. Usadas en este contexto, las membranas semipermeables permiten que las células pasen, pero no las proteínas o las células pequeñas. Para proteger que la sangre recogida de los materiales drene del dispositivo de captura de cribado, las membranas pueden colocarse corriente abajo de un biochip o pueden envolver completamente un biochip.

60 El dispositivo de captura de cribado puede comprender una tapa que puede retirarse robóticamente para facilitar la extracción secuencial robótica del primer biochip y del segundo biochip.

65 En una realización, el dispositivo de captura de cribado de la invención aloja biosensores capaces de soportar un ensayo de cribado que "actúa por sí mismo". Por ejemplo, células B manipuladas con anticuerpos de superficie específicos para agentes o moléculas dianas pueden unirse al biochip. Las células B manipuladas expresan

aequorina citosólica, una proteína bioluminiscente sensible al calcio de la medusa *Aequoria victoria*. Una vez que se enlaza con la célula B, provocará una elevada concentración de calcio intracelular, que iluminará aequorina. Véase, por ejemplo, Rider et al., Science, 301: 213-215 (2003). Un ensayo de cribado que “actúa por sí mismo” es particularmente ventajoso cuando el dispositivo de captura de cribado está situado dentro de una bolsa de sangre, porque los resultados del ensayo pueden determinarse sin abrir la bolsa y de ese modo contaminar potencialmente sus contenidos. También permite un control continuo de una muestra de sangre, de manera que pueden detectarse los patógenos que crecen conforme avanza el tiempo.

En otro aspecto, la invención proporciona un sistema de cribado para cribado en línea de sangre recogida usando una aguja de recogida conectada mediante un conducto de recogida a una bolsa de recogida. El sistema de cribado comprende un dispositivo de captura de cribado como el descrito en el presente documento y al menos un procesador de biochip para amplificar y/o detectar al menos un agente o molécula diana detectado. El sistema de cribado puede contener múltiples procesadores de biochips.

En una realización, el procesador de biochip del sistema de cribado comprende una unidad desechable sellada que tiene una parte de técnica de amplificación de ácido nucleico (NAT) para procesar un biochip y/o una parte de inmunoensayo para procesar un biochip.

Para detectar moléculas dianas de ácido nucleico, la parte NAT del procesador de biochip puede comprender un recipiente para biochip, uno o más depósitos para mantener un agente o molécula diana eluida o lisada, es decir, una muestra, una o más cámaras de reacción de amplificación conectadas al depósito, y uno o más componentes de detección conectados a la cámara de reacción de amplificación. La parte NAT puede además comprender uno o más recipientes para reagente conectados al depósito y uno o más recipientes para reagente conectados a la cámara de reacción. La parte NAT puede además comprender un biochip contenido en el recipiente para biochip. En una realización, el biochip se mantiene de tal manera que los analitos están en contacto al menos con un tampón de elusión y lisis. El componente de detección de la parte NAT del procesador de biochip puede comprender una o más cámaras de microfluidez.

Para detectar moléculas dianas de anticuerpo y/o antígeno, la parte de inmunoensayo del procesador de biochip puede comprender un recipiente para biochip, uno o más depósitos para mantener un agente o molécula diana eluida o lisada, es decir, una muestra, una o más cámaras de reacción conectadas al depósito, y uno o más componentes de detección conectados a la cámara de reacción. La parte de inmunoensayo puede además comprender uno o más recipientes para reagente conectados al depósito y uno o más recipientes para reagente conectados a la cámara de reacción. La parte de inmunoensayo puede además comprender un biochip contenido en el recipiente para biochip. En una realización, el biochip se mantiene de tal manera que los analitos unidos están en contacto al menos con un tampón. El componente de detección de la parte de inmunoensayo del procesador de biochip puede comprender una o más cámaras de microfluidez. El procesador de biochip comprende generalmente al menos dos cámaras de reacción, una para la detección de un anticuerpo diana y una para la detección de un antígeno diana. El procesador de biochip está diseñado para que cada cámara de reacción esté conectada al menos con un componente de detección que comprende una o más cámaras de microfluidez.

En un aspecto relacionado, la invención proporciona métodos para cribar sangre recogida de un donante usando una aguja de recogida conectada mediante un conducto de recogida a una bolsa de recogida. Los métodos emplean los dispositivos de captura de cribado y los sistemas de cribado descritos en el presente documento. Un método comprende las siguientes etapas: (a) proporcionar un dispositivo de captura de cribado que comprende: una entrada para sangre recogida de una aguja de recogida, una unidad de biochip que captura un agente o molécula diana de la sangre recogida, y una salida que drena la sangre del dispositivo de captura de cribado a un conducto de recogida; (b) insertar el dispositivo de captura de cribado entre la aguja de recogida y el conducto de recogida próximo a la aguja de recogida de manera que la sangre que fluya a través del dispositivo de captura de cribado esté aproximadamente a la temperatura de un cuerpo humano, y (c) permitir que la sangre fluya a través del dispositivo de captura de cribado. El método puede además comprender (d) extraer el dispositivo de captura de cribado sellado para seguir procesando la unidad de biochip.

En algunas realizaciones, el método comprende además (a) abrir el dispositivo de captura de cribado para extraer la unidad de chip, e (b) insertar la unidad de biochip en un procesador de biochip para procesamiento. Estas etapas pueden realizarse robóticamente.

Cuando la molécula diana es un ácido nucleico, el procesador de biochip comprende una parte de técnica de amplificación de ácido nucleico (NAT) para procesar el biochip. Esta parte NAT puede comprender un recipiente para biochip para mantener el biochip, uno o más depósitos para mantener una muestra eluida del biochip, una o más cámaras de reacción de amplificación conectadas al depósito, y uno o más componentes de detección conectados a la cámara de reacción de amplificación. La parte NAT puede además comprender uno o más recipientes para reagentes conectados al depósito.

En tales casos, el método comprende además contactar el biochip con al menos un tampón del recipiente para biochip que eluye y lisa los agentes y moléculas dianas capturados del biochip para formar una solución que se

recoge en el depósito. El método comprende además mover una solución en el depósito a la cámara de reacción de amplificación, proporcionando uno o más recipientes para reagente que contienen reagentes de amplificación de ácido nucleico y permitiendo que los reagentes de amplificación fluyan a la cámara de reacción de amplificación que contiene la solución, proporcionando condiciones suficientes para amplificar al menos una molécula de ácido nucleico en la solución, y detectando la presencia de la molécula de ácido nucleico amplificada en el componente de detección. En una realización, el componente de detección comprende una o más cámaras de microfluidez para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico amplificada por una hibridización de ácido nucleico y detección de señal. Pueden utilizarse más de un procesador de biochip en paralelo.

Cuando la molécula diana es un anticuerpo o antígeno, el procesador de biochip comprende una parte de inmunoensayo para procesar el biochip. Esta parte de inmunoensayo puede comprender un recipiente para biochip para mantener el biochip, uno o más depósitos para mantener una muestra eluida del biochip, una o más cámaras de reacción conectadas al depósito, y uno o más componentes de detección conectados a la cámara de reacción. La parte de inmunoensayo puede además comprender uno o más recipientes para reagentes conectados a la reserva.

En tales casos, el método comprende además contactar el biochip con al menos un tampón del recipiente para biochip que eluye las moléculas dianas capturadas del biochip para formar una solución que se recoge en el depósito. El método comprende además mover una solución en el depósito a la una o más cámaras de reacción, proporcionando uno o más recipientes para reagente que contienen un reagente que comprende un antígeno unido a un sistema de amplificación de señal o un anticuerpo unido a un sistema de amplificación de señal permitiendo que los reagentes fluyan a la cámara de que contiene la solución, proporcionando condiciones suficientes para permitir en enlace del reagente con un anticuerpo o antígeno diana en la solución, y detectando la presencia del anticuerpo o antígeno diana en el componente de detección. En una realización, el método utiliza un componente de detección que comprende una o más cámaras de microfluidez para detectar la presencia de la señal al enlazarse con un anticuerpo inmovilizado en la pared de la cámara. En una realización, el método emplea al menos dos cámaras de reacción, una para la detección de un anticuerpo diana y una para la detección de un antígeno diana. Cada cámara de reacción está conectada con al menos un componente de reacción que comprende una o más cámaras de fluidez. También, pueden utilizarse más de un procesador de biochip en paralelo.

La referencia a las figuras proporcionará una comprensión más completa de los dispositivos de captura de cribado y sistemas de cribado. Como se muestra en la Fig. 1A, la invención proporciona un dispositivo de captura de cribado autónomo (10) que es desmontable y está preferentemente asegurado entre una aguja de recogida (100) y un conducto de recogida (150) que transfiere la sangre recogida a un receptáculo o recipiente de recogida, por ejemplo, una bolsa de sangre (200). La Fig. 1A es solamente ejemplar, y un experto en la técnica reconocerá varias alternativas y mejoras, que la invención también abarca. El dispositivo de captura de cribado (10) está preferentemente situado cercano al donante de sangre, preferentemente conectado directamente a la aguja de recogida (100) (por ejemplo, cerca de o en el extremo trasero de la aguja) para asegurar que la temperatura de la sangre siga siendo cerca de 37 °C o una temperatura apropiada para una captura efectiva de agentes o componentes diana de interés (por ejemplo, antígenos/anticuerpos y complejos de ácido nucleico).

En una disposición alternativa, como se muestra en la Fig. 1B, el dispositivo de captura de cribado puede también estar situado dentro de la bolsa de sangre (200). Esta disposición es particularmente ventajosa en un sistema en el que la sangre del donante se recoge en múltiples bolsas de sangre. En tal sistema, el dispositivo de captura de cribado puede estar dispuesto en línea con una primera bolsa de recogida o bolsa con desvío que recoge la sangre inicial recogida de un sujeto. Por ejemplo, en la primera bolsa pueden recogerse 10-40 ml. La primera bolsa puede después retirarse o rodearse para que el resto de la sangre recogida se almacene en una o más bolsas adicionales de sangre. La bolsa que contiene el biochip puede después colocarse sobre un agitador lento para maximizar el contacto del biochip con la sangre.

Esta configuración múltiple de bolsa, con el biochip contenido en la primera bolsa que recoge sangre, proporciona varias ventajas. En primer lugar, la contaminación bacteriana potencial de la piel del donante de sangre puede recogerse en la primera bolsa de manera que la segunda y posteriores bolsas están libres de o tienen muy poca contaminación bacteriana. En segundo lugar, el biochip o biochips contenidos en línea con la primera bolsa, al estar situados en la parte superior de o dentro de la primera bolsa, pueden mantenerse en contacto con la sangre durante una duración más larga de tiempo a cualquier temperatura deseada antes de elución y pruebas.

Un experto en la técnica reconocerá que los principios de disponer el biochip o los biochips en la primera bolsa también pueden extenderse a colocar biochips en las primeras pocas bolsas que recogen sangre si se desea un procesamiento o análisis diferente para el biochip o biochips en las bolsas separadas. Por ejemplo, pueden colocarse biochips en las primeras dos o más bolsas, con sangre adicional que se recoge en una o más bolsas adicionales después de que las dos primeras o más bolsas se hayan desconectado o rodeado secuencialmente.

Como se muestra en la Fig. 2, en una realización, el dispositivo de captura de cribado (10) está diseñado como una caja pequeña que contiene una entrada (30), una unidad de biochip (15) (mostrada con dos biochips (20) y (25)), y un embudo (35) con un filtro (40) en la parte inferior. La Fig. 2 es solamente ejemplar y un experto en la técnica reconocerá varias alternativas y mejoras, que la presente invención también incluye. La sangre fluirá desde

la aguja de recogida (100) a través del tubo recolector (150) y después a través de las cámaras del dispositivo de captura de cribado (10), y fuera del fondo del dispositivo de captura de cribado (10) (por medio del embudo (35)), a la bolsa de sangre (200). Como una alternativa, el dispositivo de captura de cribado (10) puede estar directamente conectado a la aguja de recogida (100) (por ejemplo, en una parte trasera de la misma) para que la sangre recogida fluya directamente desde la aguja de recogida (100) al dispositivo de captura de cribado (10) antes de entrar al conducto de recogida, o tubo, (150), para su transmisión a la bolsa de sangre (200).

Preferentemente, el dispositivo de captura de cribado (10) está unido de manera desmontable a la aguja de recogida (100) o el conducto de recogida (150) para que el dispositivo de captura de cribado (10) pueda extraerse para seguir procesándose después de que la sangre se haya recogido. Además, el dispositivo de captura (10) está unido a la aguja de recogida (100) o el conducto de recogida (150) lo más cerca posible al donante de sangre para que la sangre que fluye a través del dispositivo de captura de cribado (10) esté lo más cerca posible a la temperatura de un cuerpo humano (aproximadamente 37 °C o 98,6 °F).

Como se muestra en la Fig. 2, preferentemente un primer biochip (20) se coloca de manera segura suspendido en un plano paralelo a y por encima de un segundo biochip (25). Debajo del segundo biochip (25), están dispuestos un embudo (35) y un filtro (40), preferentemente con poros de alrededor de 100 a 200 micrones, que permite que la sangre fluya fuera del dispositivo de captura de cribado (10) al conducto de recogida (150) que está conectado a la bolsa de sangre (200). Cuando la sangre entra al dispositivo de captura de cribado desmontable (10), que está completamente sellado antes de su extracción, se fuerza que fluya a través de la superficie completa del primer biochip (20). Cuando la sangre alcanza el extremo del primer biochip (20), cae en cascada al segundo biochip (25) y fluye a lo largo de la superficie del segundo biochip (25). Después de fluir a lo largo de la superficie del segundo biochip (25), la sangre cae después en cascada al embudo (35) y filtro (40), y después al conducto de recogida (150) y a la bolsa de sangre (200). Un experto en la técnica reconocerá que el conducto de recogida (150) solamente se proporciona para que la bolsa de sangre (200) esté situada en una posición adecuada. Alternativamente, el dispositivo de captura de cribado (10) puede estar directamente conectado a la bolsa de sangre (200). El embudo (35) y el filtro (40) están preferentemente revestidos en la parte inferior del dispositivo de captura de cribado (10), que preferentemente tiene forma de un dispositivo en forma de caja. Anticoagulantes y otros aditivos de proporcionan en la bolsa de sangre (200), como es conocido por aquellos expertos en la técnica. Además, pueden instalarse dispositivos anti-retroflujo convencionales o conocidos en varias localizaciones en el recorrido de flujo de sangre que incluye la aguja de recogida (100), el dispositivo de captura de cribado (10), el conducto de recogida (150), y la bolsa de sangre (200).

El dispositivo de captura de cribado (10) puede extraerse de la aguja de recogida (100), o el conducto de recogida (150) después de que se haya completado la recogida de sangre de un donante. Esto puede llevarse a cabo, por ejemplo, sellando térmicamente la entrada y la salida del dispositivo de captura de cribado (10). El dispositivo de captura de cribado (10) puede después extraerse para más procesamientos o análisis de los biochips.

Además de la disposición "tándem" de los dos biochips, la presente invención también contempla que pueden disponerse en tándem más de dos biochips. Además, en una realización alternativa, la presente invención contempla que un único biochip, por ejemplo, un único biochip "cilíndrico" puede usarse en su lugar. En esta realización del biochip cilíndrico, por ejemplo, la mitad del biochip cilíndrico podría usarse para el ensayo NAT mientras que la otra mitad del biochip cilíndrico podría usarse para el inmunoensayo (véase Figura 1B). El tamaño y dimensiones de los biochips deberían designarse para maximizar el contacto entre la muestra de sangre y la superficie del biochip. Cuando se usa un único biochip, se usa una elución diferente (más áspera) para los ácidos nucleicos analizados mientras que se usa una elución menos áspera para los antígenos y anticuerpos analizados. Un experto en la técnica también reconocerá que mientras la realización analizada en el presente documento desvela el biochip del ensayo NAT como el primer biochip y el biochip del inmunoensayo como el segundo biochip, la disposición relativa de los biochips es intercambiable.

El aparato actual usado para recoger sangre típicamente produce una velocidad de recogida de aproximadamente 450 ml, una pinta, por 10 minutos. Para mantener esta velocidad de flujo o una velocidad de flujo similar, las dimensiones del dispositivo de captura de cribado (10) están diseñadas para que no disminuya la velocidad del flujo de sangre. De este modo, las cámaras del dispositivo de captura de cribado (10) a través de las cuales la sangre fluye están diseñadas para tener un área en sección transversal que no es más pequeña que la del tubo de recogida comúnmente usado. Además de este requisito, la altura de las cámaras debería minimizarse, y la dimensión del área de superficie correspondiente al área de superficie del biochip que contacta con la sangre debería maximizarse, para aumentar la fracción de sangre que contacta con los biochips en el dispositivo de captura de cribado (10). Como un ejemplo, dado un radio estimado de 2 mm para el tubo de recogida comúnmente usado y un altura de cámara deseada de 1 mm, los cálculos producen una anchura propuesta de 2 cm y una longitud de 2 cm para los biochips. La Fig. 3 ilustra un ejemplo de las varias dimensiones de los componentes del dispositivo de captura de cribado (10) con el fin de que el flujo de sangre a través del dispositivo de captura de cribado (10) no sea más lento que el flujo a través de los tubos de recogida (150) en ausencia del dispositivo de captura de cribado (10). Un experto en la técnica reconocerá que pueden determinarse varias dimensiones del dispositivo de captura de cribado (10) y sus componentes en base a los principios de diseño desvelados en el presente documento y todas las dimensiones se consideran que son parte de la presente invención.

**Diseño de captura**

El fin de los biochips (20), (25), en el dispositivo de captura de cribado (10) es capturar agentes o componentes de enfermedades dianas o moléculas metabólicas de la sangre. Por ejemplo, estos agentes o componentes dianas incluyen virus, células, proteínas, tales como anticuerpos, antígenos u otras proteínas que son indicativas o específicas para un agente de enfermedad, y otras moléculas que son indicativas o específicas para un agente de enfermedad o condición de enfermedad, contenidos en la sangre. Preferentemente, los biochips (20), (25) proporcionan una lectura cualitativa y cuantitativa de la identidad y nivel de los agentes o componentes dianas en la sangre. En una realización, el primer biochip es un sistema NAT (técnica de amplificación de ácido nucleico), mientras el segundo biochip (25) es un chip de inmunoensayo. Por lo tanto, el primer biochip (20) capturará virus y células que contienen al menos una molécula de ácido nucleico o complejo de ácido nucleico, asociados con agentes de enfermedad, por ejemplo, moléculas de ácido nucleico virales o bacterianas. Las células capturadas pueden poseer un epítipo viral sobre la superficie celular o estas células pueden ser de un tipo que están dirigidas por virus y que pueden identificarse por un marcador de superficie de célula específico. El segundo biochip (25) capturará virus, células, proteínas y/o complejos virales/proteicos y detectará proteínas, tales como anticuerpos para agentes o componentes de enfermedad dianas específicos o componentes o antígenos de enfermedad dianas específicos que se reconocen y se enlazan con un anticuerpo correspondiente. Preferentemente, tanto el primer como el segundo biochip son chips de densidad media o baja, cada uno con espacio para la inmovilización de varios cientos de analitos que funcionan como fracciones potenciales de enlace para los agentes o moléculas dianas. Estos analitos pueden localizarse en los respectivos biochips por un dispositivo robótico de localización.

El primer y segundo biochip descritos anteriormente pueden combinarse en un único biochip capaz de soportar un sistema de detección NAT y de inmunoensayo.

En una realización, como se muestra en la Fig. 4A, varios analitos están localizados en láminas de micromatriz de una manera lineal latitudinal, en la dirección del flujo de sangre 20a, de manera que cada analito cubre la longitud completa del biochip (20), para maximizar la interacción bioquímica o el enlace entre el agente o componente diana de interés en la sangre y la micromatriz de analito latitudinalmente dispuesta. De este modo, una de las características de la presente invención es que se proporcionan múltiples lugares para detectar analitos particulares de manera que incluso pueden detectarse analitos distribuidos no homogéneamente. Como se muestra en la Fig. 4A, por lo tanto, los respectivos elementos sonda de los analitos de interés están dispuestos latitudinalmente, o linealmente en el biochip en la dirección del flujo de sangre 20a a través del biochip (20). Preferentemente, la superficie de enlace será tridimensional para aumentar la capacidad de enlace. Por ejemplo, pueden usarse biochips tridimensionales en formato gel actualmente disponibles, siempre y cuando la filtración se minimice. Por lo tanto, la superficie seleccionada preferentemente es una superficie sólida tridimensional que proporciona más área de superficie y más capacidad de enlace, con una filtración minimizada de la superficie. Ejemplos de tales superficies son plástico, silicio, goma y resina. Sobre la superficie, pueden unirse grupos funcionales mediante unión química para permitir que ocurra diferente química de enlace con los agentes de enfermedad. La malla de superficie tiene preferentemente espacios que son submicrones en tamaño para evitar atrapar glóbulos rojos. Hypogel (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) disponible en el mercado es un ejemplo de superficie de enlace tridimensional, como se muestra en la Fig. 4B, y proporciona una matriz tridimensional que aumenta el espacio para conjugación/captura y también aumenta la sensibilidad. HypoGel® es una resina de poliestireno hidrofílica de tipo pegamento. En base a una matriz de poliestireno de entrecruzado bajo (1% DVB), oligo etilenglicoles se injertan para formar una resina hidrofílica muy cargada. Los centros reactivos están situados en el terminal de los espaciadores de glicol. Las mediciones NMR indican su elevada flexibilidad. Puede diseñarse un chip de cristal con capacidades similares al Hypogel para maximizar la captura de agentes de enfermedad, como se muestra en las Figs. 4C y 4D. La Fig. 4DC muestra un biochip de cristal con pozos. La superficie en los pozos es rugosa con pequeñas protuberancias para maximizar el área de superficie y la capacidad de enlace. La Fig. 4D muestra otra realización de un biochip de cristal en el que la superficie completa del biochip es rugosa con protuberancias en forma de vellosidades. Las protuberancias en forma de vellosidades aumenta el área de superficie para enlace y forman una superficie en forma de malla con espacios de tamaño submicrón entremedio. El material del biochip debería seleccionarse para maximizar la superficie de enlace para aumentar la capacidad de enlace, sin dar como resultado la filtración de las moléculas dianas enlazadas con el medio bio-fluídico circundante.

La Fig. 5 desvela un ejemplo de un biochip (20) producido por el Centro de Recursos de Selección Genética de la Universidad de Rockefeller que está diseñado para realizar un ensayo de sistema NAT que localiza los analitos enumerados en la caja 22, más abajo. Los analitos específicos desvelados en la caja 22 incluyen anticuerpos para capturar los complejos de antígeno y ácido nucleico, mientras que solamente los cebadores nucleicos desvelados para la captura de NAT son de la región NTR para VHC y la región LTR para VIH.

**Caja 22**  
**Analitos que se localizarán en el biochip**

5	VHC:	mAb contra núcleo (C22) mAb contra NS3, NS4, NS5	MAb contra env E1E2
10	VIH:	mAb contra GP120 mAb contra núcleo P55	mAb contra núcleo P24 mAb contra P31
15	VHB:	mAb contra núcleo mAb contra MBeAg	mAb contra MBsAg mAb contra S1 y S2
También, los propios ácidos nucleicos pueden localizarse mediante hibridización			
20	VHC:	extremo 5' NTR	
25	VIH:	región LTR	Región gen pol
25	VHB:	preS1/2 y región S	

30 Para proteger la sangre de contaminación por los analitos inmovilizados en los biochips (20), (25), los antígenos recubiertos sobre el segundo biochip (25) están preferentemente unidos covalentemente. También, con respecto al material de biochip usado así como el material usado para el resto de los componentes del dispositivo de captura de cribado (10), las consideraciones de la superficie con respecto al flujo y contaminación se consideran para maximizar el flujo de sangre a través de las varias superficies del dispositivo de captura de cribado (10) mientras se minimiza o previene la contaminación de la sangre que fluye a través del mismo. Factores tales como la densidad o pureza del elemento de matriz de analito, la unión del sustrato y la actividad biológica del material deberían considerarse para ajustarse a las necesidades de un proyecto particular de recogida de sangre y para asegurar la protección de la sangre de alteraciones o adulteraciones. Por ejemplo, puede usarse química Versalinx para conjugar las proteínas y los ácidos nucleicos en los biochips, para minimizar el filtrado de los analitos al torrente sanguíneo y a la sangre recogida en la bolsa de sangre. Versalinx es una herramienta de afinidad química hecha por Prolinx Company, Bothwell, WA. La tecnología de micromatriz de proteína Versalinx está basada en la interacción de moléculas sintéticas que permiten la formación de un complejo estable para inmovilizar proteínas, péptidos y ácidos nucleicos en superficies sólidas. Otra solución a este problema, como se ha analizado anteriormente, implica el uso de una primera bolsa o una bolsa con desvío con el biochip o los biochips para recoger el flujo inicial de sangre de un donante antes de que la primera bolsa se desconecte o se rodee, de manera que la sangre pueda fluir directamente a la segunda bolsa o bolsas adicionales de sangre sin fluir sobre el biochip.

50 Como se muestra en la Fig. 6, una vez que se ha completado la recogida de sangre, el dispositivo de captura de cribado (10) se extrae del aparato de recogida de sangre, quedando sus contenidos sellados del ambiente. Por ejemplo, la entrada del dispositivo de captura de cribado (10) se desenrosca (o de otra manera se separa) de la aguja o conducto de recogida a través de los cuales se recibe la sangre del donante. De la misma manera, la salida del dispositivo de captura de cribado (10) se desenrosca o separa del conducto de recogida (150) a través del cual la sangre fluye a la bolsa de sangre (200). La entrada y salida del dispositivo de captura de cribado (10) pueden después sellarse para que puedan extraerse seguir procesando el biochip. El sellado puede llevarse a cabo con una tapa, clavija, sello por calor, soldadura u otro medio apropiado. Por supuesto, como se ha analizado anteriormente, la invención también contempla que pueda proporcionarse un mecanismo de ensayo rápido en el propio dispositivo de captura de cribado (10) para que el ensayo pueda realizarse sustancialmente simultáneamente o inmediatamente después de que se haya realizado la recogida de sangre.

60 Preferentemente, el propio dispositivo de captura de cribado (10) se desmonta después cuidadosamente mediante robótica en un ambiente controlado, retirándose primero una tapa (11) del dispositivo de captura de cribado (10). Preferentemente, una junta tórica se libera cuando se aplica la presión correcta a un corchete/clip que mantiene la tapa cerrada, y la tapa preferentemente se saca deslizándose horizontalmente. Los biochips (20), (25) se extraen después, preferentemente verticalmente, desde sus corchetes de soporte, que los mantienen en posición en el dispositivo de captura de cribado (10). Los biochips extraídos (20), (25) se insertan después en un sistema de procesamiento de biochips que mantiene las siguientes fases del proceso de cribado, tales como amplificación de las moléculas de ácido nucleico capturadas o enlazadas, reacción antígeno/anticuerpo de ligandos de unión

capturados, y detección de los agentes o moléculas dianas.

La máquina a la que los biochips se transfieren, el procesador de biochips, es preferentemente una unidad desechable autosellada. Como se muestra en la Fig. 7A, esta plataforma sellada de "laboratorio en un chip" reduce la posibilidad de error humano y previene la contaminación de ambientes circundantes, así como infección de los trabajadores del laboratorio. El propio procesador de biochips contiene preferentemente dos secciones separadas una de la otra, una para procesar un biochip NAT (I) y una para procesar un biochip de inmunoensayo (II), para hacer funcionar el NAT y los inmunoensayos en paralelo.

La Figura 7B proporciona una realización alternativa del procesador de biochips en la que los biochips I y II de la Figura 7A están combinados en un biochip. En esta realización el biochip se procesa para liberar las moléculas dianas para el inmunoensayo bajo condiciones de elución suave, seguidas de condiciones de elución más duras para liberar moléculas dianas de ácido nucleico de los viriones y/o células del ensayo NAT.

En cada una de las Figuras 7A y 7B, la parte NAT de la unidad procesadora de biochips soporta reacciones de amplificación de ácido nucleico y un sistema de detección microfluídica, y puede además adaptarse a otras configuraciones para utilizar otros sistema de detección. La parte de inmunoensayo de la unidad soporta reacciones antígeno/anticuerpo con la posterior detección de antígeno o anticuerpos dianas. El reagente o reagentes para cada respectiva reacción se bombean a las dos partes de la unidad por medio de tubos conectores como se muestra en la Figura 8. Estos tubos se desconectan de la unidad una vez que se realizan los ensayos, y la unidad se desecha. Los reagentes se almacenan en botellas externas separadas y pueden mantenerse para muchos usos. Los procesadores de biochips pueden usarse como unidades únicas de pruebas o pueden funcionar en paralelo, permitiendo que muchas muestras de sangre se analicen a la vez.

La amplificación de secuencias de ácido nucleico del Biochip I es una función primaria de la parte NAT de la unidad procesadora de biochips. La máquina autónoma en la que se colocan los biochips también contiene una parte de inmunoensayo para procesar el Biochip II, a través de interacción o enlace de anticuerpo y antígeno. Los biochips se cierran, por ejemplo, en una posición con un espacio estrecho bajo la superficie de enlace de aproximadamente 0,25 mm, a través de la cual los tampones de elución y lisis permanecen en contacto con el biochip durante un periodo de tiempo y después pasan a través de un depósito.

En el sistema NAT mostrado en las Figs. 7A y 7B, los agentes, moléculas, células u otros componentes de interés dianas inmovilizados se eluyen del biochip y, si es necesario, se lisan en una elución apropiada y tampones de lisis, dando como resultado ácido(s) nucleico(s) diana(s) en solución que se recogen en el depósito B antes de fluir a la cámara PCR o RT-PCR donde ocurren las reacciones de amplificación. En una realización, PCR y RT-PCR son múltiples, lo que significa que se usan múltiples cebadores y amplificadores para detectar todos los ácidos nucleicos o analitos dianas eluidos. Por ejemplo, del depósito B, 50  $\mu$ l se bombean a la cámara de reacción PCR y otros 50  $\mu$ l se bombean a la cámara de reacción RT-PCR. Los reagentes estándares de PCR y RT-PCR están presentes en los pozos en miniatura colocados encima de las cámaras de reacción, permitiendo que la fuerza de la gravedad arrastre los reagentes a la cámara de reacción a través de los canales de reacción. Los procedimientos utilizados en la parte NAT del procesador de biochips están basados en ensayos PCR estándares que normalmente se realizan en una probeta. Los protocolos y reagentes estándares de PCR y RT-PCR son conocidos por aquellas personas expertas en la técnica, tales como los desvelados en *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Sambrook, et al., Capítulo 14, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), y en otras publicaciones y manuales científicos. Los métodos estándares son fácilmente adaptables para su uso en la parte NAT del procesador de biochips. Particularmente, la selección y cantidades de los reagentes y las condiciones del ensayo pueden adaptarse de los métodos conocidos PCR y RT-PCR.

En un diseño alternativo, como se muestra en la Fig. 7B, los biochips I y II se combinan en un procesador de biochips. En lugar de hacer funcionar los reagentes de cada biochip en paralelo, se hacen funcionar en secuencia. Pueden usarse válvulas electrónicas controladas por microprocesador para controlar el flujo de reagentes y otras soluciones al procesador de biochips para que el ensayo NAT y el inmunoensayo puedan funcionar secuencialmente.

Como se muestra en la Fig. 9, los canales de reacción pueden tener dispositivos para prevenir el retroflujo de reagentes. El factor limitador en esta tecnología es la velocidad de reacción de enzima, y el tiempo de amplificación estimado es aproximadamente de 10 a 15 minutos. Todos los depósitos en el sistema NAT tienen preferentemente el mismo volumen, por ejemplo, aproximadamente 200  $\mu$ l, para evitar excesos de flujo. Después de que los reagentes se hayan mezclado en los depósitos, la mezcla fluye a cámaras de amplificación separadas rodeadas por bloques calefactores para ciclos térmicos donde ocurre la amplificación PCR y RT-PCR.

En ciertas realizaciones mostradas en las Figs. 9 y 10, una vez que se ha completado el proceso de amplificación en la parte NAT del sistema, un volumen pequeño de muestra, aproximadamente 5  $\mu$ l, entra en un dispositivo microfluídico que contiene uno o más canales microfluídicos. El fin de este dispositivo microfluídico es detectar si un ácido nucleico diana específico está presente en la sangre que utiliza el sistema de cribado NAT. Los canales microfluídicos contienen moléculas de captura que están enlazadas covalentemente a las paredes interiores

de estos canales. Los canales pueden estar hechos de cualquier material que permita enlace covalente, tal como plástico, goma u otros materiales adecuados. Tales canales microfluídicos están disponibles en Caliper Technologies Corp., Mountain View, CA y en Fluidigm Corporation, San Francisco Sur, CA. Una muestra fluye a través de la cámara, cuyas paredes contienen sustancias para preservar poli dT que contienen una señal detectable. El proceso de detección implica la hibridización de una secuencia de ácido nucleico diana amplificada que se combina con secuencias fijadas dentro de la cámara de microfluidez y la detección de esta hibridización mediante señalización quimioluminiscente/fluorescente.

Unidas a las sustancias para preservar hay secuencias marcadas fluorescentemente con señalización templada. Cuando la muestra fluye a través de la cámara, las secuencias amplificadas se hibridizan con estas secuencias fijas, liberando la señal suprimida. Pueden formarse las sondas de señal, cada una teniendo una secuencia específica diseñada para detectar mutaciones específicas, genotipo y SNIPs. Usando tales métodos, la presencia de una secuencia de enfermedad puede detectarse, así como mutaciones puntuales en base a la generación de señales. Para un ejemplo de un ensayo de amplificación con base de una secuencia de ácido nucleico que utiliza señalización templada, véase Lanciotti y Kerst, J. Clinical Microbiology, páginas 4506-13 (Diciembre 2001).

También, al fijar cadenas variables en la cámara, también son detectables diferentes genotipos de cada agente. El principio detrás de calentar la cámara de microfluidez a una temperatura no templada es liberar la señal fluorescente templada mientras se permite que las secuencias amplificadas de NAT completen la hibridización con las secuencias sobre el canal. Si las secuencias de la muestra son complementarias con las secuencias sobre el canal, entonces se previene que las secuencias originales se vuelvan a templar y generen la señal templada de nuevo. La detección puede visualizarse mediante formación de imágenes digitales CCD de las señales que se emiten dentro de las cámaras. Tales cámaras están disponibles en Hamamatsu u otros proveedores de equipo de detección. Las señales también pueden medirse cuantitativamente mediante comparación con una señal estándar o de calibración.

La parte de inmunoensayo de la unidad procesadora de biochips se emplea para procesar Biochip #2, y usa una elución y una solución tampón neutralizadora para lavar los anticuerpos y antígenos del Biochip #2. La solución que contiene anticuerpo o antígeno generada por elución se dirige a las dos cámaras principales de reacción, una para la detección de anticuerpo (véase Figuras 11A, 11B y 11C) y una para la detección de antígeno (véase Figura 12). Las cámaras de reacción, que tienen aproximadamente un volumen de 200  $\mu$ l, están conectadas a los depósitos de reagentes situados, por ejemplo, ligeramente por encima de ellos mediante conductos de reacción. El reagente para el sistema de detección de anticuerpo contiene antígenos etiquetados con un sistema de amplificación de señal, y el reagente para la detección de antígeno contiene anticuerpos monoclonales también etiquetados con un sistema de amplificación de señal. La muestra se expone, en la cámara de reacción, a aproximadamente 2-5  $\mu$ l de los reagentes. En la cámara se forman inmunocomplejos de Ag-Ab-Samp (Ag=antígeno, Ab=anticuerpo (incluyendo anticuerpos policlonales y/o monoclonales), Samp=señal de amplificación) si Ag y Ab dianas están presentes en la muestra. Después de la finalización de la interacción y enlace, la muestra fluye a canales microfluídicos separados para su detección.

El sistema de detección usado para la detección de anticuerpos emplea un canal microfluídico de tipo capilar muy recubierto en el interior con anticuerpos monoclonales (mAbs), tal como IgG mAb anti-humano. Estos anticuerpos monoclonales reconocen la parte Fc de los anticuerpos unida al Ab-Ag-Samp. Como para la detección de antígeno, los canales microfluídicos están muy recubiertos en el interior con anticuerpos monoclonales, tales como IgG anti-ratón y anticuerpos que detectan el anticuerpo en los inmunocomplejos Ag-Ab-Samp. Para la detección de antígeno, el anticuerpo monoclonal etiquetado con la amplificación de señal es preferentemente de la especie de conejo, tal como el producido por Epitomics Corporation, San Francisco Sur, CA. Los complejos, junto con otros anticuerpos no dianas aleatorios presentes en la muestra, se unen a las paredes de los canales microfluídicos. Los canales están muy recubiertos, o recubiertos en exceso, con los anticuerpos monoclonales deseados para evitar competición entre anticuerpos no dianas y complejos de anticuerpo diana. La señal solamente se genera donde se enlazan inmunocomplejos con anticuerpos dianas. El canal completo puede verse como una columna con tres secciones principales, como se muestra, por ejemplo, en las Figuras 11A y 12. La distribución de señales a lo largo de la sección superior, media e inferior del canal proporciona un cálculo aproximado de la concentración de anticuerpos dianas en la muestra, que puede verse mediante una foto instantánea CCD (cámara digital). Tales cámaras están disponibles en Hamamatsu u otros proveedores de equipo de detección. Como se ha descrito anteriormente, la señal puede medirse cuantitativamente mediante comparación con una señal estándar o de calibración.

Con referencia a la FIG. 11A, como un primer ejemplo de un ensayo de anticuerpo, los canales de microfluidez están recubiertos con antígeno recombinante A. La cámara de reacción tiene antígeno recombinante B con moléculas de amplificación de señal unidas para formar un inmunocomplejo con anticuerpos del analito. Cuando las moléculas de amplificación de señal fluyen a través del canal, el inmunocomplejo con moléculas de amplificación de señal específicas unidas se enlazarán con el antígeno recombinante B en el canal para generar una señal. El conjugado antígeno-anticuerpo del antígeno de muestra en una configuración en ensayo tipo sándwich en fase sólida ha demostrado funcionar para ensayos anti-VIH I/II.

Como un segundo ejemplo de un ensayo de anticuerpo, como se muestra en la Fig. 11B, los canales de microfluidez pueden estar recubiertos con anticuerpo IgG Fc anti-humano. La cámara de reacción con antígeno recombinante etiquetado para anticuerpo específico para un sistema de amplificación de señal formará inmunocomplejos si los anticuerpos específicos están presentes. Cuando el inmunocomplejo con moléculas de amplificación de señal se enlaza con IgG Fc anti-humano, genera una señal. Este ensayo funciona bien cuando el IgG Fc anti-humano en el canal existe en cantidad suficiente.

La Figura 11C representa otro ejemplo más de un ensayo de anticuerpo que puede usarse con la presente invención. En lugar de exponer los anticuerpos dianas (de enfermedad) eluidos a un reagente de anticuerpo etiquetado, se exponen a un anticuerpo IgG Fc anti-humano etiquetado con un sistema de amplificación de señal. Los inmunocomplejos anticuerpo-anticuerpo formados pasan después a través de un canal microfluídico recubierto con un antígeno específico para el anticuerpo diana. En presencia del anticuerpo diana, se formará un complejo ilustrado en la Fig. 11C (Ag>Ab capturado>IgG Fc anti-humano con amplificación de señal) y la detección se completará con la amplificación de señal.

Como un ejemplo para el ensayo de antígeno, mostrado en la Fig. 12, los canales de microfluidez se recubren con un anticuerpo específico para reaccionar con el epítotope "a" de analito "A". De mientras, dentro de la cámara de reacción se ha formado un inmunocomplejo de analito A que se enlaza con otro anticuerpo específico que reacciona con el epítotope "b" en el analito "A". El anticuerpo b anti-epítotope se conjuga con un sistema de amplificación de señal. Cuando el inmunocomplejo con las moléculas de amplificación de señal fluye a través del canal, el anticuerpo que reacciona con el epítotope "b" en el canal se enlazarán con el epítotope "a" en el inmunocomplejo para formar un inmunoensayo sándwich tradicional. El sistema de amplificación de señal puede ser, por ejemplo, sulfato de dextrán o moléculas PEG conjugadas con moléculas de nanocrystal tales como las proporcionadas por el sistema de Puntos Cuánticos.

### **Amplificación y detección de señal**

Como se ha señalado anteriormente, la amplificación de señal puede ser necesaria para detectar agentes o moléculas dianas que están presentes en pequeñas cantidades en la sangre. El sistema de cribado inventivo, particularmente el procesador de biochips, y los métodos de cribado son fácilmente adaptables a tal amplificación.

En el caso de dianas de ácido nucleico, la amplificación de señal puede llevarse a cabo amplificando la propia diana, usando técnicas estándares, tales como PCR. Esto se ha descrito anteriormente.

Alternativamente, una propia señal puede amplificarse, que es particularmente útil para detectar dianas de ácido no nucleico. Por ejemplo, los sistemas de amplificación de la señal por tiramida (TSA) puede aumentar los límites de la detección hasta 100 veces sin pérdida de resolución, permitiendo a los usuarios ver señales que no se podrían obtener mediante otros métodos. TSA, algunas veces llamado CARD, Deposición Catalizada de Informadores, es un método de detección mediado por enzimas que utiliza la actividad catalítica de peroxidasa de rábano picante (HRP) para generar etiquetado de alta densidad de una proteína o ácido nucleico diana. Los kits TSA están disponibles en el mercado.

Otro ejemplo de un sistema de amplificación de señal útil para detectar dianas de ácido no nucleico se describe en Nam et al., Science, 301 (5641): 1885-1886 (2003). Este sistema emplea un segundo anticuerpo que reconoce un epítotope diferente de dianas al del anticuerpo de captura. El segundo anticuerpo se conjuga con nanopartículas etiquetadas con el ADN en "código de barras". El ADN en código de barras comprende numerosas, quizás miles, de moléculas de ADN de cadena sencilla que tienen una secuencia conocida. El ADN en código de barras puede amplificarse usando técnicas PCR estándares y detectarse como cualquier otra diana de ácido nucleico.

La referencia a los siguientes ejemplos no limitativos proporcionará una comprensión más completa de la invención reivindicada.

### **Ejemplo 1**

Este ejemplo demuestra el uso de un biochip recubierto con anticuerpo para capturar el correspondiente antígeno en la sangre y la detección del antígeno diana mediante espectroscopia de masa.

Un biochip (Chip de Proteína CIPHERGEN PS20) se enlazó covalentemente con un anticuerpo monoclonal de ratón contra proteína VIH P-24. El biochip se colocó después en un tubo donde 12 ml de sangre humana circulaba a una velocidad de flujo de aproximadamente 30 ml/min a 37 °C, para imitar la velocidad de flujo y la temperatura de una extracción normal de sangre. Véase Figura 13. El antígeno VIH P-24 se clavó en la sangre en una concentración de 0-200 ng/ml. Después de 10 minutos de circulación, el chip se retiró y el antígeno enlazado se detectó mediante espectroscopia de masa (Lector de Chip de Proteína CIPHERGEN)

Los resultados mostraron que el antígeno puede detectarse en una concentración de aproximadamente 8 ng/ml en una muestra de sangre de 12 ml. La Figura 14 representa un resultado típico.

**Ejemplo 2**

Este ejemplo demuestra el uso de un biochip recubierto con antígeno para capturar el correspondiente anticuerpo en la sangre y la detección del anticuerpo diana mediante espectroscopia de masa.

Un biochip (Chip de Proteína CIPHERGEN PS20) se enlazó covalentemente con una proteína de núcleo VIH P-24. El biochip se colocó después en un tubo donde 12 ml de sangre humana circulaba a una velocidad de flujo de aproximadamente 30 ml/min a 37 °C, para imitar la velocidad de flujo y la temperatura de una extracción normal de sangre. El anticuerpo monoclonal de ratón contra VIH P-24 se clavó en la sangre en una concentración de 0-200 ng/ml. Después de 10 minutos de circulación, el chip se retiró y el anticuerpo enlazado se detectó mediante espectroscopia de masa (SELDI-MS de CIPHERGEN)

Los resultados mostraron que el anticuerpo puede detectarse en una concentración de aproximadamente 1 ng/ml en una muestra de sangre de 12 ml. La Figura 15 representa un resultado típico.

**Ejemplo 3**

Este ejemplo demuestra el uso de un anticuerpo contra proteína de superficie viral para capturar un virus en sangre, seguido de la detección de nucleótidos virales usando un ensayo de tecnología de ácido nucleico.

El virus del Nilo Occidental se capturó con un ensayo Elisa. Una placa Elisa se cubrió con Anticuerpo Monoclonal 3A3 del virus del Nilo Occidental (de BioReliance, Rockville, MD) como un anticuerpo de captura. Después se añadieron muestras de virus del Nilo Occidental purificado. Después de la incubación, se añadió e incubó un anticuerpo policlonal (virus del Nilo Occidental de conejo anti ratón, de BioReliance, Rockville, MD). El anticuerpo de detección fue anticuerpo de cabra anti conejo conjugado con HRP. Otros anticuerpos anti virus del Nilo Occidental, tal como anticuerpo monoclonal de ratón 3.91D, también han demostrado capturar virus del Nilo Occidental. Véase, por ejemplo, Hunt et al., 2002.

Tabla 1 (a continuación) resume los resultados del procedimiento de captura de virus.

**Tabla 1: Captura de virus usando anticuerpo monoclonal**

1 Virus	2 Antígeno Viral PreM-3	3 Sobrenadante de Célula Vero	4 Diluyente de muestra
1.100		0.295	0.208
0.554	0.118		0.054

La absorbancia (O.D) fue mucho más alta en las muestras que contenían virus o antígeno con envoltura viral, las columnas 1 y 2, respectivamente. El control negativo, el sobrenadante de célula vero, columna 3, dio una lectura O.D similar a los antecedentes del tampón de ensayo, columna 4.

El experimento se repitió usando suero humano que contenía diferentes concentraciones del cultivo de virus. El cultivo de virus del Nilo Occidental en dilución 1:50 o 1:100 se clavó en suero humano normal e incubó a 37 °C durante 10, 30 y 60 minutos. La Tabla 2 resume los resultados usando suero humano.

**Tabla 2: Captura de virus en suero usando anticuerpo monoclonal**

	Tiempo de Incubación de Muestra		
	1 Hr	30 min	10 min
	Señal	Señal	Señal
<b>Suero humano normal solo</b>	0,599	0,601	1,00
<b>1:50d</b>	1,608	1,361	1,119
<b>1:100d</b>	1,017	0,766	1,168

Las señales fueron más altas en presencia del virus que en su ausencia, y mostró una manera dependiente del tiempo. Se obtuvieron resultados similares cuando el virus se clavó en sangre total (datos no mostrados).

Siguiendo la captura del virus del Nilo Occidental con anticuerpo, el virus se lisó y se detectó ARN viral y se cuantificó con Taqman PCR. Véase, por ejemplo, Shymala 2002, 2003(a) y 2003 (b). En resumen, los virus capturados se suspendieron en 100 ul de reagentes Taqman y se transfirieron a una placa de microtítulo Taqman para la detección con Taqman PCR. La mezcla de la reacción Taqman en un volumen final de 100 ul contenía, 50 ul

de mezcla Una Etapa RT PCR (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA), 1 pmol de cada uno de los cebadores de amplificación, y 0,4 pmol de la sonda. Las condiciones de reacción incluyeron 30 minutos a 48 °C para la reacción RT, 10 minutos a 95 °C para activar la enzima Taq seguido de 50 ciclos de 30 segundos a 95 °C, alternando con 1 minuto a 60 °C en el Detector de Secuencia ABI 7900. Alternativamente, las gotas pueden suspenderse en 100 ul de una mezcla de reacción que contenía 2 ul de mezcla Superscript III RT/Platinum Taq (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA), 50 ul de mezcla de Reacción 2X, 4 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 ul de Rox, 1 pml de cada uno de los cebadores de amplificación, 0,4 pmol de la sonda. Las condiciones de reacción incluyen 15 minutos a 50 °C para la reacción RT, 2 minutos a 95 °C para activar la enzima seguido de 50 ciclos de 30 segundos a 95 °C, alternando con 1 minuto a 60 °C en el Detector de Secuencia ABI 7900. Los cebadores de amplificación PCR correspondientes a la región conservada con cápside (VWNV1-VWNV3) se eligieron para la amplificación robusta y detección. Fueron:

5  
10  
15  
VWNV1-CCGGGCTGTCAATATGCTAAA (Cebador de Sentido – nt129-149)  
VWNV2-AGCCCTCTTCAGTCCAATCAAG (Cebador anti-sentido – ntl174-195)  
VWNV3-xCGGAATGCCCCGCGTGTGz (Sonda-ntl153-171)

Donde X = 6-FMA, y Z=Enlazador plus Tamra  
(Todas las numeraciones están en el depósito GenBank- AF196835).

20 Una transcripción de control interno de 750 nt, que es amplificable con VXNAV1 y 2, pero con una secuencia de sonda alterada y acoplada a un fluoróforo diferente, se usó para detectar negativos falsos de PCR.

Las publicaciones y documentos de patente citados en el presente documento incluyen los siguientes:

25 Fortina, P. *et al.*, *European J. Human Genetics* 8:884-894 (2000)

Fortina, P. *et al.*, *Methods in Molecular Biology* 163:211-219 (2001).

Hunt, R. *et al.*, *J. Clin. Microbiology* 40(6): 2023:2030 (2002).

30 Yuen, P-K. *et al.*, *Genome Research* 11:405-412 (2001).

Petrick, J. *Vox Sanguinis* 80:1-11 (2001).

35 Gilles, P.N. *et al.*, *Nature Biotechnology* 17:365-370 (1999).

Davies, H. *et al.*, *Biotechnology* 27:1258-1261 (1999).

Carson, R.T. *et al.*, *J. Immunol. Methods* 227:41-52 (1999).

40 Okamoto, T. *et al.*, *Nature Biotechnology* 18:436-443 (2000).

Shyamala, V. *et al.*, *Transfusion* 43, p. 128 (2003). Detección y Cuantificación de ARN de virus del Nilo Occidental mediante Ensayo Alternativo NAT WNV. 56° reunión anual AABB, 1-4 noviembre, San Diego, CA & XII APISBT 15-18 noviembre, Nueva Delhi, India ("Shyamala 2003(a)").

45 Shyamala, V. *et al.* (2003) Uso de ensayo cuantitativo NAT para correlacionar bioensayos de titulación del virus del Nilo Occidental (pfu/ml) con números de copia genómicos (geq/mL). 10° Taller EPFA/NIBSC y reunión SoGAT, 3-4 julio, Langen, Alemania ("Shyamala 2003(b)").

50 Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 60/480.431, presentada el 20 de junio, 2003: V. Shyamala, Identificación de oligonucleótidos para la captura, detección y cuantificación de virus del Nilo Occidental.

**REIVINDICACIONES**

- 5           1. Un dispositivo de captura de cribado para cribado en línea de sangre recogida de un donante, estando el dispositivo conectado a una aguja de recogida y conectado mediante un conducto de recogida a una bolsa de recogida, comprendiendo el dispositivo:
- 10                 una entrada para sangre recogida de la aguja de recogida;  
                    una unidad de biochip que captura agentes o moléculas dianas de la sangre; y  
                    una salida que drena la sangre del dispositivo de captura de cribado al conducto de recogida.
- 15           2. Un dispositivo de captura de cribado para cribado en línea de sangre recogida de un donante, estando el dispositivo conectado mediante un conducto de recogida a una aguja de recogida y situado en la entrada de o dentro de una bolsa de recogida, comprendiendo el dispositivo:
- 20                 una entrada para sangre recogida de la aguja de recogida;  
                    una unidad de biochip que captura agentes o moléculas dianas de la sangre; y  
                    una salida que drena la sangre del dispositivo de captura de cribado a la bolsa de recogida.
- 25           3. El dispositivo de captura de cribado de acuerdo con la reivindicación 1, donde la entrada del dispositivo de captura de cribado está directamente conectada a un extremo trasero de la aguja de recogida.
- 30           4. El dispositivo de captura de cribado de acuerdo con la reivindicación 1, donde la entrada del dispositivo de captura de cribado está conectada, mediante un conducto de recogida, próxima a la aguja de recogida.
- 35           5. El dispositivo de captura de cribado de acuerdo con la reivindicación 4, donde la entrada del dispositivo de captura de cribado está conectada, mediante el conducto de recogida, próxima a la aguja de recogida para que la temperatura de la sangre en el dispositivo de captura de cribado sea aproximadamente 37 °C.
- 40           6. El dispositivo de captura de cribado de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, donde la unidad de biochip comprende un primer biochip y un segundo biochip que están secuencialmente dispuestos entre la entrada y la salida.
- 45           7. El dispositivo de captura de cribado de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, donde el primer biochip y el segundo biochip están dispuestos de una manera apilada en paralelo.
- 50           8. El dispositivo de captura de cribado de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, donde las dimensiones del dispositivo de captura de cribado son tales que una velocidad de flujo de sangre que fluye a través del dispositivo de captura de cribado es igual a la velocidad de flujo de la sangre recogida en ausencia del dispositivo de captura de cribado.
- 55           9. El dispositivo de captura de cribado de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, donde las dimensiones del dispositivo de captura de cribado son tales que la velocidad de flujo de sangre que fluye a través del dispositivo de captura de cribado es aproximadamente 450 ml por 10 minutos.
- 60           10. El dispositivo de captura de cribado de acuerdo con la reivindicación 8, donde las dimensiones de la entrada, la salida, un área de superficie de biochips en la unidad de biochip, y la caja del dispositivo de captura de cribado son tales que la sangre recogida mantiene una velocidad constante de flujo a través del dispositivo de captura de cribado.
- 65           11. El dispositivo de captura de cribado de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, donde el agente o molécula diana comprende al menos una proteína, molécula de ácido nucleico o molécula o fragmento de las mismas indicativo de o específico de una enfermedad en un sujeto o un agente infeccioso.
12. El dispositivo de captura de cribado de acuerdo con la reivindicación 11, donde la proteína es un anticuerpo o un antígeno.
13. El dispositivo de captura de cribado de acuerdo con la reivindicación 6, donde el primer biochip es un biochip de técnica de amplificación de ácido nucleico (NAT) diseñado para hacer funcionar múltiples pruebas en el primer biochip.
14. El dispositivo de captura de cribado de acuerdo con la reivindicación 13, donde el primer biochip captura al menos un organismo o célula infecciosa que contiene una molécula de ácido nucleico diana.
15. El dispositivo de captura de cribado de acuerdo con la reivindicación 14, donde el organismo infeccioso es un virus, bacteria, hongo, protozoo, micoplasma o príon y dicha célula es una célula del donante de la muestra de sangre.

16. El dispositivo de captura de cribado de acuerdo con la reivindicación 6, donde el segundo biochip es un chip de inmunoensayo diseñado para hacer funcionar múltiples ensayos en el segundo biochip.
- 5 17. El dispositivo de captura de cribado de acuerdo con la reivindicación 16, donde el segundo biochip captura antígeno y anticuerpos dianas.
18. El dispositivo de captura de cribado de acuerdo con la reivindicación 6, donde el primer y segundo biochip son biochips de baja densidad.
- 10 19. El dispositivo de captura de cribado de acuerdo con la reivindicación 6, donde el primer y segundo biochip comprenden micromatrices en las que los analitos que se enlazan con el agente o molécula diana, si está presente en la sangre, están dispuestos a lo largo de la longitud del biochip en la dirección del flujo sanguíneo sobre el primer y segundo biochip, respectivamente.
- 15 20. El dispositivo de captura de cribado de acuerdo con la reivindicación 17, donde el primer y segundo biochip comprenden analitos unidos covalentemente.
21. El dispositivo de captura de cribado de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, donde la salida incluye un embudo y un filtro.
- 20 22. El dispositivo de captura de cribado de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, que además comprende un dispositivo de anti-retroflujo que previene que la sangre fluya de vuelta hacia la entrada.
- 25 23. El dispositivo de captura de cribado de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, donde la entrada y salida son capaces de sellarse cuando el dispositivo de captura de cribado se extrae de la aguja de recogida y del conducto de recogida.
24. El dispositivo de captura de cribado de acuerdo con la reivindicación 6, donde el dispositivo de captura de cribado comprende una tapa que puede retirarse robóticamente para facilitar la retirada robótica del primer biochip y el segundo biochip.
- 30 25. Un sistema de cribado para cribado en línea de sangre recogida de un donante usando una aguja de recogida conectada mediante un conducto de recogida a una bolsa de recogida, que comprende:
- 35 un dispositivo de captura de cribado de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, comprendiendo además el dispositivo de captura de cribado:
- al menos un procesador de biochip para detectar al menos un agente o molécula diana capturada.
- 40 26. El dispositivo de captura de cribado de la reivindicación 25, donde dicho procesador de biochip es capaz de amplificar dicho agente o molécula diana.
27. El dispositivo de captura de cribado de acuerdo con la reivindicación 25, donde el procesador de biochip es una unidad desechable sellada que tiene una parte de técnica de amplificación de ácido nucleico (NAT) para procesar un primer biochip y una parte de inmunoensayo para procesar un segundo biochip.
- 45 28. El sistema de cribado de acuerdo con la reivindicación 27, donde dicha molécula diana es una molécula de ácido nucleico y la parte NAT comprende:
- 50 un recipiente para biochip;  
al menos un depósito para mantener una muestra;  
al menos una cámara de reacción de amplificación conectada al depósito; y  
al menos un componente de detección conectado a la cámara de reacción de amplificación.
- 55 29. El sistema de cribado de acuerdo con la reivindicación 28, donde la parte NAT comprende además:
- al menos un recipiente para reagente conectado al depósito; y  
al menos un recipiente para reagente conectado a la cámara de reacción.
- 60 30. El sistema de cribado de acuerdo con la reivindicación 29, donde la parte NAT comprende además:  
el primer biochip sujeto en el recipiente para biochip.
31. El sistema de cribado de acuerdo con la reivindicación 30, donde el primer biochip se sujeta de tal manera que una superficie que contiene analitos está en contacto con al menos un tampón de elución y lisis.
- 65 32. El sistema de cribado de acuerdo con la reivindicación 29, donde el componente de detección es al menos

una cámara de microfluidez.

- 5           **33.** El sistema de cribado de acuerdo con la reivindicación 25, que comprende más de un procesador de biochip.
- 10           **34.** El sistema de cribado de acuerdo con la reivindicación 27, donde dicha molécula diana es un anticuerpo diana o un antígeno diana y la parte de inmunoensayo comprende:
- un recipiente para biochip;  
                  al menos un depósito para mantener una muestra;  
                  al menos una cámara de reacción de amplificación conectada al depósito; y  
                  al menos un componente de detección conectado a la cámara de reacción de amplificación.
- 15           **35.** El sistema de cribado de acuerdo con la reivindicación 34, donde la parte de inmunoensayo además comprende:
- al menos un recipiente para reagente conectado al depósito; y al menos un recipiente para reagente conectado a la cámara de reacción.
- 20           **36.** El sistema de cribado de acuerdo con la reivindicación 35, donde la parte de inmunoensayo además comprende:
- el segundo biochip sujeto en el recipiente para biochip.
- 25           **37.** El sistema de cribado de acuerdo con la reivindicación 36, donde el segundo biochip está sujeto de tal manera que los analitos unidos están en contacto con al menos un tampón.
- 30           **38.** El sistema de cribado de acuerdo con la reivindicación 34, donde el componente de detección es al menos una cámara de microfluidez.
- 39.** El sistema de cribado de acuerdo con la reivindicación 34, que comprende al menos dos cámaras de reacción, una para la detección de un anticuerpo diana y una para la detección de un antígeno diana.
- 35           **40.** El sistema de cribado de acuerdo con la reivindicación 39, donde cada cámara de reacción está conectada al menos a un componente de detección que comprende al menos una cámara de microfluidez.
- 40           **41.** Un método de cribado en línea de sangre recogida de un donante usando una aguja de recogida conectada mediante un conducto de recogida a una bolsa de recogida, que comprende:
- 45                   proporcionar un dispositivo de captura de cribado que comprende: una entrada para sangre recogida de la aguja de recogida, una unidad de biochip que captura un agente o molécula diana de la sangre, y una salida que drena la sangre del dispositivo de captura de cribado al conducto de recogida;  
                  insertar el dispositivo de captura de cribado entre la aguja de recogida y el conducto de recogida próximo a la aguja de recogida de manera que la sangre que fluya a través del dispositivo de captura de cribado esté aproximadamente a la temperatura de un cuerpo humano; y  
                  permitir que la sangre fluya a través de dicho dispositivo de captura.
- 50           **42.** El método de la reivindicación 41, que además comprende la etapa de extraer el dispositivo de captura de cribado para seguir procesando la unidad de biochip.
- 55           **43.** El método de la reivindicación 41, que además comprende:
- abrir robóticamente el dispositivo de captura de cribado para extraer la unidad de biochip; e  
                  insertar la unidad de biochip en un procesador de biochips para procesar los biochips en la unidad de biochip.
- 60           **44.** El método de acuerdo con la reivindicación 43, donde el procesador de biochips comprende una parte técnica de amplificación de ácido nucleico (NAT) para procesar un primer biochip y una parte de inmunoensayo para procesar un segundo biochip.
- 65           **45.** El método de acuerdo con la reivindicación 44, donde dicha molécula diana es una molécula de ácido nucleico y la parte NAT comprende:
- un recipiente para biochip que comprende un primer biochip; al menos un depósito para mantener una muestra eluida del primer biochip;  
                  al menos una cámara de reacción de amplificación conectada a la reserva; y

al menos un componente de detección conectado a la cámara de reacción de amplificación.

**46.** El método de acuerdo con la reivindicación 45, donde la parte NAT además comprende:

5 al menos un recipiente para reagente conectado al depósito, donde dicho método comprende además poner en contacto el primer biochip con al menos un tampón del recipiente para reagente que eluye y lisa los agentes y moléculas dianas capturadas del primer biochip para formar una solución que se recoge en el depósito.

10 **47.** El método de acuerdo con la reivindicación 46, que además comprende:

bombear la solución en el depósito a al menos una cámara de reacción de amplificación;  
 proporcionar al menos un recipiente adicional para reagente que contiene reagentes de amplificación de ácido nucleico y permitir que los reagentes fluyan a la cámara de reacción de amplificación que contienen la solución;  
 15 proporcionar condiciones suficientes para amplificar al menos una molécula de ácido nucleico en la solución; y  
 detectar la presencia de la molécula de ácido nucleico amplificada en el componente de detección.

20 **48.** El método de acuerdo con la reivindicación 47, donde el componente de detección es al menos una cámara de microfluidez y detecta la presencia de la molécula de ácido nucleico amplificada mediante un método de hibridación de ácido nucleico y la detección de una señal.

25 **49.** El método de acuerdo con la reivindicación 44, donde dicha molécula diana es un anticuerpo o un antígeno y la parte de inmunoensayo comprende:

un recipiente para biochip que comprende un segundo biochip;  
 al menos un depósito para mantener una muestra eluida del primer biochip;  
 al menos una cámara de reacción conectada al depósito; y  
 30 al menos un componente de detección conectado a la cámara de reacción.

**50.** El método de acuerdo con la reivindicación 49, donde la parte de inmunoensayo además comprende:

al menos un recipiente para reagente conectado al depósito, donde dicho método comprende además poner en contacto el segundo biochip con al menos un tampón del recipiente para reagente que eluye las moléculas dianas capturadas del segundo biochip para formar una solución que se recoge en el depósito.

**51.** El método de acuerdo con la reivindicación 50, que además comprende:

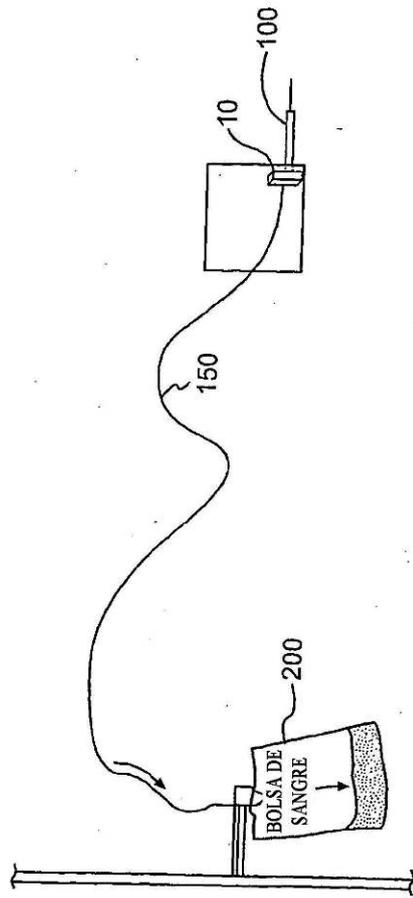
40 bombear la solución en el depósito a al menos una cámara de reacción;  
 proporcionar al menos un recipiente adicional para reagente que contiene un reagente que comprende un antígeno unido a un sistema de amplificación de señal o a un anticuerpo unido a un sistema de amplificación de señal y permitir que el reagente fluya a la cámara de reacción que contiene la solución;  
 proporcionar condiciones suficientes para permitir el enlace del reagente con un anticuerpo o antígeno diana en la solución; y  
 45 detectar la presencia del anticuerpo o antígeno diana en el componente de detección.

50 **52.** El método de acuerdo con la reivindicación 51, donde el componente de detección es al menos una cámara de microfluidez y detecta la presencia de la señal al enlazarse con un anticuerpo inmovilizado en la pared de la cámara.

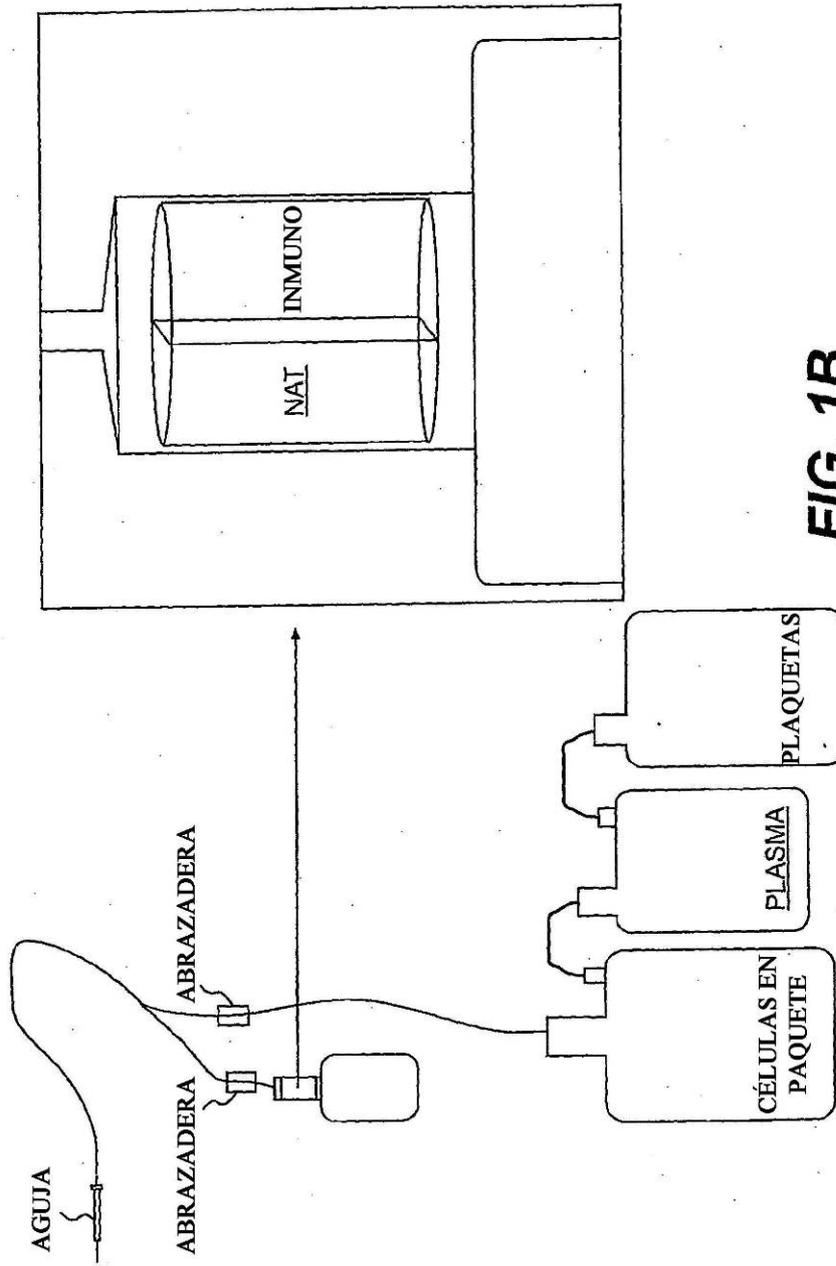
**53.** El método de acuerdo con la reivindicación 43 o 49, que además comprende utilizar más de un procesador de biochips en paralelo.

55 **54.** El método de acuerdo con la reivindicación 49, que comprende al menos dos cámaras de reacción, una para la detección de un anticuerpo diana y una para la detección del antígeno diana.

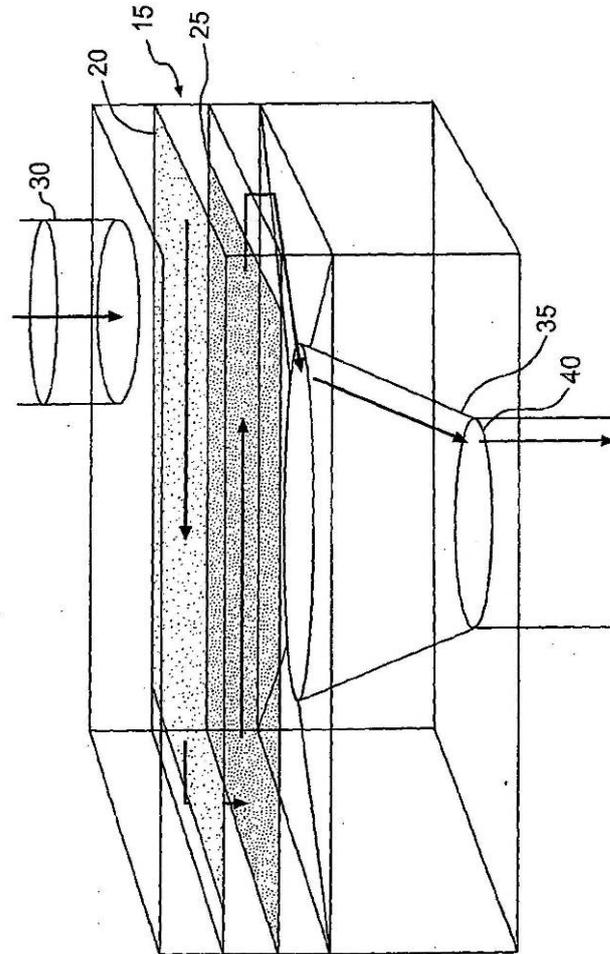
**55.** El método de acuerdo con la reivindicación 54, donde cada cámara de reacción está conectada al menos a un componente de detección que comprende al menos una cámara de microfluidez.



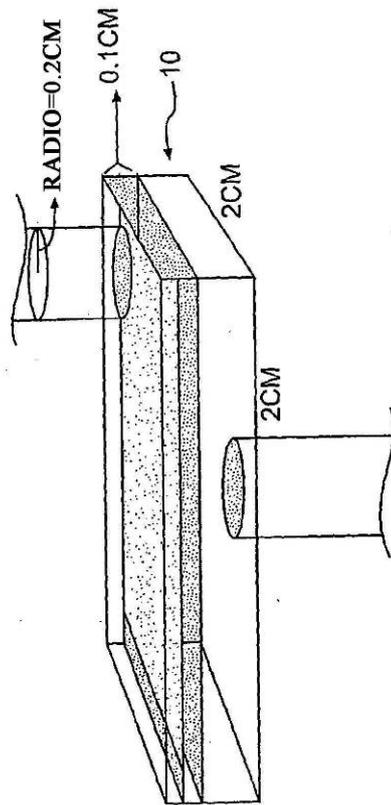
**FIG. 1A**



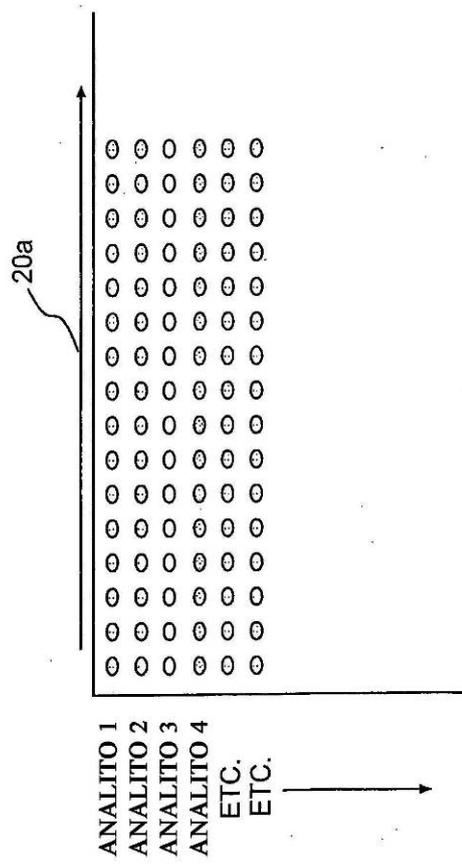
**FIG. 1B**



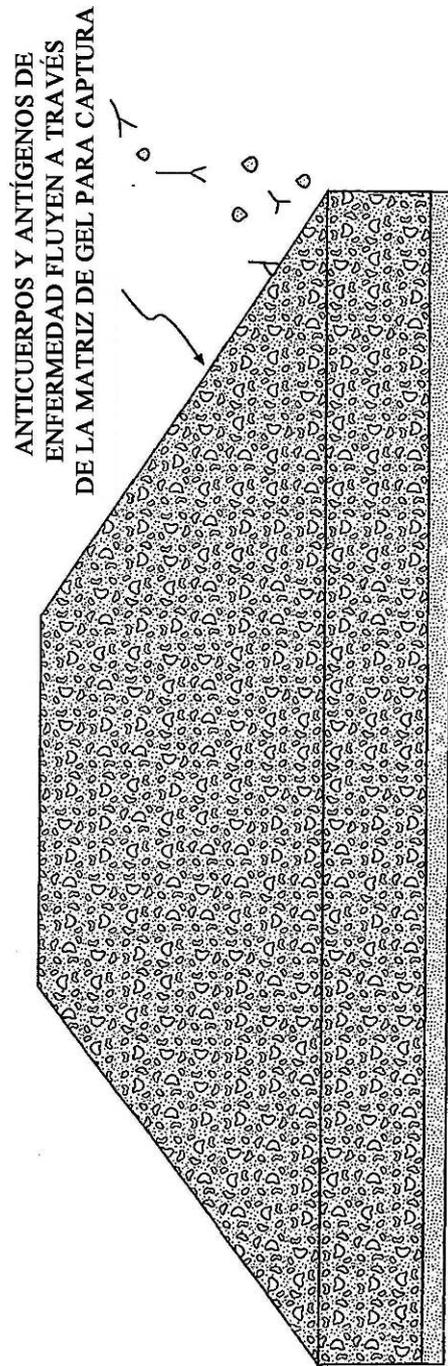
**FIG. 2**



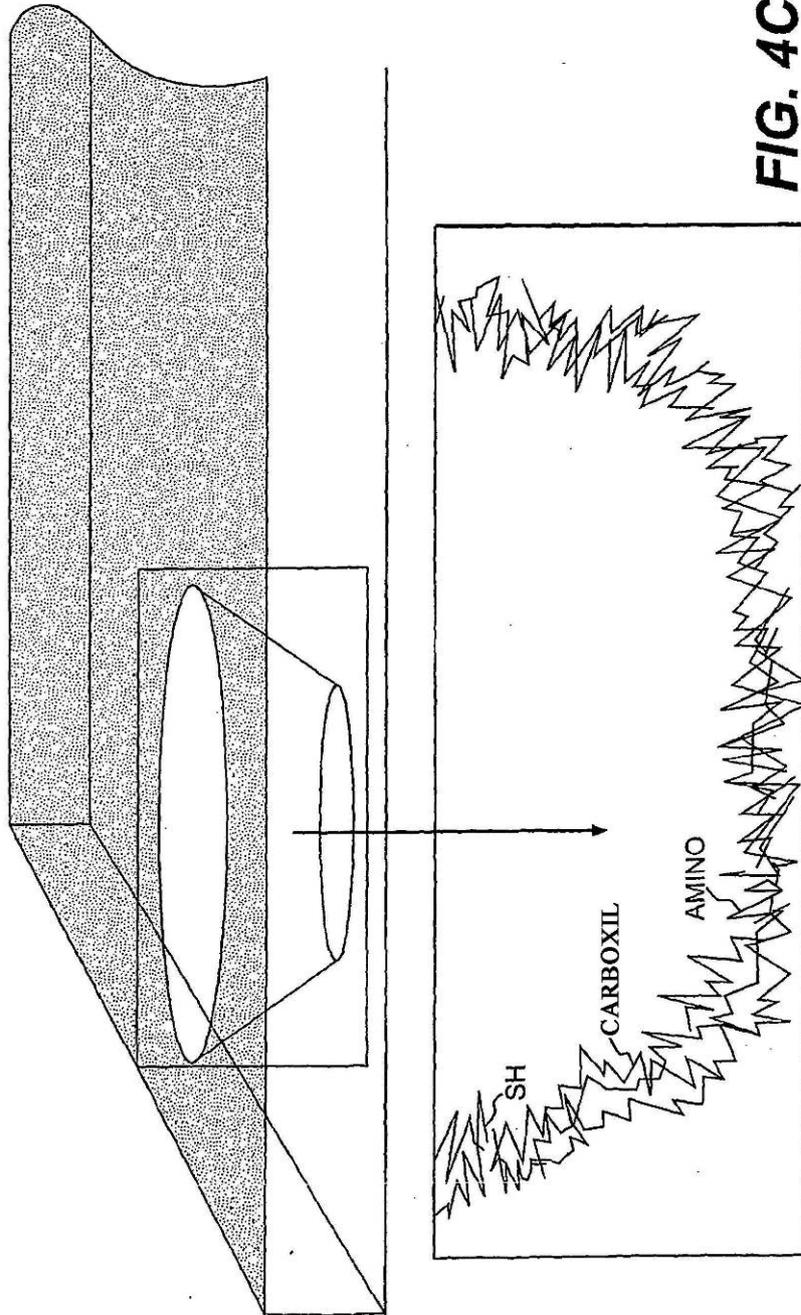
**FIG.3**



**FIG. 4A**



**FIG. 4B**



**FIG. 4C**

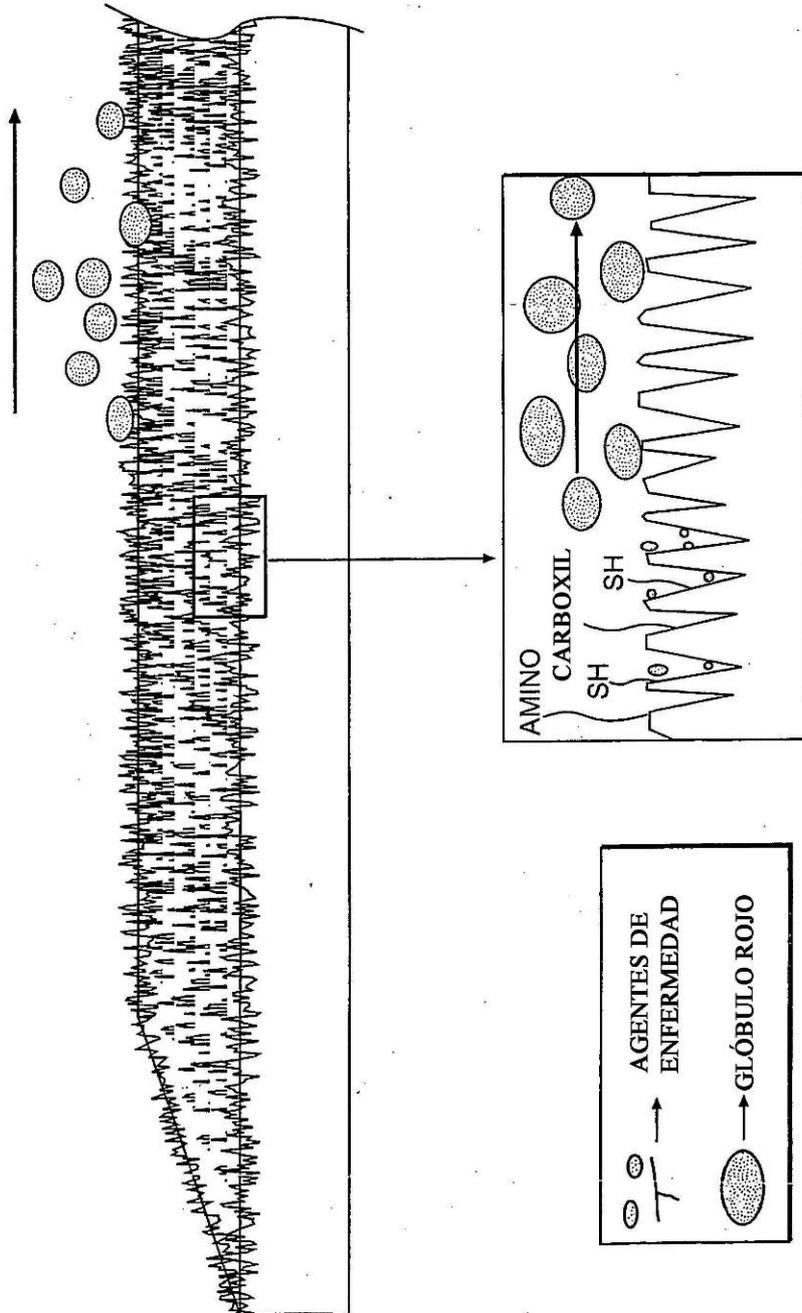
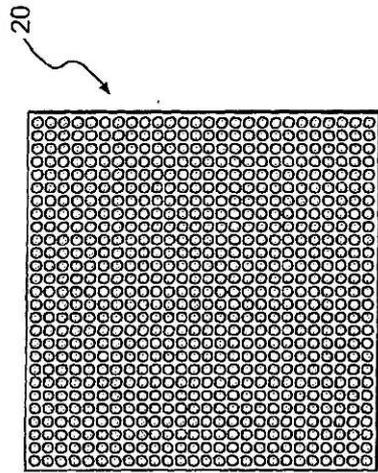
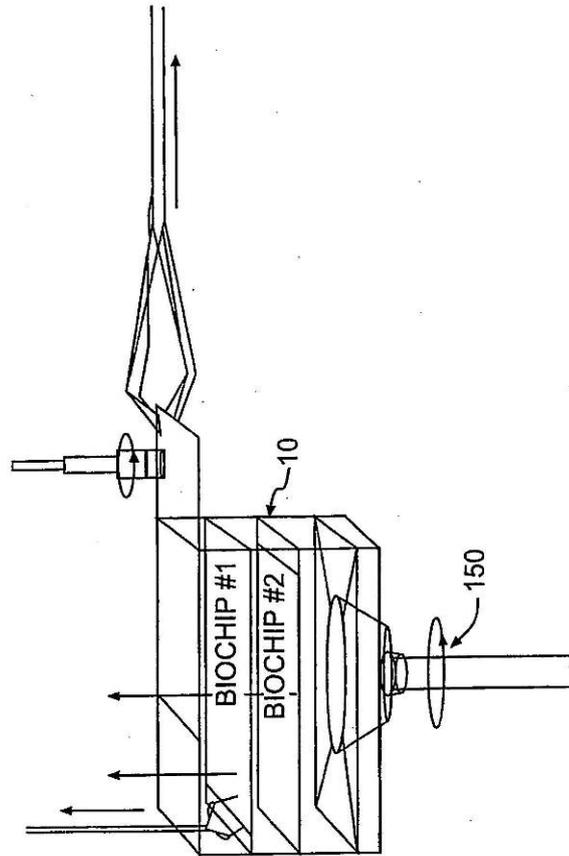


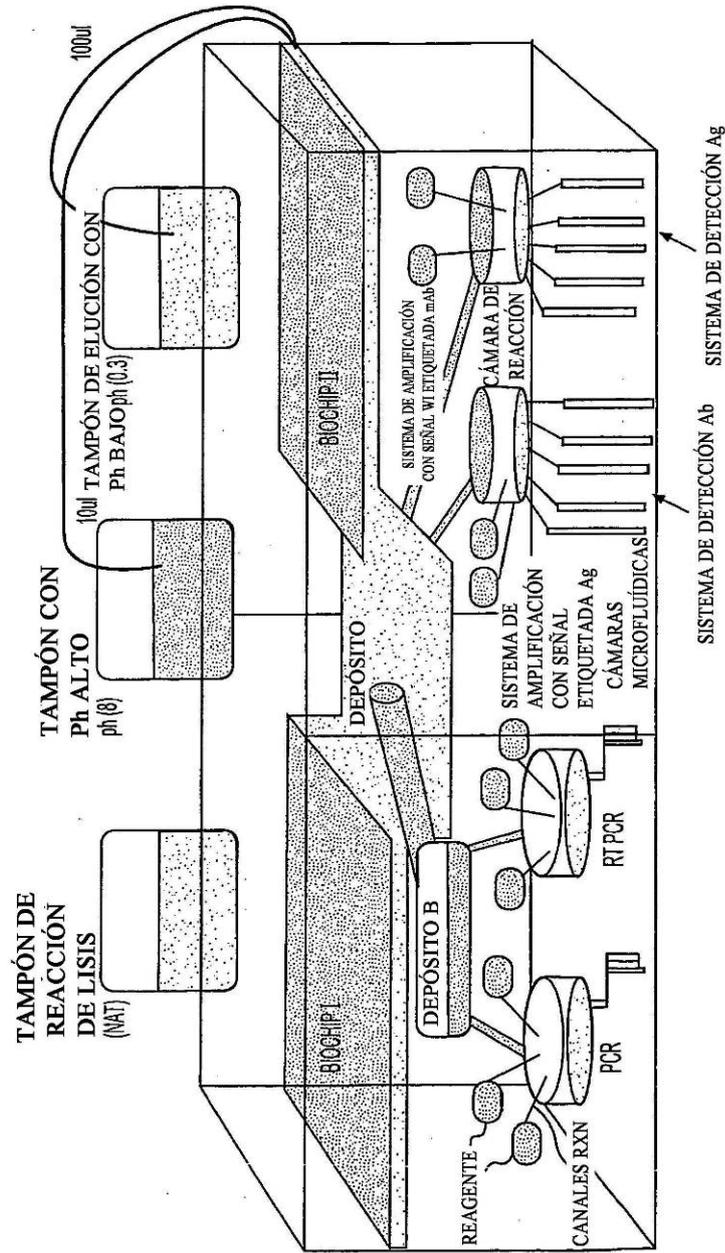
FIG.4D



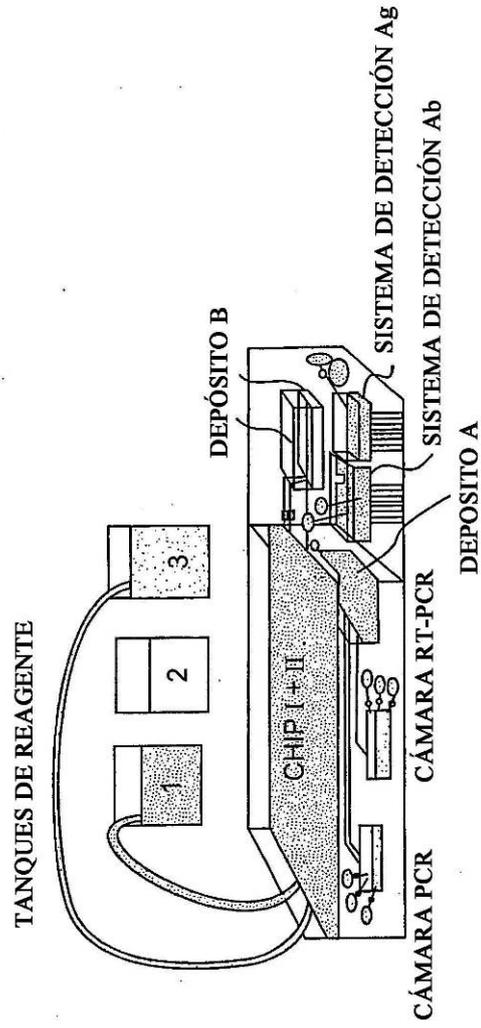
**FIG. 5**



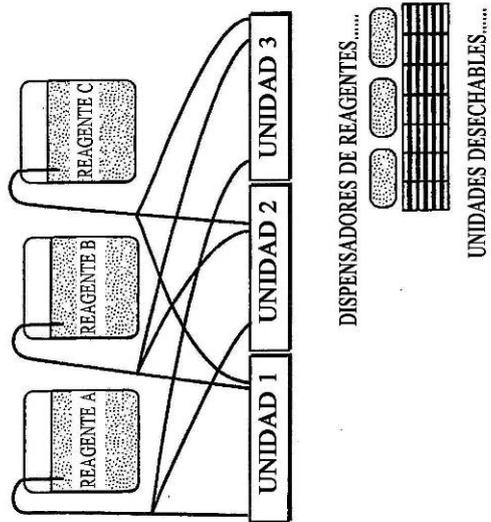
**FIG. 6**



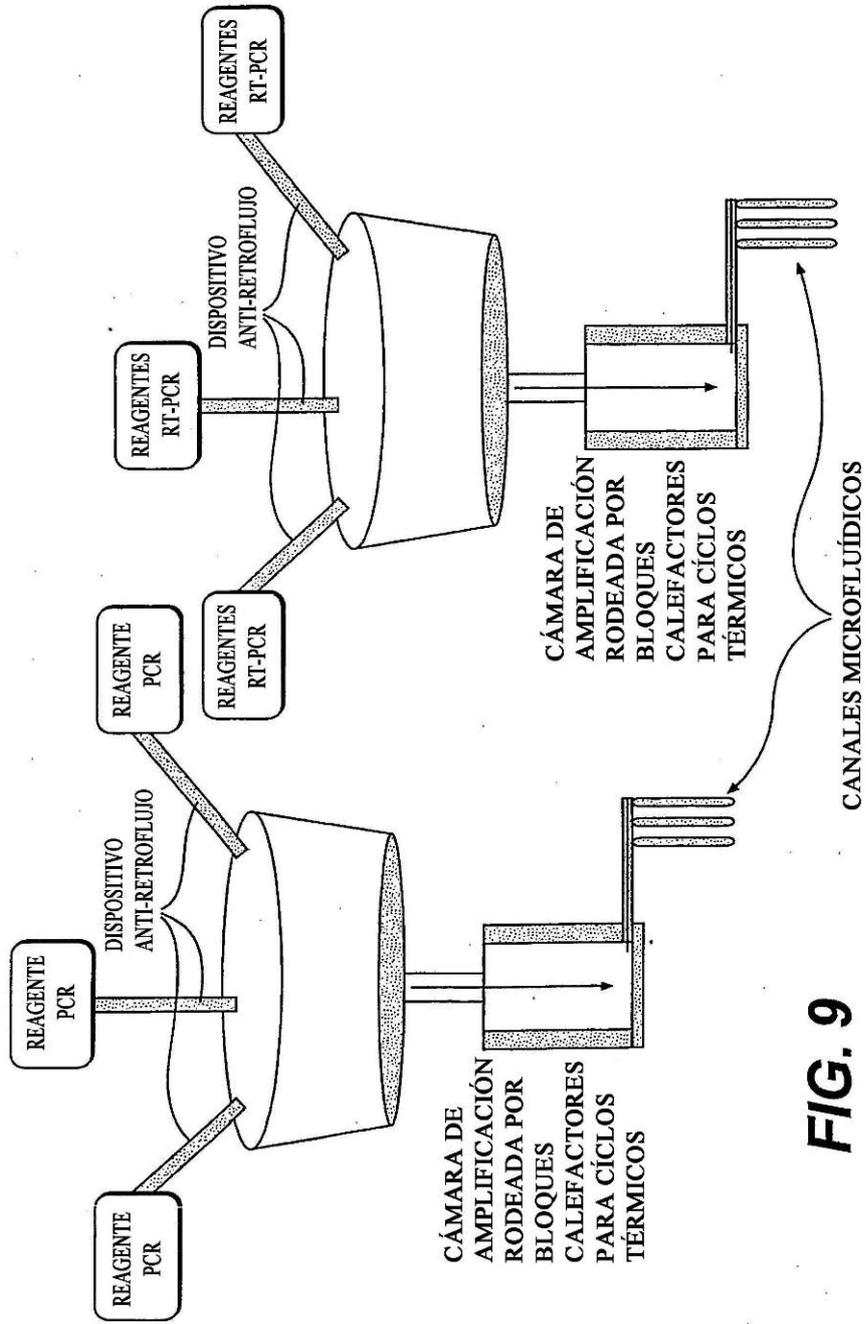
**FIG. 7A**



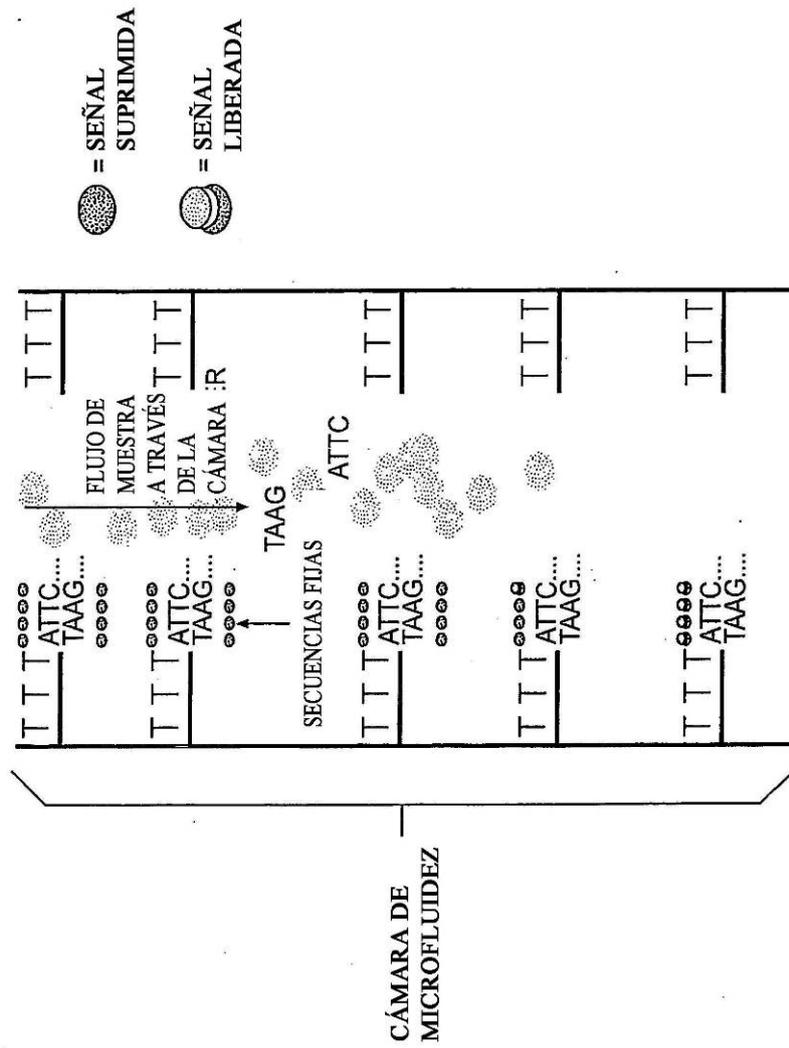
**FIG. 7B**



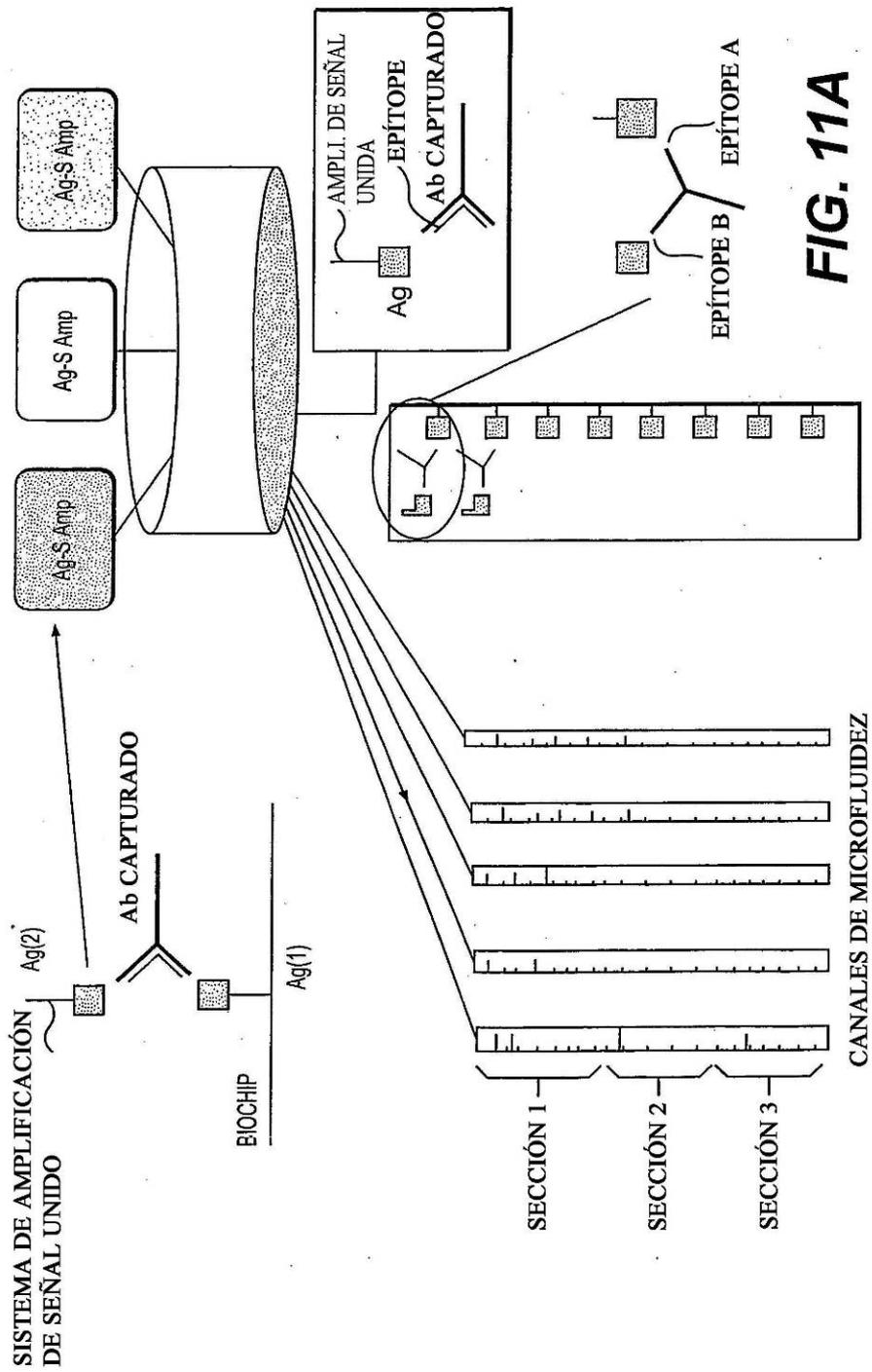
**FIG. 8**



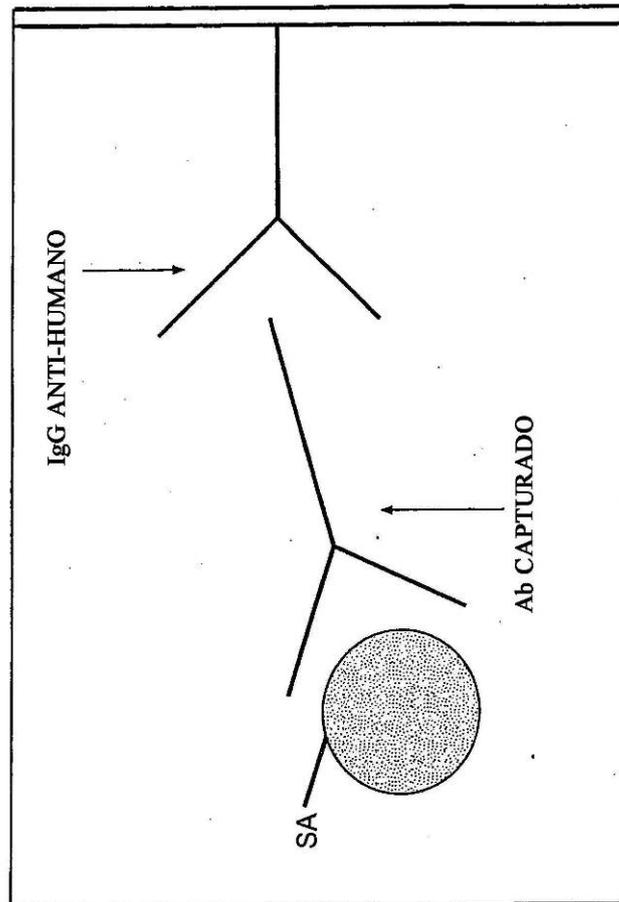
**FIG. 9**



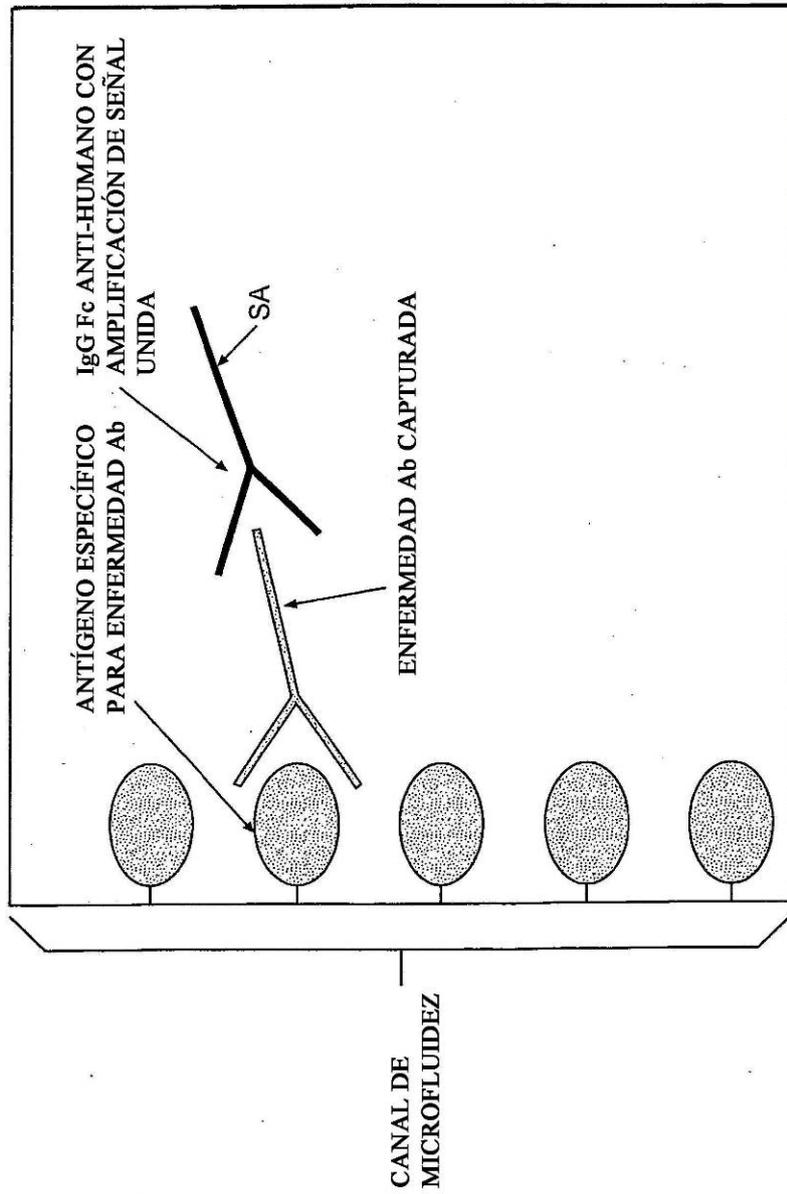
**FIG. 10**



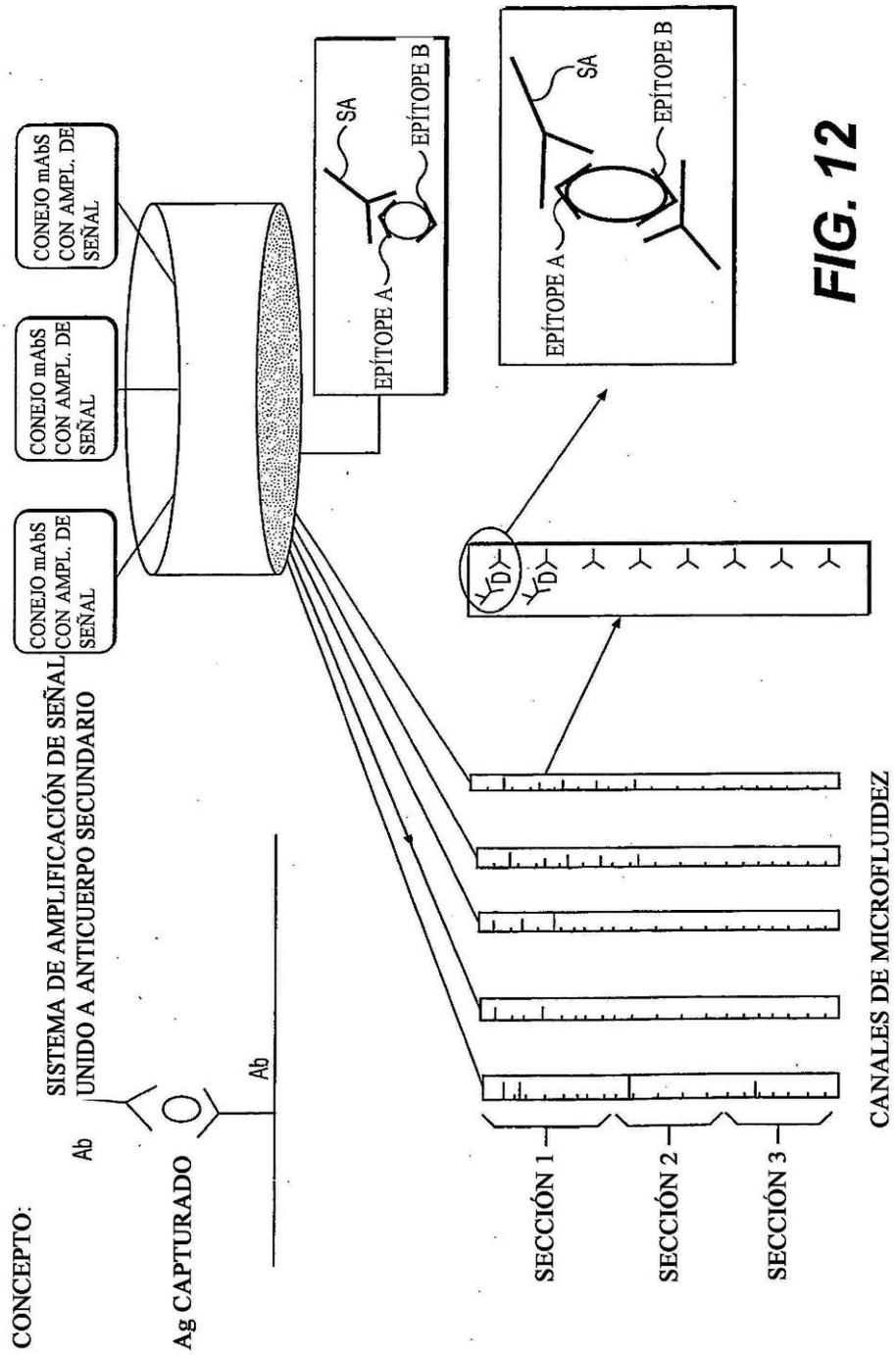
**FIG. 11A**



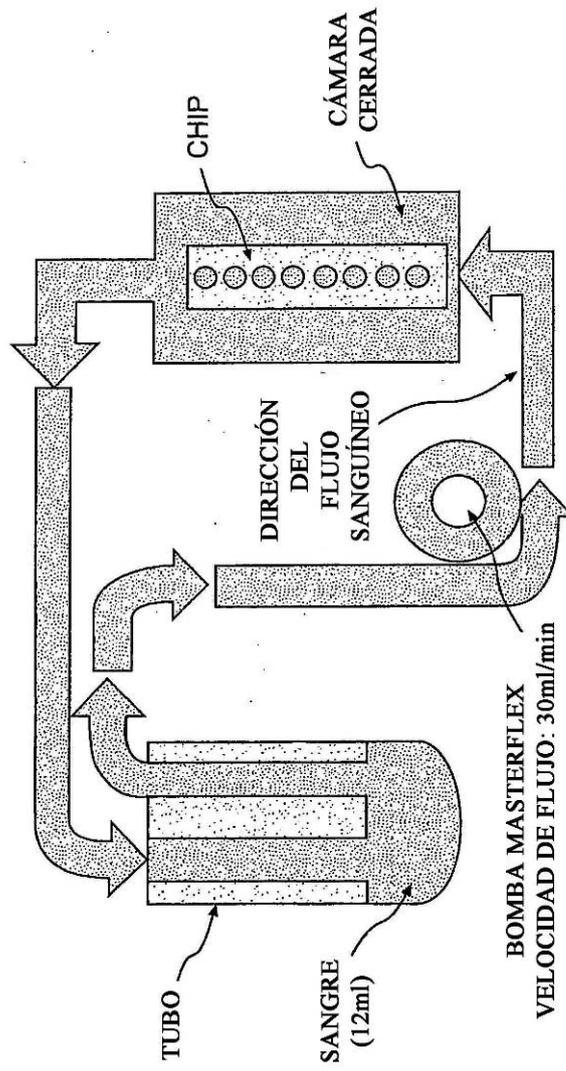
**FIG. 11B**



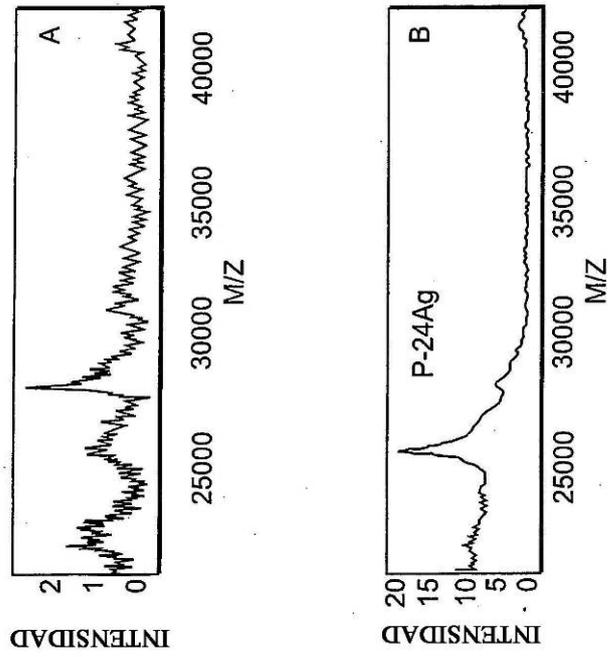
**FIG. 11C**



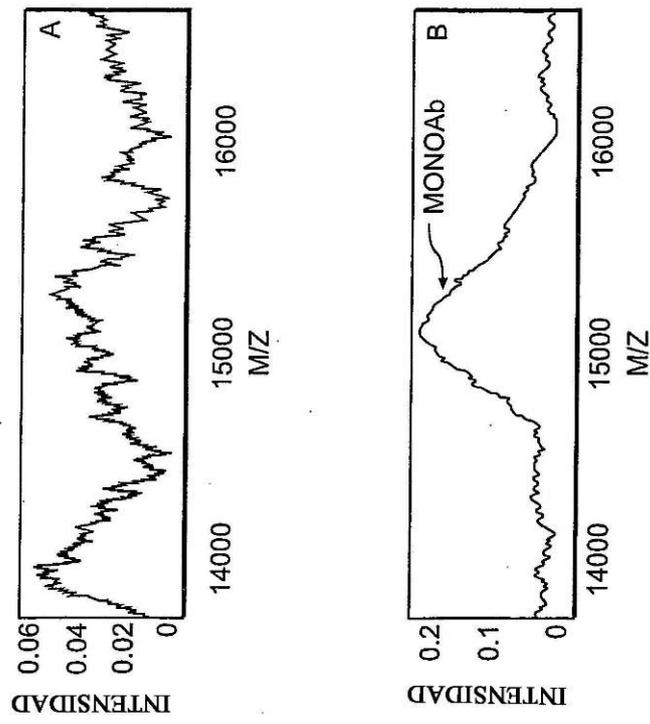
**FIG. 12**



**FIG. 13**



**FIG. 14**



**FIG. 15**