(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 519 042**

(51) Int. Cl.:

B01L 7/00 (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2008** **E 08864313 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014** **EP 2227330**

(54) Título: **Sistema móvil de test rápido para análisis de ácido nucleico**

(30) Prioridad:

22.12.2007 DE 102007062441

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.11.2014

(73) Titular/es:

AJ INNUSCREEN GMBH (100.0%)
ROBERT-ROESSLE-STRASSE 10
13125 BERLIN, DE

(72) Inventor/es:

HILLEBRAND, TIMO;
KNIPPSCHILD, CLAUS;
JASCHINSKY, BENJAMIN y
GRASER, ELMARA

(74) Agente/Representante:

ÁLVAREZ LÓPEZ, Sonia

ES 2 519 042 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

Sistema móvil de test rápido para análisis de ácido nucleico.

El objeto de la invención es un sistema de equipo móvil para el diagnóstico genético.

Estado de la técnica

La investigación de muestras biológicas relevantes para el diagnóstico tales como suero, plasma, sangre, muestras de frotis o raspado de órganos para la comprobación de agentes patógenos infecciosos ha aumentado enormemente su importancia en los últimos años. Infecciones víricas tales como VIH, VCH o VHB están extendidas a nivel mundial. Además de ello, también están nuevamente extendidas infecciones bacterianas, entre otras, también como resultado de los cambios climáticos que están comenzando. La aparición de nuevas enfermedades infecciosas mortales con un elevado potencial de infección (SARS, gripe aviar) demuestra de una forma cada vez más evidente que un diagnóstico rápido y que se pueda realizar in situ será decisivo para evitar epidemias. Además de ello, sistemas de diagnóstico fácilmente manejables y relativamente económicos, en particular para los países en desarrollo, juegan también un papel cada vez más importante para combatir la propagación de enfermedades infecciosas. Los test empleados en la actualidad principalmente para la detección de enfermedades víricas infecciosas (VIH, VCH, VHB) se basan en su mayoría también en la realización de PCRs en tiempo real. Estos test están asociados a requisitos técnicos de equipos extremadamente caros así como a reactivos también caros. La realización de estos métodos sólo se puede desarrollar por personal experto formado en laboratorios especiales. No es posible un diagnóstico in situ. Nuevas generaciones de soluciones de sistemas integrativos (combinación de aislamiento de ácido nucleico, amplificación y detección con chip) para un diagnóstico móvil in situ se encuentran en desarrollo, pero no en un estado de precomercialización con éxito. Además de ello, estos sistemas se centran también a menudo en el ámbito del diagnóstico militar y son también muy caros en comparación con los procedimientos “clásicos de PCR en tiempo real”, tanto en lo que se refiere a equipos como a reactivos.

La denominada tecnología PCR rápida permite la realización de reacciones de amplificación en el transcurso de tan sólo unos pocos minutos y es con ello claramente más rápida que un procedimiento PCR estándar. Para la solución de equipo miniaturizada, la invención se resuelve mediante una actividad reactiva novedosa (consumible). En el ámbito de los consumibles PCR se conocen diferentes métodos para su fabricación. El procedimiento de fabricación más extendido es el moldeo por inyección. Los consumibles así fabricados es encuentran comercialmente disponibles en una pluralidad de formas y disposiciones. Sin embargo, todos estos recipientes presentan un espesor de pared muy grueso (aprox. 0,2 mm – 0,35 mm), lo que representa una resistencia muy importante para una buena transmisión térmica, desde el bloque de muestra calentado a la muestra. Si se emplean estos recipientes en un termociclador conforme a su uso, el bloque de muestra que se encuentra en los equipos se calienta con una velocidad de hasta 5ºC/s. Sin embargo, la velocidad resultante en la muestra se reduce notablemente debido a los recipientes, de tal forma que la muestra (que se encuentra en el recipiente) sólo se calienta con aprox. 1,5-2 ºC/s. Incluso recipientes ofrecidos como “de pared fina” (mínimo grosor de pared de aproximadamente 0,19 mm; catálogo de productos de Eppendorf 07-08, pág. 200) no permiten mejorar este estado de forma notable. Los requisitos técnicos (calentar y enfriar) para un proceso rápido de las temperaturas en el PCR están técnicamente realizados, pero se ven muy perjudicados en su eficacia debido al consumible empleado.

Los volúmenes de muestra empleados habitualmente en el PCR se encuentran comprendidos en el intervalo de 5-50 µl. Los recipientes fabricados mediante moldeo por inyección presentan en el suelo su máximo grosor de pared, de tal forma que un temperado y la realización de una reacción PCR de pequeños volúmenes 1-10 µl (que se acumulan en el fondo de los recipientes) sólo se puede realizar lentamente y de forma muy imprecisa.

Los bloques de muestra metálicos empleados (aluminio, plata) en termocicladores con gran capacidad térmica hacen también que sea imposible realizar rápidos cambios de temperatura en la muestra incluso cuando se utilizan potentes elementos de calefacción. La rapidez de sistemas existentes en el mercado, que trabajan sobre la base de bloques de muestra metálicos y consumibles de moldeo por inyección, choca de este modo contra límites objetivos. De ello se deduce que debido a su enorme ineficacia térmica, variantes miniaturizadas, móviles de estos termocicladores superan de forma desmedida la capacidad de potencia eléctrica de la tecnología de baterías actual.

Otros sistemas estacionarios se basan en una tecnología avanzada para aumentar la eficacia térmica y hacer posible un PCR rápido.

Como sistema PCR rápido comercialmente disponible más conocido se debe de mencionar aquí el LightCycler de

Roche Molecular Biochemicals (cat. n.º 1909339 y cat. n.º 2011468). Este sistema se basa en el uso de capilares de vidrio muy delgados como consumibles PCR y da lugar a una temperización mediante aire caliente, que circula por los capilares. Estos capilares pueden absorber un volumen de 10-20 µl y se caracterizan por su gran superficie que hace posible una buena transmisión térmica. Sin embargo, esta gran superficie de vidrio absorbe componentes de restos de PCR estándar y permite de este modo que la reacción sea más inactiva. Para compensar este efecto se tienen que emplear, por ejemplo, diferentes moléculas portadoras, etc. (documento EP113359). Otro inconveniente viene dado también por el manejo de los capilares muy finos y su precio. Sin embargo, continúa siendo imposible una miniaturización y un manejo sencillo de los recipientes.

En el documento US2005/0227275 A1 se describe una tecnología que no se basa en consumibles estándar y que se puede aprovechar para el uso móvil. Aquí se introduce un tejido metálico mediante técnica de producción en una pared de la cámara de reacción PCR. Éste proporciona una transmisión térmica directa a la muestra. A pesar de que se indica que la pared tiene que ser delgada, no se indica cómo de delgada tiene que ser. Al mismo tiempo, no se hace referencia alguna al enfriamiento de la muestra. Con ello, si bien este documento explica que se tiene que realizar un PCR rápido, sólo entra de forma insuficiente en la conversión técnica. Bajo este punto, también se encuentra el hecho de que el consumible ahí descrito no es conforme a la necesidad de ser un material de consumo económico. La introducción de un tejido calefactor definido y un dispositivo para el control de la temperatura se oponen a este requisito. El objeto de acuerdo con la invención de esta publicación US2005/0227275 A1 es también la realización de una reacción PCR y una comprobación de productos de amplificación mediante una tira de flujo lateral. Se describe un PCR con nucleótidos y primarios marcados (reivindicación 1, figuras 1, 2, 3, 4, 6). Sin embargo, resulta inconveniente en este procedimiento que el producto PCR no se hibridice con una sonda marcada. La única comprobación de un producto de amplificación por esta vía es sin embargo muy insegura desde un punto de vista de diagnóstico, dado que no está garantizada la especificidad del producto de amplificación requerida al 100%. Para ello necesita de una reacción de hibridización específica. Además de ello, existe el peligro latente de que aparezcan resultados de falsos positivos debido a mispriming y dímeros de primer.

El uso de un diseño similar al de un “chip” para el alojamiento de una cámara PCR no representa un nivel inventivo debido a sus múltiples citas en la literatura de patentes. Más bien, la conformación de un mecanismo de calefacción/enfriamiento, la transmisión térmica global, la adición de componentes reactivos bioquímicos líquidos/sólidos y la conversión del mando de los parámetros de proceso representan una novedad. De este modo, por ejemplo, el documento WO 2007/092713 A2 se ocupa de un diseño de consumible en forma de chip que puede comprender también una cámara PCR además de clasificación celular y comprobación de proteínas inmunológicas. Mediante un procedimiento de tira de ensayo de flujo lateral se separan y discriminan diferentes tipos de células (precursoras de células de cáncer y células de cáncer) con la ayuda de anticuerpos correspondientes. Sin embargo, el procedimiento de flujo lateral no sirve para la comprobación de sucesos de amplificación. La comprobación de una expresión ARN a partir de ARN, que hasta ahora se realizaba en un denominado sistema de chip en laboratorio, se desvincula de este chip en laboratorio y se produce de la forma descrita en “la mesa de laboratorio con métodos por sí mismos conocidos”. Se describe que, de forma alternativa a ello, un reactor de amplificación y un detector pueden ser componentes del sistema de chip de laboratorio. No se entra en el detalle de la conformación de la cámara PCR en el sentido de las características anteriormente descritas en este documento. Tampoco se produce una mención a una reacción PCR en las reivindicaciones de patente. No obstante, se puede discutir aquí una variante móvil del sistema de equipo (con consumible). Para un funcionamiento del equipo independiente de red, la absorción de potencia se tiene que optimizar para el proceso y ser tan pequeña como sea posible. Mediante el uso de una pluralidad de módulos termoeléctricos (“hydrogel-ice valves” (válvulas de hielo de hidrogel)) y bombas de fluidos, un experto puede reconocer que este equipo no puede ser adecuado para el funcionamiento de baterías móviles.

Los autores del documento anteriormente descrito se ocupan con mayor detalle en una publicación de la temática de la fabricación de chips y de la cámara PCR en el interior de este o de un chip similar (Chen, Z. et al.; Ann. N.Y. Acad. Sci (marzo 2007) 1098; 429-436). Se presenta un sistema que comprende una cámara PCR y una tira de ensayo de flujo lateral. Medida según los indicadores de rápido (PCR rápido), móvil (funcionamiento de las baterías), económico (consumible) y manejable, esta invención se tiene que valorar como sigue. Para un experto es conocido que un PCR rápido está definido por una duración total de la reacción (con 30 ciclos en menos de 30 minutos) y mediante los cambios de temperatura alcanzados en la muestra (> 4 K/segundo). Sin la indicación de tasas de calentamiento o enfriamiento, un tiempo de ciclo de al menos un minuto (suma de los tiempos de espera sin duración del cambio de temperatura), así como el uso de una cámara PCR fabricada en policarbonato mediante técnica de fresado (grosores de pared de al menos 100 µm) queda claro para un experto que este sistema de equipos no es apto para un PCR rápido. En esta publicación no se menciona de ninguna forma un sistema móvil. Al igual que en el documento de patente anteriormente descrito tienen que estar alojados aquí en el equipo más de 10 módulos termoeléctricos, además dos válvulas de control de múltiples vías, una bomba de líquidos, una bomba de

vacío así como un escáner láser. Estos módulos constructivos tan intensivos en potencia así como el diseño de consumible no optimizado excluyen de este modo también la posibilidad para un funcionamiento móvil de baterías. Finalmente, un experto reconoce que este sistema se opone a un uso móvil, dado que la complejidad del consumible (varias fases de fabricación, introducción de hidrogeles) requiere de unos costes de fabricación desmedidos. La comprobación de la amplificación se realiza mediante el uso de 2 primarios marcados. Sin embargo, es conocido para el experto que un procedimiento de comprobación de este tipo es altamente problemático en una tira de ensayo, dado que productos específicos de amplificación no se pueden separar de los amplificadores no específicos y de los denominados dímeros de primer. Con ello un sistema de comprobación de este tipo no se puede utilizar en el diagnóstico.

Asimismo, la publicación de Wang y colaboradores forma parte del estado de la técnica (Wang, J. et al; Lab on a Chip (2006)6: 46-53). El sistema presentado en él puede ser identificado por un experto como una variante de los dos desarrollos anteriormente descritos (por ejemplo, mismo uso de válvulas de hielo o primarios marcados como sistema de comprobación). En él se vuelven a concretar una vez más las características exactas de la unidad de reacción PCR. Se indica un grosor de 250 µm para la pared entre elemento de calefacción/enfriamiento y muestra. Desde el lado de la tecnología, ésta cámara y todos los canales se introducen en un soporte de policarbonato mediante un procedimiento de fresado CNC. Con ello, la resistencia térmica de esta cámara se encuentra aún por encima de los recipientes comerciales de reacción (grosor de pared de entre 200 µm y 300 µm; material polietileno), en los que un PCR rápido sólo es posible mediante equipos de alta potencia. De este modo queda nuevamente excluido el uso del concepto para un funcionamiento con batería. La ineficacia del concepto le queda clara al experto, cuando los autores se ocupan de las dificultades para alcanzar una tasa de enfriamiento aceptable. Incluso con transporte térmico activo mediante elementos Peltier mediante la conexión de un ventilador de 14 Watios (ventiladores tradicionales para procesadores requieren 6 Watios) se logra en la muestra sólo 2,6 K/segundo (véase PCR rápido). También se tiene que destacar como crítico el concepto en lo que respecta al objetivo formulado de la minimización de costes. Según la publicación, se tienen que recorrer cadenas de producción de lo más variadas, para fabricar un chip con este concepto. Además del fresado de los canales de alta precisión, es necesario también pulir las superficies, se tienen que introducir hidrogeles, ensamblar dos mitades de chip mediante un procedimiento térmico costoso y realizar a continuación una reactivación de los geles. Con ello un experto puede reconocer que este concepto de chip hace imposible un consumible económico.

El estado de la técnica comprende además el documento de patente US 6,602,473 B1, que publica un equipo de mano que funciona con baterías, comprende una cámara de reacción PCR y orificios de entrada y de salida para primarios y otros componentes reactivos, en donde los ciclos de temperatura se pueden generar mediante elementos de película/calefacción termoeléctricos, y hace también posible la comprobación realizada a continuación de los productos de reacción mediante hibridización en sondas específicas sobre tiras de ensayo.

Descripción de la invención

La invención tenía el objeto de desarrollar un sistema novedoso móvil de test rápido para diagnóstico genético (combinación de hardware y reactivos) que se pueda manejar de una forma sencilla, haga posible una declaración de diagnóstico extremadamente rápida y sea económico tanto desde un punto de vista del equipo como también desde un punto de vista de los test que se van a realizar. Con ello también se debe dar la posibilidad de poder realizar el diagnóstico de enfermedades infecciosas en países en desarrollo sin limitaciones cualitativas.

El objetivo se resolvió mediante las características de las reivindicaciones de patente. El sistema móvil de test rápido para análisis de ácido nucleico comprende un dispositivo para la amplificación e hibridización de ácidos nucleicos con primarios de amplificación y al menos una sonda de hibridización, así como un kit de ensayo para la comprobación del suceso de amplificación y está caracterizado porque:

a) El producto de amplificación y la sonda de hibridización contienen al menos una marca cada uno, y

b) El kit de ensayo comprende al menos una tira de ensayo de flujo lateral que contiene respectivamente una zona para el acoplamiento de las marcas.

Por el término de “marca” se debe entender cada átomo o molécula que se pueda emplear para la generación de una señal demostrable (preferentemente cuantificable) sobre una tira de ensayo de flujo lateral y que se pueda asociar a un ácido nucleico.

Las marcas se pueden generar preferentemente mediante fluorescencia, colorimetría o actividad encimática y

señales comprobables similares. Son preferidas marcas mediante biotina y FITC (isotiocianato de fluoresceína).

La marca del producto de amplificación resulta o bien mediante una marca de un primario o a partir de una marca del ácido nucleico a determinar.

El dispositivo y el kit de ensayo son componentes integrados del sistema móvil de test rápido y este sistema representa un equipo de mano miniaturizado para manejar de forma móvil que durante el funcionamiento no requiere de una fuente externa de tensión, sino que se hace funcionar mediante una batería o un acumulador.

El sistema móvil de test rápido contiene una cavidad de reacción para la realización de una amplificación de ácidos nucleicos, preferentemente mediante la tecnología de PCR rápido, uno o varios orificios de entrada o de salida para la cavidad de reacción, uno o varios bloques de muestra calefactables que están conectados con cuerpos de refrigeración miniaturizados y una posibilidad para la lectura del resultado, en donde la cavidad de reacción contiene una lámina de plástico con un grosor de lámina inferior a 300 µm, preferentemente inferior a 100 µm. La lámina de plástico está formada preferentemente por polipropileno y se sella con estabilidad de forma en una geometría deseada y se presiona contra el bloque de muestra mediante una ligera presión desde arriba.

Un primario de amplificación está preferentemente marcado mediante biotina y la sonda de hibridización está preferentemente marcada mediante FITC y está protegida en el extremo 3' contra la polimerización ("bloqueada"). Este "bloqueo" se puede lograr, por ejemplo, mediante el uso de bases no complementarias o mediante la adición de un grupo químico, como, por ejemplo, un grupo de fosfatos, al 3'-hydroxil del último nucleótido. El bloqueo también se puede lograr mediante la eliminación del 3'-OH o mediante el uso de un nucleótido sin el 3'-OH, como un didesoxinucleótido.

La tira de ensayo de flujo lateral porta puntos de unión separados, preferentemente dos, un punto de estreptadivina para el acoplamiento de los productos de amplificación marcados y un punto de unión para el control de funcionamiento de la tira de ensayo, así como una zona con partículas de comprobación conjugadas (por ejemplo, partículas de oro anti-FITC).

También es objeto de la invención un procedimiento para la comprobación de ácidos nucleicos mediante el sistema móvil de test rápido anteriormente descrito con los siguientes pasos:

- Amplificación de los ácidos nucleicos mediante la tecnología de PCR rápido con primarios de amplificación, de los cuales o bien al menos uno está marcado o se marcaron los ácidos nucleicos;

- Transformación de un producto de amplificación de doble cadena en un fragmento de ADN de cadena única (desnaturalización);

- Hibridización del producto de amplificación desnaturalizado mediante al menos una sonda de hibridización marcada, y

- Comprobación de los ácidos nucleicos en una tira de ensayo de test lateral, que contiene correspondientemente una zona para el acoplamiento de las marcas.

La invención resuelve la problemática descrita de la forma más ideal mediante una combinación sencilla y sinergética de un sistema de equipo para la realización de reacciones específicas de amplificación y una química sencilla de comprobación para la detección de un suceso específico de amplificación, en donde el sistema de equipo se presenta en forma de un denominado sistema de mano y con ello no sólo se miniaturiza sino también se hace funcionar de forma móvil, es decir, sin necesidad de una fuente externa de tensión, sino mediante un funcionamiento con baterías.

La invención se basa para ello en el aprovechamiento de la denominada tecnología PCR rápida.

La invención resuelve como sigue los problemas existentes de un termociclador de PCR rápido de mano miniaturizado en combinación con un módulo de detección:

La invención se basa en una disposición y concepción novedosa de elementos de calefacción y bloque de muestra, que son adecuadas para un uso móvil en rendimiento y tamaño, en combinación con un consumible totalmente novedoso (actividad de reacción para la reacción de amplificación) con una transmisión térmica notablemente

mejorada. Mediante la invención se logra que el consumible novedoso se optimice de tal forma que se pueda superar el mayor problema, la resistencia física para una temperización PCR eficaz. Una transmisión térmica óptima estará presente cuando una muestra se pueda entregar directamente sobre el bloque de muestra o el medio temperado sin materiales que estorben y transmisiones térmicas adicionales. Una realización de este tipo no era posible hasta el momento por motivos de la contaminación.

Una perturbación tan sólo mínima de la transmisión térmica se daría cuando se pudiera emplear una capa extremadamente delgada de un material biocompatible. Esto se resuelve a través de la invención, mediante la utilización de una lámina de polipropileno de capa extremadamente delgada. Esta lámina se coloca o pliega para ello en una geometría deseada y se sella con estabilidad de forma. Esta geometría específica se caracteriza porque en la base para el volumen de muestra rellenable de la carga de amplificación presenta una superficie lo más grande posible. Esta superficie de gran tamaño sirve como superficie de transmisión térmica al bloque de muestra calentado. Mediante la lámina ultrafina se opone una resistencia mínima a una transmisión térmica. Todas las superficies no calentadas de la cámara de reacción están reducidas a un mínimo, de tal forma que no se puede producir ninguna descarga térmica innecesaria hacia el entorno. De este modo es posible, dentro de la muestra, realizar una eficacia de tasa de calentamiento del bloque de muestra a la muestra de prácticamente un 100%. Preferentemente, las superficies no calentadas son entre 1,4 y 1,9 veces más grandes, en particular 1,7 , que las superficies calentadas.

Como bloque de muestra para emplear se utiliza un elemento Peltier que funciona con una batería que está atornillado con un cuerpo de refrigeración adaptado al sistema global. La geometría empleada del bloque de muestra se caracteriza como punto contrario del consumible también por una superficie máxima. El volumen, y con ello también la capacidad del bloque de muestra, está reducido de acuerdo con la invención a un mínimo absoluto. El bloque de muestra se puede calentar de este modo teóricamente con una tasa de calentamiento de 15 ºC/s. La geometría del consumible se ha elegido de acuerdo con la invención de tal forma que mediante una ligera presión desde arriba y aprovechamiento de los efectos físicos, se realiza una fuerte presión contra el bloque de muestra y se favorece y realiza de este modo también un calentamiento uniforme con estas velocidades.

Con ello están dados los requisitos para realizar una reacción de amplificación con un pequeño equipo móvil utilizando una batería normal, así como la realización de una reacción ultrarápida. Sin embargo, un experto tiene claro que únicamente con una posibilidad móvil y miniaturizada de la realización de la reacción PCR no se puede llevar a cabo un diagnóstico móvil in situ. El sistema requiere para ello también la detección de la ocurrencia de una amplificación objetiva específica.

Para ello, la detección tiene que ser un componente integrado del sistema global. Esta combinación de amplificación y detección se realiza sorprendentemente a través de la invención de una forma muy sencilla mediante el uso de las denominadas tiras de ensayo de flujo lateral, conocidas para el experto. Si bien ambas tecnologías (PCR rápido y tira de flujo lateral) existen como técnicas estándar, no existe ninguna asociación entre ambas tecnologías en forma de un sistema integrativo global, que cumplen los requisitos para un diagnóstico específico. Tal y como se ha indicado anteriormente, una serie de sistemas de equipo similares aprovechan estrategias de comprobación que no hacen posible un diagnóstico correcto o no utilizan ninguna reacción de amplificación de ácidos nucleicos (US 2005/0227275 A1, WO 2007/092713 A2, Chen, Z. et al.; Ann.N.Y. Acad. Sci. (marzo 2007) 1098: 429-436, Wang, J. et al.; Lab on a Chip (2006)6: 46-53).

Sin embargo, mediante la invención se hace posible un diagnóstico exacto. Para ello, la invención no sólo une un módulo de amplificación con una tira de flujo lateral, sino que se basa en una estrategia de comprobación, que tiene en cuenta los requisitos para el diagnóstico. Para subrayar las diferencias se vuelve a destacar a continuación que las tiras de flujo lateral se emplean para el diagnóstico ADN/ARN.

La realización de ensayos genéticos mediante las denominadas tiras de flujo lateral se ha propagado hasta la fecha de diferentes formas. Una posibilidad (publicación KR 1020060099022 A; Method for the detection and analysis of nucleotide sequence using membrane lateral flow, and kit for the same (método para la detección y análisis de secuencia de nucleótidos utilizando flujo de membrana lateral y kit para ello)) utiliza el procedimiento de flujo lateral para detectar ácidos nucleicos. Este procedimiento hace uso de la tecnología de la hibridización de ácidos nucleicos en una fase sólida. Para ello se inmovilizan captores específicos de ácidos nucleicos sobre la tira de ensayo y se hibridizan con ácidos nucleicos objetivo de una cadena única. Un captor de ácido nucleico es un ácido ribonucleico o un ácido desoxirribonucleico de una única cadena o que se convierte sólo en el desarrollo del procedimiento en una cadena única, que contiene posiblemente bases o analogías de base químicamente modificadas, azúcares o analogías de azúcar químicamente modificadas o está modificada de otra forma y se caracteriza porque se une con

una elevada especificidad y selectividad con un ácido nucleico o clase de ácidos nucleicos determinada, predefinida. Este proceso necesita para ello de la transformación de un fragmento de ADN de doble cadena (como resultado de una reacción de amplificación específica) en un fragmento de ADN de cadena única. El proceso se tiene que realizar para ello continuación de la reacción PCR. Otro método rápido de comprobación que se ocupa también de la comprobación de productos de amplificación mediante una tira de ensayo y que se ofrece comercialmente se basa a diferencia del documento de patente anterior, en un principio completamente diferente. Para ello tiene lugar la realización de la reacción PCR con un primario biotinilizado y un primario no biotinilizado. Después de la realización del PCR, se encuentra un producto PCR que está marcado con biotina en un extremo. La comprobación utiliza una tira de ensayo (por ejemplo, de la marca Millenia) que contiene dos puntos de unión separados. Un punto de estreptadivina para el acoplamiento de la cadena de ADN marcada con biotina y un punto de unión FITC para el control de funcionamiento de la tira de ensayo.

La comprobación del producto PCR se realiza haciendo que después de haber realizado el PCR, se desnaturaliza la carga PCR y se hibridiza con una sonda complementaria a la cadena de ADN marcada con biotina. La zona está marcada con FITC.

Para la comprobación se mezcla la carga PCR con un tampón de migración y se aplica sobre la tira de ensayo. Después de la descripción del ensayo, se une la cadena de ADN biotinizada al punto de unión de estreptadivina de la tira. La comprobación se realiza mediante una marca FITC de la sonda hibridizada con la cadena de ADN. Se forma una señal típica en forma de una tira. Esta señal debe de ser la comprobación específica del producto de amplificación. El procedimiento no combina sin embargo la hibridización de la sonda con el proceso del PCR, sino que lo realiza en pasos de procedimiento independientes. Sin embargo, el procedimiento tiene una fuente de error principal y dramática.

La detección del ácido nucleico objetivo a comprobar no es específica. La causa de ello se encuentra en que mientras que el artefacto creado durante el PCR, por ejemplo, dímero de primer, naturalmente también se une específicamente al punto de unión de estreptadivina de la tira de ensayo y con ello también pueden provocar una reacción positiva al igual que un producto PCR específico (tal y como se ha descrito varias veces en el texto anterior).

De estas presentaciones se deduce que, a pesar de que existen soluciones aplicativas para la realización de test genéticos en la tira, éstas adolecen además de la amplificación también de la desnaturalización del producto de amplificación y no permiten por ello una combinación directa de amplificación y detección. Además de ello, tal y como se muestra en el ejemplo 2, determinados procedimientos no son específicos y son muy problemáticos con vistas a la generación de resultados de diagnóstico de falsos positivos.

Una posibilidad novedosa y muy elegante se basa en una hibridización de sonda integrada en la reacción de amplificación entre amplificador y sonda de hibridización específica. La comprobación del suceso de hibridización específico se realiza de este modo en una tira de ensayo. Con ello se da por primera vez la posibilidad de trabajar sin ninguna manipulación adicional (desnaturalización de ADN de doble cadena) y mediante la superación de los problemas de amplificación ya representados, y con ello de poder combinar la reacción de amplificación/hibridización directamente con la comprobación en una tira de ensayo. La comprobación de un producto de amplificación-hibridización se realiza haciendo que esté previsto un primario de amplificación y una sonda de hibridización específica en el extremo 3' con una molécula de marcado correspondiente (por ejemplo, biotina y FITC). La reacción de amplificación se produce bajo condiciones estándar. Para ello, a la propia reacción de amplificación le sigue un paso de desnaturalización para la separación térmica de cadenas del producto de amplificación generado durante el PCR. Después de la desnaturalización se enfría la carga de reacción PCR hasta la temperatura de hibridización de la sonda. Durante este paso, la sonda de hibridización se une específicamente a la cadena de ADN complementaria del producto de amplificación. Esta cadena lleva para ello la marca de biotina, que se introdujo a través del primario marcado con biotina en el producto PCR. Después de la realización de la reacción de amplificación-hibridización, se transfiere la carga de reacción a la tira de ensayo. Sobre la tira de ensayo se puede realizar la comprobación del suceso de hibridización específico como sigue: la tira de ensayo porta, por ejemplo, en una variante de realización, dos puntos de unión separados entre sí; un punto de estreptadivina para el acoplamiento de los productos de amplificación marcados con biotina y un punto de unión FITC para el control de funcionamiento de la tira de ensayo. Además de ello, la tira de ensayo contiene una zona con partículas de comprobación conjugadas (por ejemplo, partículas de oro anti-FITC). Después de la puesta en contacto de la carga PCR con una tira de ensayo de este tipo se pueden producir los siguientes sucesos de unión:

1. Todos los ácidos nucleicos marcados con FITC (sonda de hibridización marcada con FITC no hibridizada o

producto de hibridización entre cadena de ADN marcado con biotina y sonda de hibridización marcada con FITC) se unen en la zona inferior de aplicación de la muestra de la tira de ensayo a partículas de oro que están recubiertas con anticuerpos anti-FITC.

2. En el siguiente tramo de la tira de ensayo se encuentra el punto de unión de estreptadivina. En este punto de unión se pueden formar los siguientes ácidos nucleicos:

(a) El primario marcado con biotina;
(b) Las cadenas de ADN marcadas con biotina, y
(c) Los productos de hibridación entre cadena de ADN marcada con biotina y sonda de hibridización marcada con FITC.

Sin embargo, una señal de comprobación sólo puede ser visible, cuando el producto de hibridización específico está presente entre cadena de ADN marcada con biotina y sonda de hibridización marcada con FITC, dado que sólo este producto también está acoplado con el sistema de comprobación (FITC – anti-FITC – partículas de oro).

3. En el siguiente tramo de la tira de ensayo se unen a continuación las partículas de oro sobrantes recubiertas con anticuerpos anti-FITC, que sirven para el control de la capacidad de funcionamiento de la tira de ensayo.

Esta variante de realización es, tal y como se ha indicado, muy elegante y no oculta el riesgo potencial de señales de falso positivo. Es con ello la variante favorita de uso de una tira de ensayo de flujo lateral para el sistema de comprobación móvil de acuerdo con la invención.

La invención se debe de entender como combinación del procedimiento novedoso para la detección de amplificadores y un dispositivo novedoso para el uso móvil. En la conversión de acuerdo con la invención del dispositivo, se unifican la estrategia de detección mediante tira de flujo lateral, una función de muestra inteligente y una temperización eficiente en energía de volúmenes de muestra en un consumible económico porque es sencillo de fabricar.

Una realización de acuerdo con la invención del dispositivo tiene el siguiente aspecto:

El consumible representa una integración constructiva de los módulos funcionales para el objetivo de la mezcla reactiva obtenida inicialmente (ácido nucleico a investigar, dNTP's, primario, sonda de hibridización, así como tampón de amplificación), para la realización de una reacción de amplificación eficiente en energía, para la conservación y la aplicación de un tampón de migración así como para la reacción de comprobación mediante tira de ensayo. El equipo que funciona con batería está realizado de tal forma que representa un medio ideal para el procesado de las secciones de funcionamiento del consumible. El desarrollo del procesamiento comienza con la provisión de la mezcla de reacción a través del orificio de entrada, en donde la mezcla se conduce directamente o a través de largos recorridos de proceso, hasta la cámara de amplificación. Una vez realizada la reacción de amplificación/hibridación se conduce la carga de reacción a través del orificio de salida sobre la tira de ensayo. Desde un depósito independiente se aporta a continuación el tampón de migración igualmente sobre la tira de ensayo, en donde en una variante de realización, el tampón de migración puede recorrer con anterioridad la cámara de reacción. El depósito para el tampón de migración se encuentra también en el cartucho. Una vez finalizada la reacción en la tira de ensayo el resultado de diagnóstico se lee en una zona visible. El cartucho de reacción, que contiene el módulo de amplificación y la tira de ensayo, así como el depósito para el tampón de migración, es preferentemente de un único uso, es decir, que para cada reacción se introduce un nuevo equipo de base y se elimina una vez completado el ensayo.

El dispositivo de acuerdo con la invención es también sin el sistema de comprobación de acuerdo con la invención, objeto de la invención descrita y se puede combinar también con el sistema de comprobación anteriormente mencionado de los ácidos nucleicos captores. Con ello se ofrece un sistema que consiste en el dispositivo de acuerdo con la invención según una de las reivindicaciones 3 a 12 y una tira de ensayo, sobre la que están inmovilizados ácidos nucleicos captores especiales y mediante el cual se realiza la comprobación de los ácidos nucleicos a determinar mediante la hibridización con los ácidos nucleicos captores sobre la tira de ensayo.

A continuación se describen estas variantes de realización de acuerdo con la invención, sin limitar la invención a estas variantes.

Ejemplos de realización

Ejemplo 1

En el orificio de entrada se realiza la alimentación de la mezcla de reacción. El orificio de entrada se sella mediante un filamento incandescente integrado en el equipo. El filamento incandescente se mueve para ello mediante un sencillo mecanismo de presión hacia el orificio de entrada. En esta realización, tanto el consumible empleado de acuerdo con la invención para la reacción de amplificación/hibridización (actividad de reacción), como la tira de ensayo, están alojados a continuación del otro en el cartucho de reacción.

Ejemplo 2

La variante de realización del consumible está conformada de tal forma que uno o todos los líquidos se transportan sobre el consumible a través de estructuras de fluidos novedosas desde un módulo funcional al siguiente. Estas estructuras se generan mediante una técnica de fabricación tal que dos superficies se sitúan una encima de la otra, en donde al menos una de estas superficies está formada por un material plástico o elásticamente deformable. En el límite de las estructuras, por ejemplo los bordes de canal o de la cámara, las dos superficies se unen entre sí en unión no positiva y/o positiva. Cuando se solicita la ranura delgada, que puede representar esta estructura, con una presión de fluido, se abomba al menos una de las superficies y deja libre una ranura de mayor tamaño para el paso entre las dos superficies. Mediante este concepto novedoso se hace posible una fabricación económica de elementos de fluídica en el consumible.

Ejemplo 3

En otra variante de realización, la cámara de reacción representa una perforación o un ahondamiento en el material de soporte del consumible. El cierre de la cámara se logra al presionar la lámina situada por encima contra los bordes de la perforación, o del ahondamiento respectivamente. En una realización de esta variante la presión se genera a través del bloque de muestra, de tal forma que éste realiza tanto la transmisión de calor como también el cierre de la cámara. Los elevados requisitos a la obturación a presión durante el PCR se logran al realizar el bloque de muestra de forma convexa y la abertura de cámara de forma circular.

Ejemplo 4

La conservación y la aplicación del tampón de migración puede estar conformada en una variante de realización como sigue: entre la lámina y el material de soporte se logra una cavidad mediante procedimientos de fabricación que proporcionan espacio. Ésta se rellena durante la fabricación/equipamiento del consumible con tampón de migración. El orificio de salida del depósito está cerrado con una válvula que depende de la presión que, por ejemplo, puede estar sustituida por una costura de sellado nuevamente liberable. Para una alimentación del tampón a la cámara de reacción se solicita la cámara del tampón a través el equipo o por el usuario con una presión mecánica, de tal forma que se abre la válvula y el tampón se desplaza hacia la tira de ensayo.

Ejemplo 5

En esta variante de realización, unos émbolos móviles y cilindros huecos correspondientes son parte del consumible. Para ello estos cilindros pueden estar rellenos con líquidos desde la fabricación (por ejemplo, tampón de migración, reactantes). El orificio de entrada del consumible está formado de tal forma que se puede unir una herramienta de provisión de muestra en unión positiva. Esta herramienta también está formada por un cilindro hueco con émbolo. Para una extracción de muestra, el émbolo se eleva en el cilindro y se conecta a continuación al consumible. El usuario y/o el equipo pueden mover los émbolos del consumible y de la herramienta de extracción. Mediante el movimiento del émbolo en la herramienta de provisión de muestra se presiona la muestra hacia el interior de la cámara de reacción. El aire que se tiene que evacuar de este modo de la cámara o de las zonas de fluídica, se escapa hacia espacios libres de aire y/o hacia orificios de salida que están colocados fluídicamente a continuación de la zona de comprobación. De este modo se produce el presionado de uno o varios bloques de muestra desde uno o varios lados de la cámara de reacción. Mediante este proceso la cámara de reacción se cierra de forma estanca a la presión como en el ejemplo 4, de tal forma que se puede producir una temperización de la muestra energéticamente ventajosa. Mediante la retirada de los bloques de muestra se puede presionar ahora la muestra aún más en dirección hacia la cámara de comprobación. Para ello se puede mover el émbolo de la herramienta de provisión de muestra y/o el émbolo del cilindro con el tampón de migración. Aire y/o líquido de los cilindros descritos desplazan la muestra desde la cámara de reacción y la mueve hacia la tira de ensayo. Otro tampón de migración del cilindro correspondiente se lleva sobre la tira de ensayo mediante el movimiento de los

émbolos. El usuario puede leer el resultado de la detección a través de una ventana de visualización en la zona de comprobación. Al igual que la herramienta de provisión, en otra forma de realización diferente, la zona de comprobación también puede ser liberable de forma reversible o estar conectada al consumible global, y reemplazarse por un sistema alternativo de comprobación.

Mediante la combinación de acuerdo con la invención de PCR rápido y detección del suceso de amplificación mediante un sistema manual móvil y accionado por baterías se da por primera vez el requisito para un análisis de diagnóstico genético in-situ muy sencillo y económico. Para ello, el equipo de mano es naturalmente mucho más económico que sistemas de equipo altamente equipados propuestos hasta la fecha, particularmente para usos militares. Esto también tiene que hacer posible el uso universal de ensayos rápidos de diagnósticos genéticos en países en desarrollo. Mediante el procedimiento de acuerdo con la invención se hace posible la realización de una reacción de amplificación extremadamente rápida. La detección que se realiza a continuación sobre una tira de ensayo es también muy rápida y robusta. Con ello, la invención representa un sistema de ensayo rápido real.

Descripción de las figuras:

La invención se describe más detalladamente en base a dos figuras. En el anexo están representados los esquemas básicos de los medios de acuerdo con la invención. Los dibujos no sirven con ello como limitación para otras formas de realización. La figura 1 muestra la representación esquemática del cartucho. La figura 2 muestra la representación esquemática del equipo (fuente de tensión y cartucho de reacción).

Lista de símbolos de referencia:

A: Orificio de entrada
B: Consumible para la reacción de amplificación-hibridización
C: Orificio de salida y unión entre consumible y tira de ensayo
D: Depósito para tampón de migración
E: Orificio de salida desde el depósito para tampón de migración y conducción hacia la tira de ensayo
F: Tira de ensayo
G: Ventana de visualización para la detección de la señal de comprobación sobre la tira de ensayo
H: Batería como fuente de tensión
I: Elemento de calefacción/refrigeración

REIVINDICACIONES

1. Sistema móvil de test rápido para análisis de ácido nucleico en forma de un equipo manual a hacer funcionar de forma móvil, que durante el funcionamiento no necesita de ninguna fuente de tensión externa, que comprende un dispositivo para la amplificación e hibridización de ácidos nucleicos así como un kit de ensayo para la comprobación del suceso de amplificación, en donde el dispositivo comprende una cavidad de reacción para la realización de una amplificación de ácidos nucleicos mediante la tecnología de PCR rápido, uno o varios orificios de entrada o de salida para la cavidad de reacción, uno o varios bloques de muestra calefactables que están unidos con cuerpos miniaturizados de refrigeración y una posibilidad para la lectura del resultado, **caracterizado porque**:

a) Los bloques de muestra calefactables están realizados de forma convexa y las superficies no calentadas son entre 1,4 y 1,9 veces más grandes que las superficies calentadas;
b) La cavidad de reacción contiene una lámina de plástico con un grosor de lámina que es menor que 300 µm, y
c) La comprobación del suceso de amplificación se realiza mediante una tira de ensayo de flujo lateral.

2. Sistema móvil de test rápido según la reivindicación 1, **caracterizado porque** en los bloques de muestra calefactables las superficies no calentadas son 1,7 veces más grandes que las superficies calentadas.

3. Sistema móvil de test rápido según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la cavidad de reacción contiene una lámina de plástico con un grosor de lámina que es menor que 100 µm.

4. Sistema móvil de test rápido según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** el dispositivo y el kit de ensayo son componentes integrados del sistema móvil de test rápido y este sistema funciona mediante una batería o un acumulador.

5. Sistema móvil de test rápido según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** cada tira de ensayo de flujo lateral contiene una zona para el acoplamiento de marcas.

6. Sistema móvil de test rápido según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** la lámina de plástico está formada por polipropileno y se sella en una geometría deseada con estabilidad de forma y se presiona desde arriba con una ligera presión contra el bloque de muestra.

7. Sistema móvil de test rápido según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** la cavidad de reacción y la tira de ensayo están dispuestas en un cartucho de reacción y porque la lámina de plástico genera unos canales de unión con el cartucho de reacción.

8. Sistema móvil de test rápido según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** comprende además un depósito y un orificio de salida para un tampón de migración.

9. Sistema móvil de test rápido según la reivindicación 8, **caracterizado porque** contiene unos canales de unión que se pueden cerrar entre la cavidad de reacción, la tira de ensayo y el depósito del tampón de migración.

10. Sistema móvil de test rápido según una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado porque** la actividad de reacción contiene dos superficies, que se pueden unir entre sí en unión no positiva y/o positiva a bordes de canal o de cámara, en donde al menos una de estas superficies está formada por un material plástico o elásticamente deformable.

11. Sistema móvil de test rápido según una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado porque** la cavidad de reacción contiene un ahondamiento.

12. Sistema móvil de test rápido según una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado porque** la cavidad de reacción contiene émbolos móviles y cilindros huecos correspondientes para el almacenamiento de reactantes.

13. Sistema móvil de test rápido según una de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado porque** el bloque de muestra calefactable, que está unido con un cuerpo miniaturizado de refrigeración, representa un elemento Peltier que funciona con batería, mediante el cual es posible una tasa de calentamiento de hasta 15 ºC/s.

14. Sistema móvil de test rápido según una de las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizado porque** la tira

de ensayo de flujo lateral porta dos puntos de unión separados, un punto de estreptadivina para el acoplamiento de los productos de amplificación marcados y un punto de unión para el control de funcionamiento de la tira de ensayo, así como una zona con partículas de comprobación conjugadas, preferentemente partículas de oro anti-FITC.

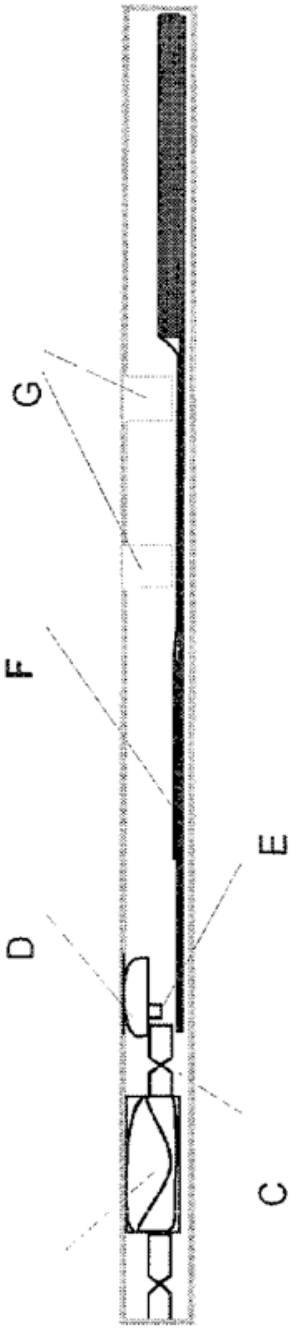

Figura 1

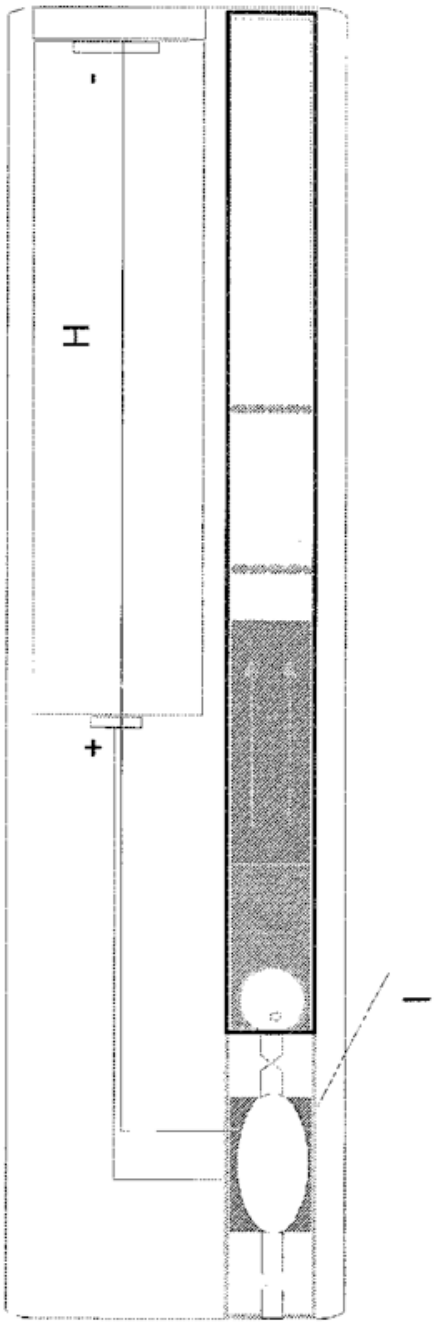

Figura 2