

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 100**

51 Int. Cl.:

G01N 33/542 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2008 E 08761034 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2015 EP 2167964**

54 Título: **Procedimiento para la realización y evaluación de ensayos de mezclado y medición para la medición de cinéticas de reacción así como de concentraciones y afinidades de analitos en formato múltiplex**

30 Prioridad:

13.06.2007 DE 102007027779

29.06.2007 DE 102007031137

08.02.2008 DE 102008008485

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

17.06.2015

73 Titular/es:

**ATTOMOL GMBH MOLEKULARE DIAGNOSTIKA
(100.0%)
SCHULWEG 6 OT LIPTEN
03205 BRONKOW, DE**

72 Inventor/es:

**LEHMANN, WERNER;
BÖHM, ALEXANDER;
GROSSMANN, KAI;
HIEMANN, RICO;
NITSCHKE, JÖRG y
RÖDIGER, STEFAN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 538 100 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la realización y evaluación de ensayos de mezclado y medición para la medición de cinéticas de reacción así como de concentraciones y afinidades de analitos en formato múltiplex

5 La invención se refiere en general al campo de la amplificación de ácidos nucleicos, de la enzimología y de la inmunología. En particular, la invención se refiere a un procedimiento para la medición en tiempo real (*real time*) de cinéticas de reacción en el formato de prueba de mezclado y medición (*Mix & Measure*), registrándose y evaluándose varios parámetros al mismo tiempo (múltiplex). También son objeto de la invención un sistema de medición de fluorescencia multicolor con regulación térmica, una matriz de perlas así como un kit para detectar moléculas diana en la matriz, preferiblemente para PCR en fase líquida, PCR en fase sólida y PCR múltiplex.

10 Los procedimientos para determinar analitos en una muestra se realizan en tiempo real como ensayos de mezclado y medición, para ahorrar costes y tiempo durante la realización de la determinación o para mejorar la exactitud así como la robustez de las pruebas. Las pruebas de este tipo se utilizan por ejemplo para la selección farmacéutica de alto rendimiento o el análisis de ácidos nucleicos en el diagnóstico médico.

15 A este respecto, en la mayoría de los casos es muy importante regular la temperatura de reacción, es decir mantener la temperatura constante, crear un gradiente o atemperar ciclos térmicos rápidos de manera idéntica o con diferentes evoluciones mientras se registran y procesan de manera continua los parámetros de medición. A menudo se detectan señales de fluorescencia, dado que éstas pueden combinarse de manera variada con el formato de ensayo de mezclado y medición. Las variaciones, por ejemplo, de las intensidades de la fluorescencia, de la duración de la fluorescencia o de la polarización de la fluorescencia pueden ser indicadores de, por ejemplo, 20 concentraciones de analitos que varían en muestras o de interacciones intermoleculares y pueden medirse sin contacto, es decir en diferentes formatos de prueba, en un recipiente de reacción cerrado. Por formatos de prueba de mezclado y medición se entiende un procedimiento de análisis, en el que todos los componentes que reaccionan permanecen en un compartimento de medición hasta el registro de señales.

25 De procedimientos para el reconocimiento y la determinación de cantidades de ácidos nucleicos, en particular la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se conoce que, a modo de ejemplo, necesitan todas las condiciones previas mencionadas anteriormente para poder realizarse de manera óptima. La PCR puede utilizarse para afirmaciones tanto cualitativas como cuantitativas. Una determinación de cantidades de productos de PCR puede tener lugar de diferentes maneras. Los métodos de detección recientes permiten medir la síntesis *in vitro* de productos de PCR "en tiempo real", es decir de manera homogénea directamente en el recipiente de reacción de 30 PCR usado en cada caso, en la fase líquida. Esta denominada PCR en tiempo real es un método especialmente sensible. En este sentido, en cada ciclo de la PCR se hace un seguimiento de la generación de productos de PCR. La medición de la amplificación tiene lugar a este respecto por regla general en termocicladores, que presentan medios adicionales para la medición de señales de fluorescencia durante la reacción de amplificación. Los productos de amplificación se detectan por ejemplo mediante muestras de hibridación marcadas con fluorescencia, que sólo 35 fluorescen en caso de unión al ácido nucleico diana, o mediante colorantes fluorescentes que se unen a ADN bicatenario. Se establece un valor umbral de señal definido para todas las reacciones analizadas y se determina el número de ciclos (C_p) necesario para alcanzar el valor umbral tanto para el ácido nucleico diana como para los ácidos nucleicos de referencia. Basándose en los valores C_p obtenidos para el ácido nucleico diana así como el ácido nucleico de referencia pueden determinarse entonces los números de copias o bien absolutos o bien relativos de la molécula diana. 40

Un procedimiento reciente para detectar una molécula de ácido nucleico específica usa denominadas "balizas moleculares" (Tyagi *et al.* documento US 6.150.097A). Las balizas moleculares son oligonucleótidos marcados con colorante, que tienen una estructura de tallo-bucle. En los dos extremos libres de los fragmentos de tallo (el extremo 3' y el 5') está acoplado en cada caso un fluoróforo, actuando uno como colorante indicador y el otro como colorante 45 extintor, que extingue la fluorescencia del colorante indicador en caso de una proximidad espacial suficiente mediante transferencia de energía por resonancia Förster (FRET). Las secuencias de los fragmentos de tallo en ambos extremos de las balizas moleculares se seleccionan de tal manera que, cuando se dobla la baliza molecular, los fragmentos de tallo se hibridan exclusivamente entre sí, pero no con otros fragmentos del oligonucleótido. La separación entre el colorante indicador y el colorante extintor es suficientemente pequeña en el estado de los 50 fragmentos de tallo hibridados, de modo que el colorante fluorescente tampoco fluoresce en caso de una excitación adecuada con luz. El fragmento de bucle presenta una secuencia, que es complementaria a la secuencia de una secuencia diana. Si las balizas moleculares y las moléculas de ácido nucleico que presentan secuencia diana se encuentran en una disolución, los fragmentos de bucle y los fragmentos de secuencia diana pueden hibridarse, con lo que se desdobra la baliza molecular con la disolución de la hibridación de ambos fragmentos de tallo. Este 55 desdoblamiento conduce al aumento de la separación espacial entre el colorante indicador y el colorante extintor, y el colorante indicador se excita para dar fluorescencia. En caso de observar de manera continua la intensidad de fluorescencia puede establecerse un aumento de la intensidad cuando las balizas moleculares detectan las secuencias diana y se hibridan con las mismas. Así pueden detectarse cuantitativamente las moléculas de ácido nucleico. Estas balizas moleculares tienen la gran desventaja de una síntesis compleja y cara, dado que estas 60 sondas deben marcarse tanto con el colorante fluorescente como con el colorante extintor. Los sistemas de colorante extintor-colorante fluorescente se aprovechan en sistemas de sondas comparables tales como sondas de

cebador Amplifluor, Scorpions y TaqMan.

Un sistema conocido adicional es el sistema Light-Cycler. En este caso se distribuyen los colorantes fluorescentes en dos oligonucleótidos diferentes. En el extremo 3' del primer oligonucleótido se encuentra un colorante fluorescente (por ejemplo fluoresceína), un colorante fluorescente adicional se encuentra en el extremo 5' del oligonucleótido que se añade en el sentido de 3' (por ejemplo LC Red 640). La fluoresceína se excita por un LED como fuente luminosa y emite luz, que a través de FRET excita la segunda molécula fluorescente. La luz emitida por el segundo colorante se mide a través de un filtro de fluorescencia con detector. Una excitación del segundo colorante sólo puede tener lugar cuando mediante la adición de ambos oligonucleótidos en su hebra complementaria las dos moléculas de colorante se encuentran en proximidad espacial (distancia de 1 a 5 nucleótidos). El principio de este sistema se basa en la excitación secundaria de un segundo colorante fluorescente, que no se posibilita hasta la generación del producto de PCR.

Dichos sistemas pueden utilizarse básicamente para aplicaciones múltiplex, pero tienen la desventaja en la detección paralela de diferentes secuencias objetivo, que la mezcla básica de reacción se vuelve relativamente cara debido al número creciente de diferentes sondas de detección y que el número creciente de sondas puede perjudicar la reacción de amplificación. Además no se conocen suficientes pares de FRET para conseguir un alto grado de múltiplex.

En la implementación técnica de ensayos de ácido nucleico para estudios rutinarios son importantes: el ensayo homogéneo, el procedimiento múltiplex así como las micromatrices (también denominadas chips génicos o biochips). En una PCR múltiplex con el sistema de cebador/sonda o el kit pueden combinarse varios conjuntos de cebadores con el procedimiento descrito anteriormente, que debido a diferentes secuencias permiten la detección de varias secuencias objetivo, sin embargo en la mayoría de los casos no más de cinco, en una mezcla básica de reacción. Las mediciones cualitativas tienen lugar comprobando tras un número definido previamente de ciclos de amplificación, si la concentración de las moléculas de ácido nucleico acopladas supera un determinado valor umbral. Para una cuantificación se registra esta concentración tras cada ciclo y se determina el número de los ciclos hasta alcanzar un determinado valor umbral. Este número es una medida para la concentración del ácido nucleico buscado en una muestra.

La PCR en tiempo real debe su gran aceptación a dos propiedades que sólo coinciden con poca frecuencia en el día a día de un laboratorio: es rápida y precisa. Prácticamente ningún ciclador en tiempo real necesita más de dos horas para multiplicar y cuantificar las más mínimas cantidades de ADN. Los cicladores en tiempo real funcionan también con alto rendimiento con hasta 384 reacciones de PCR al mismo tiempo, cuyos bloques de ciclador pueden equiparse con placas de microtitulación correspondientes.

Los cicladores en tiempo real se conocen en gran número. Permiten una detección de preferiblemente hasta cinco colorantes fluorescentes al mismo tiempo para aplicaciones múltiplex, presentan bloques de calentamiento preferiblemente en paquetes de cuatro para placas de microtitulación de 96 ó 384 pocillos, muestran velocidades de calentamiento/enfriamiento rápidas que hacen posible por ejemplo 30 ciclos de PCR en 30 minutos, software de cuantificación, análisis de punto de fusión y mucho más. El sistema y el procedimiento según la invención también son adecuados para laboratorios de alto rendimiento, que deben procesar muchas muestras, con lo que son posibles hasta 5000 análisis por día con robots de PCR en tiempo real automatizados correspondientes. Si no es necesaria la cuantificación en tiempo real y sólo existe interés en la PCR de punto final, entonces pueden posibilitarse hasta 30.000 muestras en apenas 3 horas mediante robots de PCR correspondientes.

Una alternativa para aumentar el grado de múltiplex es la hibridación de los productos de PCR en una matriz de ADN, que porta sondas de captación específicas sobre su superficie en puntos diferenciados espacialmente. Mediante la detección de una reacción de hibridación pueden detectarse moléculas de ADN amplificadas o caracterizarse su secuencia.

El principio de un experimento de matriz consiste en hibridar todas las muestras génicas que se encuentran sobre la matriz simultáneamente con una sonda de ácido nucleico. En este sentido es decisivo que el ADNc obtenido mediante la transcripción inversa de ARN a partir de células o tejido comprenda en el caso ideal todos los genes expresados específicamente en los mismos. La hibridación paralela de una sonda de ácido nucleico con un gran número de muestras génicas complementarias sobre una matriz de ADN conduce a un patrón de hibridación característico con una intensidad de hibridación correspondiente. En este caso se muestra la ventaja decisiva de esta tecnología con respecto a otros métodos para el estudio de la expresión génica. Mientras que los métodos convencionales se limitan al estudio de genes individuales, una matriz de ADN proporciona un perfil de expresión génica más amplio de la célula estudiada o del tejido estudiado. Resulta especialmente interesante la posibilidad que viene dada por ello de estudiar la interacción de diferentes genes. Registrar las diferencias en la expresión génica es posible gracias a la hibridación simultánea de células fetales/adultas o normales/inmortalizadas.

El elemento básico de los chips usados actualmente consiste preferiblemente en un portador de vidrio o de plástico, tal como se usan en microscopía. Sobre un portador de este tipo se colocan las sondas (preferiblemente en micropartículas) por ejemplo mediante un robot o de manera litográfica. Los procedimientos deben funcionar de manera precisa y limpia. Para cada punto se usan milmillonésimas partes de litro (normalmente 0,6 nl) de la

disolución de oligonucleótidos. Tras cada serie tiene lugar una limpieza automática de las agujas (aclarado, ultrasonidos), para no arrastrar ninguna impureza. En un extremo de los oligonucleótidos se encuentra un grupo reactivo como por ejemplo un grupo amino (NH₂). Éste se une con una reacción química de manera duradera sobre el portador o a la micropartícula. Estos puntos tienen un diámetro de preferiblemente 100 μm (0,1 mm). Debido a esta cantidad reducida y a la pequeña separación entre los puntos individuales (preferiblemente 0,3 mm) en un portador de vidrio hay sitio hasta para 30.000 puntos. Éstos sirven como puntos de anclaje posteriores para el ADN de muestra. Por último debe bloquearse la superficie no utilizada del portador. Esto tiene lugar mediante un tratamiento con una disolución de bloqueo especial, que puede estar ya contenida en el kit terminado. Con ayuda de la PCR se multiplican los genes diana específicos, se acoplan con fluorescencia, se aplican sobre los portadores y se incuban para su hibridación. Dado el caso se elimina mediante varios lavados el ADN no unido. Un escáner especial irradia los chips con luz de una longitud de onda adecuada, se excitan los colorantes fluorescentes y fluorescen. El resultado resultante de esto se evalúa a continuación; si los puntos correspondientes se iluminan el resultado es positivo.

Además de las matrices con codificación local, en las que las biomoléculas, por ejemplo, se imprimen con una disposición fija sobre portadores planos, en la matriz de perlas se utiliza un portador codificado, equipado con partículas. Las partículas con diferentes codificaciones se recubren para el enfoque múltiplex con diferentes biomoléculas. Las propias partículas se inmovilizan después distribuidas aleatoriamente sobre un portador plano. Tras la unión de moléculas de la muestra que debe analizarse a las respectivas partículas y su marcaje (marcaje de ligandos) tienen lugar la detección de la codificación, de los ligandos y además la asociación de la unión de los ligandos a las biomoléculas inmovilizadas.

La evaluación de las matrices es un proceso que requiere comparativamente mucho tiempo. En particular en el caso de mediciones cinéticas con varios puntos de medición, en una medición se generan retardos de tiempo inaceptables, porque las imágenes se registran y se procesan de una manera muy compleja. Dado que tales sistemas de prueba en la mayoría de los casos se miniaturizan para reducir los costes de material que se generan por la multiplexación, es necesaria una resolución óptica suficientemente elevada, lo que provoca grandes cantidades de datos. Una desventaja adicional de las matrices es su escasa reproducibilidad en la producción y la fluctuación asociada a ello de los valores de medición, que surgen con la utilización de matrices. En este sentido, las matrices de perlas presentan ventajas en comparación con las matrices planas, pero la evaluación es más lenta debido a la codificación de los portadores particulados, dado que deben registrarse y procesarse varias imágenes (en la mayoría de los casos 3-4) por objeto. Hay que añadir que las matrices hasta la fecha sólo pueden hacerse funcionar como ensayos de mezclado y medición con poca frecuencia, lo que significa un esfuerzo de manipulación y en el caso de matrices de ácido nucleico un peligro de contaminación. Por ello, la cuantificación de los resultados es también sólo difícilmente posible.

La invención se basaba por tanto en el objetivo de proporcionar un sistema de ensayo mejorado para análisis múltiplex, que cumpla al menos con uno de los siguientes requisitos:

- una plataforma de matriz robusta
- procedimientos de detección de mezclado y medición para biomoléculas
- un sistema de medición que puede ser de tipo múltiplex, que se atempera rápidamente
- un análisis de datos ultrarrápido adaptado al hardware del sistema de medición que permite una reducción de los datos por objeto y punto de medición, y limita el alcance del procesamiento de imágenes a un mínimo.

La invención sirve preferiblemente para resolver problemas analíticos, que requieren un registro de varios puntos de medición por serie de medición, como por ejemplo en el caso de mediciones cinéticas o procedimientos termocíclicos, o cuando debe garantizarse un elevado rendimiento de muestras como por ejemplo en el caso de la selección para la selección farmacéutica de principios activos. La invención pretende contribuir a que la operación de medición no sea la etapa que determina la velocidad, sino que el análisis pueda adaptarse de manera óptima al principio de prueba en función del problema. Si no se consigue, no podrían procesarse cinéticas rápidas en el formato múltiplex o las propias reacciones conducirían a productos no específicos, incluso cuando la reacción casi se interrumpe para la medición mediante un control termocíclico.

La invención soluciona estos requisitos proporcionando un procedimiento según las reivindicaciones 1 a 14.

El objetivo se soluciona según la invención proporcionando un procedimiento para el análisis múltiplex de varios analitos.

Según la invención, un procedimiento de este tipo comprende las siguientes etapas:

- a. Utilizar un portador, sobre el que están inmovilizadas al menos dos poblaciones de micropartículas diferentes, diferenciándose las diferentes poblaciones de micropartículas en su codificación de fluorescencia y conteniendo al menos dos de las poblaciones de micropartículas con codificación de

fluorescencia diferentes en cada caso micropartículas, que están ocupadas con una determinada población de moléculasceptoras específica, diferenciándose entre sí las poblaciones de moléculasceptoras de las al menos dos poblaciones de micropartículas con codificación de fluorescencia diferentes.

5 b. Medir la fluorescencia del portador de la etapa a) con una resolución óptica 1 antes de poner en contacto el portador con la muestra que va a analizarse,

permitiendo la resolución 1:

- una diferenciación de los singletes, dupletes, tripletes, multipletes y monocapas de micropartículas, y

10 - la determinación de la situación local de las micropartículas inmovilizadas individuales de las respectivas al menos dos poblaciones de micropartículas diferentes sobre el portador teniendo en cuenta la codificación de fluorescencia en cada caso diferente de las al menos dos poblaciones de micropartículas diferentes.

15 c. Poner en contacto el portador de la etapa a) con la muestra que va a analizarse, provocando la interacción del respectivo analito con la molécula aceptora específica para el mismo sobre la micropartícula inmovilizada correspondiente una variación de la fluorescencia, dado el caso la etapa c) también puede tener lugar antes de la etapa b).

d. Realizar al menos una medición adicional de la fluorescencia del portador durante o después de la puesta en contacto según la etapa c) con una resolución 2.

20 e. Asociar los valores de fluorescencia medidos con la resolución 2 a los singletes, dupletes, tripletes, multipletes y monocapas de micropartículas individuales identificados localmente sobre el portador según la etapa b) y asociados a una determinada población de moléculasceptoras.

f. Determinar la variación de la fluorescencia mediante la puesta en contacto según la etapa c) para cada singlete, duplete, triplete, multiplete y monocapa de micropartículas identificado localmente sobre el portador.

25 El procedimiento se basa en que poblaciones de micropartículas pueden diferenciarse rápidamente porque estas micropartículas al excitarse con luz adecuada emiten un patrón de fluorescencia específico de la población. Por medio de una medición óptica de fluorescencia puede determinarse entonces rápidamente de manera inequívoca la situación local y disposición de cada micropartícula sobre una superficie adecuada y asociarse a una determinada población de micropartículas. Se utilizan tantas poblaciones de micropartículas distinguibles entre sí en el procedimiento según la invención como analitos y controles pretendan detectarse en la muestra que va a analizarse. Cada población de micropartículas diferenciable se ocupa con moléculas de una determinada población de moléculasceptoras específicas, interaccionando específicamente cada población de moléculasceptoras específicas con un analito que va a determinarse o sirviendo como control. Cada población de micropartículas con codificación de fluorescencia diferenciable está ocupada ahora en cada caso con exactamente una población de moléculasceptoras específica. Las diferentes poblaciones de micropartículas, ocupadas en cada caso con moléculasceptoras de una determinada especificidad se inmovilizan entonces sobre un portador adecuado, sin que sea necesaria una disposición espacial dirigida de las diferentes poblaciones de micropartículas sobre el portador. Tras tener lugar la inmovilización, se realiza una primera medición de la fluorescencia del portador equipado. Esta medición sirve como referencia para mediciones posteriores en el procedimiento y permite ahora mediante la codificación de fluorescencia inequívoca de las poblaciones de micropartículas individuales la determinación espacial exacta de la situación de cada micropartícula inmovilizada individual, su disposición por ejemplo como singlete, duplete, triplete, multiplete o como monocapa de micropartículas y la asociación exacta de la partícula en cuestión con una determinada población de micropartículas ocupada con una población de moléculasceptoras específica. A continuación el portador puede ponerse en contacto con la muestra que va a analizarse. Mediante la interacción específica del analito con su molécula aceptora sobre la superficie de la micropartícula en cuestión o con un determinado ligando para esta molécula aceptora se produce una variación de la fluorescencia. Esta variación de la fluorescencia se mide en una medición o en una serie de mediciones sucesivas en el tiempo. Mediante una comparación localmente exacta de la medición de referencia y la(s) posterior(es) medición/mediciones de muestras puede determinarse la variación de la fluorescencia para cada micropartícula individual y asociarse inequívocamente a una determinada población de micropartículas.

Este procedimiento puede usarse por ejemplo para determinar la concentración o la afinidad de analitos en una muestra o para determinar cinéticas de reacción.

Las etapas y componentes individuales del procedimiento según la invención se describen a continuación más detalladamente.

55 Análisis múltiple

El grado de múltiplex realizado preferiblemente de los análisis usando el procedimiento según la invención asciende a 2-1000 analitos y controles diferentes por muestra, pudiendo registrarse varios parámetros de medición como por ejemplo diferentes epitopos o regiones de secuencia de nucleótidos de un analito al mismo tiempo. El grado de múltiplex preferido asciende a 2-100 analitos y controles diferentes por muestra y de manera especialmente preferible a 2-10 analitos y controles por muestra.

Analitos

Los analitos pueden ser todas las moléculas orgánicas e inorgánicas concebibles de una muestra, que pueden detectarse a través de su interacción específica con las moléculasceptoras sobre la superficie de las micropartículas inmovilizadas y de la variación de la fluorescencia provocada por ello.

Analitos preferidos son péptidos, proteínas, enzimas, lectinas, anticuerpos, antígenos, aptámeros, polisacáridos, lípidos o ácidos nucleicos. En el caso de los ácidos nucleicos se prefieren moléculas de ADN o ARN naturales y sintéticas, se prefieren especialmente ácidos nucleicos, que se generan en cada ciclo en reacciones de amplificación, como por ejemplo reacciones de PCR. Sin embargo, también pueden utilizarse análogos de ácidos nucleicos o análogos de aminoácidos no naturales así como moléculas que los contienen.

A este respecto, pueden estar marcados por ejemplo o bien los propios analitos que van a analizarse y que mediante su marcaje y su interacción específica con la molécula aceptora provocan directamente una variación de la fluorescencia o bien los analitos marcados o no marcados provocan una variación de la fluorescencia indirectamente porque los analitos, por ejemplo mediante su interacción específica con las moléculasceptoras o mediante una interacción específica con un ligando de competencia para la molécula aceptora específica, influyen en o impiden la unión de un ligando marcado correspondiente.

Formato de prueba de mezclado y medición

La realización de la prueba se simplifica porque el procedimiento según la invención transcurre preferiblemente como procedimiento de mezclado y medición. Es decir, todos los reactantes se añaden al recipiente de reacción y salvo el cierre dado el caso necesario del recipiente de reacción y de la medición y evaluación no es necesaria ninguna etapa de trabajo adicional.

Portadores

Las reacciones pueden transcurrir y detectarse sobre portadores planos o en rebajes de estos portadores. Los portadores pueden estar estructurados como portaobjetos, placa de pocillos, microplaca de prueba, capilar o tubo. El cierre de los rebajes puede tener lugar mediante tapas, láminas adheridas o también mediante recubrimiento. De manera especialmente preferible se utilizan placas NucleoLink (Nunc) para la amplificación de ácidos nucleicos, que portan un recubrimiento superficial para la inmovilización covalente de biomoléculas, presentan un fondo de recipiente suficientemente plano y transparente y son termoestables. También pueden utilizarse recubrimientos superficiales para reducir la unión no específica de moléculas de muestra o reactivos de detección. Naturalmente es posible una microestructuración de la superficie, que no perjudique el enfoque óptico.

El portador sólido puede encontrarse en cualquier forma y puede estar compuesto por diferentes materiales o materiales de trabajo, que comprenden en particular diferentes metales, vidrio y plásticos. Portadores sólidos preferidos son membranas de nailon, vidrio epoxi y vidrio de fluoruro de boro. La ventaja del uso de vidrio y plásticos puede radicar en la transparencia de los materiales, que posibilita la producción de portadores a modo de portaobjetos o microplacas para el alto rendimiento paralelo de muestras y una reducción de costes que resulta de ello. Las micromatrices pueden encontrarse en forma de un portaobjetos o de una microplaca (también denominada placa de microtitulación). En el caso de la microplaca se trata de un recipiente ahuecado (*dished*) con varios (al menos dos) rebajes. En el caso de las micromatrices a base de microplacas se trata de una microplaca con varios rebajes, en cuyos fondos está situado un biochip de micromatriz. Un ejemplo de la microplaca es una placa de microtitulación de ELISA con 96 rebajes ampliamente conocida.

Además son igualmente adecuados para la implementación de la presente invención portadores sólidos basados en sistemas de capas de disposición autónoma. La aplicación puede tener lugar usando procedimientos automáticos.

Los portadores pueden estar compuestos por policarbonato, poliestireno, (plásticos adicionales), vidrio, metal, cerámica.

Micropartículas con codificación de fluorescencia

La disponibilidad de aditivos reactivos o no reactivos de plásticos líquidos, por ejemplo termoplásticos, elastómeros, durómeros, puede controlarse de manera eficaz mediante revestimiento o inclusión en polímeros de cadena lineal o formadores de red. Tales micromateriales compuestos a base de polímeros se conocen en forma de microcápsulas con una estructura de núcleo-envuelta o de partículas de matriz a escala micrométrica con una distribución en su mayor parte homogénea de los componentes a través de la sección transversal de la partícula (Ch.A.Finch, R.Bodmeier: "Microencapsulation" en Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6ª ed. 2001, publicación

electrónica). El núcleo de microcápsulas puede encontrarse en forma sólida, líquida o gaseosa (esferas huecas). En el caso de las partículas de matriz se conocen sistemas de fase homogénea y heterogénea. Según la invención se tienen en cuenta todas las micropartículas que posibilitan una inmovilización. Los corpúsculos de partícula están compuestos preferiblemente por un material polimérico. Se prefieren los siguientes materiales poliméricos, que comprenden, pero no se limitan a: poliestireno, poli(ácido acrílico), poliacrilonitrilo, poliamida, poli(acrilamida, poliacroleína, polibutadieno, policaprolactona, policarbonato, poliéster, polietileno, poli(tereftalato de etileno), polidimetilsiloxano, poliisopreno, poliuretano, poli(acetato de vinilo), poli(cloruro de vinilo), polivinilpiridina, poli(cloruro de vinilbencilo), poliviniltolueno, poli(cloruro de vinilideno), polidivinilbenceno, poli(metacrilato de metilo), polilactida, poliglicolida, poli(lactida-co-glicolida), polianhídrido, poliortoéster, polisulfona o combinaciones de los mismos. Otros materiales poliméricos, tales como por ejemplo hidratos de carbono, tales como carboximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, agar, gel, un polímero de tipo proteico, polipéptidos, células eucariotas y procariotas, lípidos, metal, resinas, látex, caucho, silicona, tal como por ejemplo polidimetildifenilsiloxano, vidrio, melamina, cerámica, carbón vegetal, caolinita, bentonita y similares pueden usarse de la misma manera. A estos polímeros pueden incorporarse también un imán o un óxido metálico que responde magnéticamente seleccionado del grupo compuesto por óxido metálico superparamagnético, paramagnético o ferromagnético. Las partículas pueden contener grupos funcionales adicionales en la superficie, tales como por ejemplo carboxilatos, ésteres, alcoholes, carbamidas, aldehídos, aminas, óxidos de azufre, grupos mercapto, óxidos de nitrógeno o halogenuros, que pueden facilitar una unión de reactantes analíticos y/o una unión de corpúsculos a corpúsculos.

Se han descrito en gran número procedimientos para la producción de micropartículas por medio de procesos de formación de partículas reactivos y no reactivos. En la formación de partículas reactiva tiene lugar la formación de la pared o de la matriz en paralelo a un proceso de polimerización, policondensación o poliadición. En los procedimientos no reactivos se utilizan directamente polímeros formadores de película, que se llevan de manera termodinámica a la separación de fases y a la formación de partículas. En procedimientos para la encapsulación de materiales de núcleo sólidos o líquidos se utilizan por ejemplo resinas de melamina-formaldehído. En particular pueden utilizarse de manera variada y sin problemas resinas de melamina-formaldehído, y pueden aplicarse para la formación de partículas a partir de la fase acuosa. El tamaño de microcápsula puede ajustarse en función de las condiciones de reacción, por ejemplo adición de emulsionante o método de dispersión, y para el uso según la invención se encuentra entre 0,5 y 30 μm . Una posibilidad adicional es la reticulación hidrotérmica de hidroximetil-melamina.

El experto conoce micropartículas con codificación de fluorescencia y se describen por ejemplo en los documentos DE 699 07 630 T2 y DE 10054382.0. Los colorantes, cuando se usa más de un colorante para teñir más de una población de partículas, se seleccionan de tal manera que presentan espectros de emisión esencialmente diferentes, preferiblemente con máximos de emisión que están separados por más de 10 nm, más preferiblemente con máximos de emisión que están separados por más de 25 nm, que están separados aún más preferiblemente por más de 50 nm. Los colorantes pueden seleccionarse para presentar bandas de emisión que son apropiadas para filtros que pueden obtenerse en el mercado, o para detectar fluoróforos múltiples con diferentes bandas de excitación y emisión.

Insertar aquí una lista de las clases de colorantes de fluorescencia.

Colorantes fluorescentes, que sirven para el marcaje de las micropartículas, son todas las sustancias que pueden emitir señales de luminiscencia detectables. Sin embargo, también pueden utilizarse colorantes que emiten radiación de rayos X o presentan fosforescencia. Colorantes fluorescentes en el sentido de la invención son todos los compuestos inorgánicos y/u orgánicos gaseosos, líquidos o sólidos, que se caracterizan porque tras la excitación vuelven a emitir la energía absorbida en forma de radiación de una longitud de onda igual, más larga o más corta. Es decir, también pueden usarse pigmentos inorgánicos u orgánicos con capacidad luminiscente o "puntos cuánticos" (*quantum dots*) como colorantes fluorescentes en el sentido de la invención. Sin embargo, también puede estar previsto que las micropartículas tengan una constitución tal que presenten fluorescencia propia, o tanto fluorescencia propia como un marcaje fluorescente no propio. Una fluorescencia propia de las micropartículas puede generarse por ejemplo porque las micropartículas contienen el mineral fluorita. Como colorantes fluorescentes no propios pueden utilizarse por ejemplo: cloruro de dansilo, isotiocianato de fluoresceína, 7-cloro-4-nitrobenzoxadiazol, anhídrido del ácido pirenbutirilacético, N-yodoacetil-N'-(ácido 5-sulfónico-1-naftil)-etilendiamina, 8-sulfonato de 1-anilino-naftaleno, 6-sulfonato de 2-toluidino-naftaleno, 7-(p-metoxibencilamino)4-nitro-benz-2-oxa-1,3-diazol, formicina, 2-aminopurinorribonucleósido, etenoadenosina, benzoadenosina, ácido α - y β -parinárico y/o ácido $\Delta 9,11,13,15$ -octadecatetraenoico, cristales de selenito de cadmio de un solo tamaño o de tamaños diferentes, y otros. Como colorantes fluorescentes pueden utilizarse igualmente por ejemplo complejos de metales de transición, que contienen las siguientes sustancias: rutenio (II), renio (I) u osmio e iridio como átomo central y ligandos de diimina; porfirinas fosforescentes con platino, paladio, lutecio o estaño como átomo central; complejos fosforescentes de las tierras raras tales como europio, disprosio o terbio; cristales fosforescentes tales como rubí, Cr-YAG, alejandrita u óxidos mixtos fosforescentes tales como fluorogermanato de magnesio o cristales de selenito de cadmio, fluoresceína, aminofluoresceína, aminometilcumarina, rodamina, rodamina 6G, rodamina B, tetrametilrodamina, bromuro de etidio y/o naranja de acridina.

Como colorantes fluorescentes pueden utilizarse por ejemplo las siguientes sustancias en combinación:

- (tris-4,7-difenil-1,10-fenantrolina)rutenio (II)/HPTS
- (tris-4,7-difenil-1,10-fenantrolina)rutenio (II)/fluoresceína
- (tris-4,7-difenil-1,10-fenantrolina)rutenio (II)/rodamina B
- (tris-4,7-difenil-1,10-fenantrolina)rutenio (II)/rodamina B-éster octadecílico
- 5 (tris-4,7-difenil-1,10-fenantrolina)rutenio (II)/hexadecilo-naranja de acridina
- (tris-teonil-trifluorometilacetato)europio (III)/hidroximetilcumarina
- tetrafenilporfirina platino (II)/rodamina B-éster octadecílico
- tetrafenilporfirina platino (II)/rodamina B
- tetrafenilporfirina platino (II)/naftofluoresceína
- 10 tetrafenilporfirina platino (II)/sulforrodamina 101
- octaetilporfirina platino (II)/eosina
- octaetilporfirina platino (II)/tionina
- octaetilcetoporfirina platino (II)/azul Nilo
- Cr(III)-YAG/azul Nilo y
- 15 Cr(III)-YAG/naftofluoresceína
- aminocumarina/aminofluoresceína
- aminocumarina/rodamina 6G
- aminocumarina/tetrametilrodamina
- aminocumarina/naranja de acridina
- 20 aminofluoresceína/rodamina 6G
- aminocumarina/azul Nilo
- aminofluoresceína/tetrametilrodamina
- aminofluoresceína/bromuro de etidio y
- DAPI/rodamina.
- 25 Sin embargo, también pueden utilizarse combinaciones con 3 colorantes para la codificación de las partículas, como por ejemplo:
- aminocumarina, rodamina, azul Nilo o
- aminocumarina, fluoresceína, rodamina. Son posibles combinaciones adicionales.
- 30 Como fluorescencia superficial puede denominarse o bien la fluorescencia de la capa más externa de las micropartículas o bien, cuando las moléculasceptoras están marcadas con fluorescencia sobre la propia superficie de la partícula, la fluorescencia de estas moléculasceptoras.
- Como fluorescencia de ligando se denomina la fluorescencia que o bien procede de analitos marcados con un colorante correspondiente o bien, cuando se utiliza un ligando de competencia marcado correspondientemente, la fluorescencia de este ligando marcado o bien cuando una molécula de detección fluorescente se une a los ligandos
- 35 unidos a las moléculasceptoras.
- En una variante preferida se introducen mediante polimerización para la codificación de partículas uno o varios colorantes de las clases de las cumarinas, rodaminas o derivados de azul Nilo en las partículas y un derivado de fluoresceína como fluorescencia superficial o para el marcaje de ligandos.
- 40 Si se codifica con cumarina, fluoresceína y rodamina, pueden utilizarse preferiblemente Cy5 y colorantes fluorescentes con una longitud de onda de emisión mayor para la fluorescencia superficial o para la fluorescencia de ligando. Sin embargo, también es posible implementar la fluorescencia superficial o fluorescencia de ligando a través

de un par de FRET, como por ejemplo fluoresceína y rodamina. Entonces están disponibles para la codificación colorantes de cumarina y cian, etc. Las posibilidades de codificación aumentan enormemente porque un mismo colorante puede utilizarse en varias capas de las micropartículas a diferentes concentraciones. De este modo resulta para cada capa y entre diferentes capas un gran número de posibilidades de formación de razones, que pueden aprovecharse para la decodificación de las poblaciones de partículas.

Una posibilidad adicional para la formación de estructura dentro de micropartículas consiste en la introducción mediante polimerización por capas de micropartículas fluorescentes o con codificación de fluorescencia adicionales. De este modo pueden generarse de manera dirigida en las micropartículas patrones, como por ejemplo de grano grueso o fino, o el número de los gránulos por capa, que pueden aprovecharse para la codificación de numerosas poblaciones de micropartículas.

Según la invención se utilizan preferiblemente micropartículas de melamina, sílice, polisulfona y poliéter, polimetacrilato, muy preferiblemente de polimetacrilato. Por regla general tienen un diámetro de 0,5 - 60 μm . El tamaño de partícula preferido asciende a 5-15 μm . A este respecto, la forma de las partículas puede ser esférica, elíptica, cilíndrica, irregular o cuboidal.

Las micropartículas usadas preferiblemente se caracterizan porque están compuestas preferiblemente por 2 capas y un núcleo, que se diferencian desde el punto de vista de la fluorescencia óptica y siendo al menos la capa externa resistente a la temperatura y estando compuesta por ejemplo por melamina. La capa central e interna están compuestas preferiblemente también por un polímero resistente a la temperatura, siempre que las pruebas utilizadas transcurran a temperaturas más elevadas. Las partículas pueden contener en una o varias capas partículas magnéticas, con cuya ayuda se garantiza una inmovilización segura de las partículas durante la medición.

Las diferentes capas pueden contener uno o varios colorantes fluorescentes, que se aprovechan para la codificación, así como colorantes fluorescentes, que se acoplaron directamente o facilitado a través de biomoléculas a la superficie de la partícula. Los colorantes fluorescentes, que se unieron a través de biomoléculas a la superficie, pueden tener por consiguiente la función de codificación así como la función de indicación de la cinética de unión o de reacción.

Alternativamente a las partículas con codificación de fluorescencia pueden utilizarse también células en forma de suspensiones, monocapa o cortes histológicos, pudiendo diferenciarse entre sí diferentes poblaciones celulares a través de su estructura fina o dado el caso a través de su codificación de fluorescencia.

Los polímeros en la superficie de la partícula pueden encontrarse en forma no modificada o en forma modificada. Posibles funcionalizaciones son grupos carboxilo, sulfhidrilo, epoxilo, amino, hidroxilo, ácido sulfónico, pegiilo, acrílico, fosfato.

Inmovilización de micropartículas

Preferiblemente se usa un dispositivo, que como puntos de medición contiene micropartículas con codificación de fluorescencia que portan las moléculasceptoras y están inmovilizadas por gravedad, fuerzas magnéticas o mecánicas, por la unión química o física al fondo del recipiente de manera permanente o durante la duración de la operación de medición. A este respecto, las micropartículas pueden acoplarse directamente al portador o facilitado a través de moléculas ligadoras. Como moléculas ligadoras actúan también las moléculasceptoras inmovilizadas que representan preferiblemente biomoléculas. Las partículas inmovilizadas de las diferentes poblaciones de partículas se distribuyen aleatoriamente por todo el área prevista del portador y pueden encontrarse como singletes, dupletes, tripletes, múltipletes, como disposiciones complejas e incluso como monocapa. La función más importante de la inmovilización de partículas es la ventaja de que sólo es necesario que la decodificación de las fluorescencias de partícula tenga lugar una vez y después sólo tiene que registrarse la fluorescencia superficial o de ligando para el registro de puntos de medición adicionales. Si las partículas no se inmovilizan de manera permanente, el registro de las fluorescencias de partícula también debe tener lugar durante el registro de los puntos de medición adicionales.

Las partículas no tienen que inmovilizarse de manera firme en una superficie sólida, sino retenerse de manera estable en un plano de enfoque, lo que también puede garantizarse mediante un gradiente de densidad. En caso de usar partículas de densidades diferentes, puede conseguirse por consiguiente una codificación adicional de poblaciones de partículas. Pueden utilizarse por ejemplo diferentes densidades mediante el uso de polímeros diferentes en la producción de partículas y capas de partículas. La creación del gradiente se garantiza por ejemplo mediante el pipeteo simultáneo de muestra y gradientes de densidad, pudiendo la dilución de la muestra ser igual o variar a lo largo del gradiente. En caso de variación de la dilución de la muestra es posible realizar en una mezcla básica de reacción por ejemplo una titulación del analito. El gradiente de densidad puede encontrarse como gradiente homogéneo o como gradiente escalonado. Las partículas pueden sedimentarse por gravedad en el límite de fase deseado. Si se trata de un gradiente de carga que se obtiene preferiblemente mediante anfolitos, las partículas también pueden migrar de manera correspondiente a su carga a través de un campo aplicado a su punto isoelectrico. Mediante la combinación de gradientes de carga y de densidad homogéneos pueden crearse múltiples capas de perlas en el recipiente de reacción.

Resulta ventajoso que los límites de fase entre diferentes densidades, en el caso de fondos no planos del entorno de

reacción (los fondos de las microplacas de prueba nunca son por ejemplo idealmente planos) también consigan a pesar de ello un plano de enfoque plano. De este modo se ahorra esfuerzo de enfoque y por consiguiente tiempo. También es posible encerrar las partículas con la disolución de reacción entre un líquido apolar menos denso y uno apolar más denso, para limitar de este modo el espacio de reacción. De este modo también es posible minimizar la fluorescencia de fondo. Las fluorescencias de fondo también pueden minimizarse añadiendo a la disolución de reacción por ejemplo un colorante extintor o nanopartículas que absorben luz, que no perjudican la reacción pero aumentan el contraste y por consiguiente la sensibilidad. Preferiblemente se añaden aquellas sustancias para aumentar el contraste, que corresponden a la luz de la longitud de onda de excitación y/o de la longitud de onda de emisión de la o de las fluorescencias de ligando.

10 Moléculas aceptoras

Como moléculas aceptoras, que son preferiblemente biomoléculas, se utilizan aquellas sustancias, que se unen específicamente a los analitos de la muestra o de la muestra de referencia con alta sensibilidad y especificidad, o que compiten con el analito por la unión a un análogo. La molécula aceptora y el análogo o ligando pueden portar un marcaje de fluorescencia y/o un extintor (*quencher*). Las biomoléculas inmovilizadas pueden ser péptidos o proteínas y en este caso preferiblemente anticuerpos, antígenos, enzimas, lectinas, aptámeros. Sin embargo, también pueden ser polisacáridos, lípidos o ácidos nucleicos. En el caso de ácidos nucleicos se utilizan en la mayoría de los casos oligonucleótidos de ADN o ARN sintéticos. Sin embargo, también pueden emplearse análogos de ácido nucleico no naturales.

20 El acoplamiento de las moléculas aceptoras a las micropartículas tiene lugar de manera covalente y/o de manera no covalente.

Variación de la fluorescencia

Las reacciones necesarias para la detección son interacciones intermoleculares, que transcurren en la superficie límite entre la fase sólida de la superficie de la partícula y la fase líquida de la disolución de reacción. A este respecto, en función del principio de prueba se provoca una variación de la fluorescencia de la fluorescencia superficial o de ligando que se hace perceptible mediante un aumento o disminución de la intensidad, polarización, duración de la fluorescencia superficial o de ligando en la superficie de la partícula y en la evolución temporal se registra con al menos dos puntos de medición. Una reducción de la intensidad de la fluorescencia puede producirse al degradarse, tal como ya se expuso anteriormente, biomoléculas marcadas con fluorescencia inmovilizadas sobre la superficie de la partícula en la reacción.

30 Alternativamente puede producirse un aumento de la señal de fluorescencia, cuando un extintor se desplaza mediante la reacción fuera de la proximidad espacial hacia el fluoróforo extinguido, empezando el fluoróforo a fluorescer como por ejemplo en el caso de balizas moleculares, Scorpions, cebadores Amplifluor. La extinción del fluoróforo también puede neutralizarse durante la reacción mediante la degradación de una sonda TaqMan inmovilizada, permaneciendo y fluoresciendo el fluoróforo tras la degradación de la sonda en la superficie de la partícula. Igualmente es posible que se generen pares de FRET mediante la unión espacialmente adyacente de sondas marcadas con moléculas de colorante fluorescente a las moléculas de analito, que a su vez se inmovilizaron durante la reacción sobre la superficie de las partículas por ejemplo mediante PCR. También está previsto que un aumento de las señales de fluorescencia de la fluorescencia de ligando sobre la superficie de la partícula pueda generarse porque se unan moléculas de detección marcadas con fluorescencia como por ejemplo anticuerpos específicos anti-grupos fosfato. Mediante esta unión a péptidos fosforilados durante la reacción e inmovilizados sobre la superficie de la partícula se aumenta de manera medible la concentración de grupos fluorescentes, sin que sean necesarios la extinción y sistemas FRET.

La variación de la fluorescencia que va a medirse puede preferiblemente:

- consistir en una disminución de la fluorescencia superficial, por ejemplo mediante degradación.
- 45 - consistir en un aumento de la fluorescencia superficial, por ejemplo mediante el desplazamiento de un ligando de competición marcado con un extintor de la molécula aceptora marcada con un colorante correspondiente mediante uno o varios analitos.
- consistir en una disminución de la fluorescencia de ligando, por ejemplo mediante la unión específica de un analito marcado con un colorante correspondiente a un aceptor marcado con un extintor sobre la superficie de la partícula.
- 50 - consistir en un aumento de la fluorescencia de ligando, por ejemplo mediante la unión específica de un analito marcado con un colorante correspondiente a una molécula aceptora correspondiente sobre la superficie de la micropartícula.
- consistir en una variación de la fluorescencia total, por ejemplo mediante la acción conjunta de un par de FRET entre molécula aceptora y analito.
- 55

Ejemplos de reacción son PCR, PCR en fase sólida, amplificaciones de ácido nucleico isotérmicas tales como “amplificación por desplazamiento de hebra” o “reacción en cadena de la ligasa” u otras reacciones enzimáticas, uniones de anticuerpos a antígenos.

Sistema de medición

- 5 Los aparatos para la realización y medición según la invención de variaciones de fluorescencia en la matriz de perlas de los más diversos formatos de prueba, que pueden controlarse de manera completamente automática por medio de un ordenador, comprenden:
- un control completamente automático por medio de un ordenador,
 - 10 - un termociclador para la atemperación rápida de las muestras, con una velocidad de calentamiento/enfriamiento de 3-20°C por segundo, que presenta una zona de reacción con varios alojamientos que pueden atemperarse para portadores según la reivindicación 1, etapa a),
 - un dispositivo de posicionamiento para el termociclador y el entorno de reacción que puede controlarse de manera termocíclica,
 - 15 - un dispositivo de iluminación asociado a la zona de reacción con el que puede irradiarse luz de excitación de longitudes de onda definidas diferentes,
 - un dispositivo óptico que es adecuado preferiblemente para detección de fluorescencia directa e inversa con filtros ópticos correspondientes,
 - uno o varios dispositivos de detección (por ejemplo CCD, CMOS), que generan imágenes en función de una intensidad de fluorescencia medida, y
 - 20 - una unidad de evaluación, que genera valores de medición a partir de las imágenes.

Para la utilización de micropartículas los aparatos pueden comprender adicionalmente dispositivos de inmovilización para por ejemplo partículas magnéticas o paramagnéticas.

25 Mediante el uso de fondos de recipiente y/o tapas de recipiente ópticamente transparentes con una fluorescencia propia reducida, que posibilitan la evaluación desde el punto de vista de la fluorescencia óptica durante la realización termocíclica o isotérmica de la reacción de detección, son posibles mediciones con fluorescencia de luz transmitida y luz reflejada. En el caso de fluorescencia de luz reflejada pueden utilizarse placas de microtitulación habituales en el comercio, tales como por ejemplo NucleoLink o NucleoSorb. Los recipientes de reacción habituales en el comercio usados pueden recubrirse para reducir la fluorescencia propia.

30 Dado que en caso de utilizar micropartículas no inmovilizadas de manera permanente todas las fluorescencias de partícula deben medirse durante el registro de puntos de medición adicionales, se plantean requisitos especialmente elevados a la velocidad del hardware, tales como por ejemplo el uso de una resolución lo más reducida posible de los objetivos a una potencia luminosa elevada, el uso de filtros de múltiples bandas para evitar cambios de filtro en combinación con una iluminación con LED de múltiples colores, el uso de una cámara con amplificación de electrones, programación paralela de las unidades de detección. Las unidades de detección pueden estar
35 dispuestas en el sentido de una programación paralela preferiblemente en filas de 8 o agruparse mediante conductores de fibra de vidrio o líquidos en una cámara. Igualmente es posible medir mediante objetivos gran angulares varios pocillos al mismo tiempo. Mediante el agrupamiento de píxeles puede reducirse igualmente el tiempo de medición, dado que aumenta la sensibilidad, lo que acorta la exposición, y se reduce la cantidad de datos.

Registro de puntos de medición

40 La invención prevé que antes o al inicio de la reacción se registre un primer punto de medición y en el transcurso o al menos tras la finalización de la reacción un punto de medición adicional, para poder calcular con cuánta intensidad transcurrió la reacción para el analito individual o en qué concentración se encontraba el analito en la muestra.

45 El registro del primer punto de medición es necesario para identificar todas las micropartículas que se tienen en cuenta para la evaluación, registrando las fluorescencias de codificación para poder asociar todas las partículas a una población de partículas. Además se almacena la posición x/y necesaria para la evaluación de un número necesario de partículas identificadas por población, para recuperar los lugares de medición para el registro de la fluorescencia superficial o de ligando durante el registro de puntos de medición adicionales. Por lo demás, la fluorescencia superficial o de ligando se registra como referencia para la señal superficial o de ligando registrada en
50 los siguientes puntos de medición y dado el caso también se utiliza para la decodificación de la población de partículas. Los registros de las fluorescencias tienen lugar con la resolución óptica 1, que por regla general es mayor que la resolución 2, para registrar de manera segura las unidades que pueden evaluarse, preferiblemente partículas inmovilizadas individualmente, pero dado el caso también dupletes, tripletes o monocapas de partículas. Esto puede conseguirse preferiblemente porque mediante el registro de imágenes en varios planos Z y el cálculo posterior de

una imagen nítida total (algoritmos de profundidad de campo aumentada “*extended-depth-of-field*”), a partir de dupletes y aglomerados superiores puede determinarse de manera segura el límite de perla individual y con ello conseguirse una individualización.

5 Alternativamente, los aglomerados reconocidos se subdividen mediante su superficie y propiedades morfológicas en grupos individuales. Para cada grupo se usa una variante de algoritmo especial para calcular la fluorescencia. A través de la determinación de los puntos de contacto entre perlas pueden individualizarse digitalmente las perlas.

10 Alternativamente, a través de extrapolación de perlas mediante el uso de un conocimiento previo (una perla es por ejemplo una esfera), pueden completarse las estructura anulares en la imagen que están superpuestas con otras perlas. De este modo pueden evaluarse disposiciones de múltiples capas de perlas. Un algoritmo de la bibliografía es la transformación de círculos de Hough. Siempre se evalúa la superficie visible de una perla.

Alternativamente, mediante eliminación digital de poblaciones de perlas individuales de los datos de imagen, de los aglomerados de perlas se extraen perlas individuales. Estas alternativas pueden emplearse individualmente o en combinación, con lo que están disponibles más partículas evaluables por toma de imagen, lo que a su vez ahorra tiempo durante el análisis.

15 El registro de todos los demás puntos de medición tiene lugar con resolución 2 y se limita preferiblemente sólo al registro de la fluorescencia superficial o de ligando. En una variante de realización adicional es posible registrar también fluorescencias de partícula para documentar al menos para algunos puntos de medición la recuperación exacta de las partículas. Si se irradia una fluorescencia de la fluorescencia de partícula de manera reducida pero detectable de manera segura en el canal de emisión de la fluorescencia superficial, esto reduce la sensibilidad, pero
20 la partícula puede recuperarse. Es igualmente posible utilizar dos fluorescencias superficiales, no experimentando una fluorescencia ninguna variación de la fluorescencia durante la reacción, de modo que puede excluirse un desplazamiento de partículas debido por ejemplo a efectos térmicos. Las resoluciones usadas deben adaptarse de manera óptima a la densidad de partículas y el número de píxeles por partícula (1-1000 píxeles), para garantizar la seguridad necesaria para cada respectiva aplicación en la identificación y la recuperación de las partículas.

25 El registro de los puntos de medición adicionales puede tener lugar en intervalos de tiempo regulares antes, durante y después de la reacción o si no después de haber alcanzado mediante la atemperación una determinada temperatura o un determinado fragmento de un ciclo térmico. Preferiblemente, las mediciones tienen lugar durante un fragmento isotérmico de la reacción, para minimizar las influencias que se producen por fluctuaciones de temperatura, tales como una dilatación de material y convección potenciada, en la mezcla de reacción.

30 Puede ser ventajoso registrar de vez en cuando además del registro de la fluorescencia superficial o de ligando también una fluorescencia de partícula, dado que en caso de una fluorescencia superficial decreciente existe el riesgo de que no pueda recuperarse correctamente una partícula. Para minimizar el blanqueamiento, puede realizarse preferiblemente durante el uso de LED, en particular durante el registro de puntos de medición adicionales, una adaptación de la intensidad de iluminación sobre la fluorescencia superficial. Dado el caso debe establecerse una referencia para la intensidad de iluminación variada. La reducción del blanqueamiento mediante la limitación de la iluminación al tiempo de la toma de imagen. Además, mediante la reducción del aumento del objetivo
35 puede representarse una superficie de medición mayor, con lo que son necesarias menos imágenes por pocillo.

40 El hecho de evitar un enfoque posterior y una iluminación posterior mediante algoritmos tales como “profundidad de campo aumentada” (aumento de la profundidad de campo mediante la suma de varias imágenes en Z) y “alto rango dinámico” (*high-dynamic-range*) (aumento de la dinámica de iluminación mediante la suma de una imagen muy clara y una muy oscura) acortan igualmente el tiempo de medición.

Por punto de medición se registran 1-1000 partículas de una población, registrándose preferiblemente 1-100 partículas y en la variante de realización especialmente preferida 1-10 partículas.

Análisis

45 Asociación de los puntos de medición a partículas y poblaciones de partículas

Preferiblemente se utilizan para la decodificación de las poblaciones de partículas las fluorescencias de los colorantes introducidos mediante polimerización en total en las partículas o en las diferentes capas. A partir de las diferentes intensidades de la fluorescencia, por ejemplo, se calculan relaciones (razones), que permiten una identificación inequívoca para cada población de partículas.

50 Así puede determinarse la fluorescencia en forma de la determinación de la intensidad de la fluorescencia de una determinada longitud de onda de emisión, que puede reconocerse en la periferia de la partícula como fluorescencia anular, antes del inicio de una reacción de nucleasa para determinar la población de partículas pero también para determinar la señal máxima de la fluorescencia superficial de la partícula en cuestión antes de la reacción. En el transcurso de la reacción esta señal máxima disminuye, dado que las biomoléculas se degradan enzimáticamente y
55 por consiguiente el colorante se libera de la superficie de la partícula. Entonces el colorante ya no está disponible para la decodificación de las poblaciones de partículas. Dado que se inmovilizó la partícula, ya no es necesario

tampoco que tenga lugar la decodificación. Para controlar que se recupere correctamente la partícula sin decodificación, en este caso las fluorescencias de los propios colorantes introducidos mediante polimerización en las partículas son suficientes. Puede recurrirse igualmente a fluorescencia de codificación, superficial y/o de ligando para establecer referencias para partículas de tamaños diferentes con respecto a intensidades detectadas de la fluorescencia.

5

Cálculo de cinéticas

Mediante el análisis de la variación de la fluorescencia como consecuencia de la reacción de punto de medición a punto de medición resultan cinéticas de reacción a partir de las que pueden calcularse las concentraciones de los analitos o también constantes de unión. Si la evaluación tiene lugar con respecto a un ciclo de reacción tal como en la reacción en cadena de la polimerasa, el dato del ciclo de superación, en el que la señal o la variación de señal supera el fondo es decisivo como medida de la cantidad formada de producto de reacción. De esta manera es posible una cuantificación mucho más precisa de los productos de PCR en una muestra que mediante la determinación de la intensidad de la fluorescencia.

10

Mediante el establecimiento de una referencia de todos los puntos de medición adicionales con respecto al punto de medición 1 o uno de los puntos de medición posteriores al mismo antes de o al inicio de la reacción se reducen claramente los errores de medición, dado que el posible establecimiento de una referencia con respecto a una población de partículas como control positivo o con respecto a una muestra de referencia puede minimizar influencias tales como una iluminación o tamaño de partícula diferentes.

15

El procedimiento prevé igualmente que la influencia de magnitudes perturbadoras debe registrarse sistemáticamente para poder tenerlas en cuenta en el cálculo de los valores de medición. Tales magnitudes perturbadoras pueden ser la decoloración (blanqueamiento/desvanecimiento) de algunos colorantes fluorescentes así como influencias de fluctuaciones de temperatura sobre la medición o la fluorescencia de fondo no específica.

20

Kit

También se da a conocer un kit para su uso en un procedimiento según la invención, conteniendo el kit reactivos formulados previamente que comprenden al menos una población de micropartículas recubiertas con moléculas aceptoras.

25

Con el sistema según la invención puede proporcionarse un kit de PCR en tiempo real listo para usar, que contiene todos los componentes necesarios. Con ello ya no es necesario pipetear individualmente tampones, una mezcla de nucleótidos, moléculas indicadoras, polimerasas, transcriptasas inversas y cebadores así como dado el caso agentes antiblanqueamiento. Para la cuantificación, en este procedimiento (clásico) de PCR en tiempo real se aprovecha la determinación del punto de fusión del ADN amplificado y el análisis del valor umbral de la intensidad de la fluorescencia (CT).

30

El procedimiento según la invención puede usarse para:

- una amplificación múltiple cualitativa y cuantitativa de ácido nucleico,
- una selección de secuencias de ácido nucleico,
- una inmunodetección para determinar la concentración de antígenos y anticuerpos o constantes de unión correspondientes y para determinar actividades enzimáticas así como interacciones intermoleculares entre proteínas, proteínas y sustancias de bajo peso molecular, proteínas y ácidos nucleicos, hidratos de carbono, lípidos.

35

La presente invención se refiere también a:

40

- Un procedimiento según la invención, caracterizado porque el portador es termoestable.
- Un procedimiento según la invención, caracterizado porque el portador es transparente.
- Un procedimiento según la invención, caracterizado porque las zonas planas del portador están recubiertas para mejorar la inmovilización de las micropartículas o reducir reacciones de fondo no específicas.

45

- Un procedimiento según la invención, caracterizado porque las capas de las micropartículas contienen micro o nanopartículas fluorescentes, con codificación de fluorescencia o magnéticas adicionales.

- Un procedimiento según la invención, caracterizado porque como colorantes fluorescentes se emplean preferiblemente cumarinas, fluoresceínas, rodaminas, cianinas.

- Un procedimiento según la invención, caracterizado porque las micropartículas son termoestables hasta al menos 95°C.

50

- Un procedimiento según la invención, caracterizado porque las micropartículas presentan funcionalizaciones superficiales, que pueden aprovecharse para el acoplamiento covalente o no covalente de moléculas aceptoras y la inmovilización de las partículas al/en el portador.
- 5 - Un procedimiento según la invención, caracterizado porque las micropartículas están compuestas preferiblemente por poliestireno, polimetacrilato, polisulfona, poliéter, sílice o resina de melamina.
- Un procedimiento según la invención, caracterizado porque las micropartículas con codificación de fluorescencia están inmovilizadas por gravedad, fuerzas magnéticas, eléctricas o mediante una unión química o física, o la inclusión parcial en un polímero en el fondo del recipiente o en un gradiente de densidad y/o de carga de manera permanente o durante la duración de la operación de medición.
- 10 - Un procedimiento según la invención, caracterizado porque las micropartículas con codificación de fluorescencia están inmovilizadas de manera facilitada a través de moléculas ligadoras o aceptoras en el portador.
- Un procedimiento según la invención, caracterizado porque las moléculas aceptoras se unen al o a los analitos específicos de la muestra o de la muestra de referencia con una elevada sensibilidad y especificidad o porque las moléculas aceptoras compiten con el analito por la unión de un análogo.
- 15 - Un procedimiento según la invención, caracterizado porque las moléculas aceptoras pueden ser biomoléculas y preferiblemente péptidos, proteínas, anticuerpos, antígenos, enzimas, lectinas, aptámeros, polisacáridos, lípidos, glicolípidos, hormonas, ácidos nucleicos o análogos de ácido nucleico.
- Un procedimiento según la invención, caracterizado porque la interacción entre moléculas aceptoras y analitos o análogo conduce a una variación de la fluorescencia en el sentido de una reducción o un aumento de una fluorescencia.
- 20 - Un procedimiento según la invención, caracterizado porque se usa un aparato de medición, en el que el termociclador está combinado con un electroimán o un imán permanente para la inmovilización de las micropartículas.
- Un procedimiento según la invención, caracterizado porque de manera especialmente preferible se registran 1-10 píxeles por partícula preseleccionada.
- 25 - Un procedimiento según la invención, caracterizado porque al menos un píxel registra la partícula preseleccionada.
- Un procedimiento según la invención, caracterizado porque exclusivamente se tienen en cuenta como singletes, dupletes, tripletes y/o como distribuciones de orden superior incluyendo monocapas, partículas distribuidas.
- Un procedimiento según la invención, caracterizado porque los puntos de medición adicionales tienen lugar tras la puesta en contacto según la etapa c) de manera correspondiente a periodos de tiempo predefinidos o tras alcanzar temperaturas de reacción definidas.
- 30 - Un procedimiento según la invención, caracterizado porque los valores de medición registrados en la evolución de tiempo o en diferentes ciclos de reacción de los puntos de medición adicionales de una serie de medición de un mismo lugar de medición toman como referencia uno o varios valores de medición de la misma serie de medición, del mismo lugar de medición o también de otros lugares de medición.
- 35 - Un procedimiento según la invención, caracterizado porque los valores de medición se corrigen considerando evoluciones de tiempo de blanqueamiento determinadas previamente.
- El uso de un procedimiento según la invención para determinar la cinética de reacción para al menos un analito en la muestra que va a analizarse.
- 40 **Ventajas:**
- Establecimiento como referencia de sólo el punto de medición 1 y dado el caso una muestra comparativa. De este modo la medición se vuelve más exacta y pueden utilizarse o medirse menos partículas por población.
- Sólo son necesarias una determinación de lugar y decodificación únicas. De este modo puede ahorrarse tiempo y conseguirse una reducción de datos.
- 45 - La resolución 2 menor contribuye a que pueda registrarse un área grande y por tanto se detecten más partículas por operación de registro, lo que ahorra tiempo.
- Un ensayo de mezclado y medición es sencillo de manejar, de modo que resultan pocas posibilidades de error. Además es posible registrar cinéticas de reacción, con lo que se amplía la calidad del análisis.
- 50 - La reducción del número de partículas por población necesarias para la evaluación posibilita no sólo un

ahorro de material y de tiempo, sino también la medición de más poblaciones por unidad de superficie con lo que aumenta el grado de múltiplex posible.

- 5 - Mediante el uso de 2 resoluciones diferentes es posible identificar y localizar antes del inicio de la reacción mediante una resolución mayor todas las partículas evaluables, lo que requiere mucho tiempo. Para el registro de la fluorescencia superficial o de la fluorescencia de ligando de otros puntos de medición puede trabajarse con la resolución 2, dado que ya sólo se identificaron los puntos de medición con la resolución 1, que se recuperan de manera segura con la resolución 2 en el registro de puntos de medición posteriores. Dado que con la resolución 2 menor pueden registrarse más partículas en un campo de medición mayor sobre el portador, se acelera considerablemente el proceso de medición.
- 10 - Dado que al registrar puntos de medición adicionales para determinar sólo una emisión de fluorescencia de la fluorescencia superficial o de ligando no es necesario ningún cambio de filtro, se ahorra tiempo.
- En comparación con los sistemas de prueba convencionales, el dimensionamiento temporal y espacial de la detección de los diferentes parámetros provocan una gran robustez de la prueba.

15 El núcleo contiene por ejemplo 100 partes de aminocumarina y por ejemplo 100 partes de azul Nilo (100/100). La capa central contiene por ejemplo 100 partes de fluoresceína y la capa externa contiene por ejemplo 50 partes de aminocumarina y por ejemplo 100 partes de azul Nilo.

Partículas de la población de partículas 2 (mitad derecha de la figura):

20 El núcleo contiene por ejemplo 100 partes de aminocumarina y por ejemplo 100 partes de azul Nilo (100/100). La capa central contiene por ejemplo 100 partes de fluoresceína y la capa externa contiene por ejemplo 100 partes de aminocumarina y por ejemplo 100 partes de azul Nilo.

El colorante 1 en el anticuerpo anti-grupos fosfo es por ejemplo fluoresceína o rodamina.

25 Las partículas de poblaciones de micropartículas recubiertas con péptidos y la mezcla de reacción compuesta por disoluciones tampón y el anticuerpo anti-grupos fosfo se añaden a la cavidad de una microplaca de prueba. Todas las micropartículas en la mezcla básica se sedimentan o se inmovilizan mediante un imán permanente o eléctrico en el fondo del recipiente, siempre que no se hayan inmovilizado ya previamente de manera firme en el fondo de la microplaca de prueba.

30 Mediante espectroscopía de fluorescencia se registran todas las fluorescencias de las poblaciones de micropartículas en el marco del punto de medición 1 y se identifican las micropoblaciones y se determina la situación de las partículas en el recipiente de reacción. Para ello, la excitación de la aminocumarina mencionada a modo de ejemplo tiene lugar a una longitud de onda de 350 nm, para registrar la primera fluorescencia de codificación de las partículas en la capa externa y en la interna. A continuación se excita por ejemplo la fluoresceína a una longitud de onda de 480 nm y se mide a 520 nm, para determinar la segunda fluorescencia de codificación de la capa central de las partículas y la fluorescencia de ligando. Mediante la excitación posterior a 680 nm y la detección a 720 nm se excita y se detecta el azul Nilo mencionado a modo de ejemplo, para determinar la segunda fluorescencia de codificación del núcleo o de la capa externa.

El cálculo de las señales de fluorescencia detectadas con resolución local tiene lugar según las siguientes reglas:

Núcleo:

- determinación del cociente 1 de fluorescencia de aminocumarina y de azul Nilo
- determinación del diámetro de núcleo

40 Capa central:

- determinación del cociente 2 de fluorescencia de fluoresceína y fluorescencia de aminocumarina o de azul Nilo. Esto es posible, dado que las envueltas se solapan parcialmente debido a la estructura de partícula, aunque en la envuelta central sólo se introdujo mediante polimerización fluoresceína.
- determinación del grosor de capa 2

45 Capa externa:

- determinación del cociente 3 de fluorescencia de aminocumarina y de azul Nilo
- determinación del grosor de la capa 3

Según estas reglas, las micropartículas del presente ejemplo pueden diferenciarse porque el cociente 3 de ambas poblaciones de partículas se diferencia de manera medible.

Cociente 3

población de partículas 1: 0,5

población de partículas 2: 1

Todos los demás cocientes y todos los demás diámetros y grosores de capa de las partículas no se diferencian.

5 El punto de medición 1 se registra a la resolución 1 con un objetivo con un aumento de 4 veces. Los puntos de medición adicionales para determinar el desarrollo de la fluorescencia de ligando se registran igualmente a la resolución 1 usando un objetivo con un aumento de 4 veces. Para la correcta recuperación de las partículas se utilizan las coordenadas espaciales relativas de las partículas del punto de medición 1, para poder compensar imprecisiones al desplazarse múltiples veces por los campos de medición. Por tanto, también se incluyen de manera especialmente preferible como singletes partículas inmovilizadas en la evaluación, dado que éstos se identifican, decodifican y recuperan de una manera más sencilla y segura. Los efectos de blanqueamiento cuantificados previamente de los colorantes fluorescentes usados deben corregirse, antes de que se deduzcan los valores de fluorescencia de ligando a partir de los datos. El aumento así como la velocidad del aumento de la fluorescencia de ligando a través de diferentes puntos de medición son proporcionales a la actividad cinasa en la muestra (véase también el ejemplo 2).

Figura 3: Representación esquemática de un sistema de aparato (A) y un entorno de reacción (B) para la amplificación de secuencias diana y detección de los amplificadas combinadas en la matriz de micropartículas

(A) El aparato controlado por ordenador de manera completamente automática representa mediante sus parámetros de rendimiento una combinación de microscopio de fluorescencia directa y termociclador.

20 En un bastidor 6 con accionamiento z motorizado se encuentran los componentes ópticos compuestos al menos por un sistema óptico de larga distancia 5 para la detección de fluorescencia equipado con un objetivo 20X y elementos para la conducción de la radiación y para la formación de la imagen. La excitación tiene lugar a través de al menos una lámpara de xenón o al menos dos LED 3 o láseres 4 diferentes preferiblemente en las regiones del espectro de 350-400 nm; 450-500 nm; 550-600 nm. Las longitudes de onda concretas de la luz de excitación dependen de los colorantes fluorescentes usados y se ajustan de manera fina en caso necesario mediante filtros 2 apropiados. La luz emitida por los colorantes fluorescentes se separa de la luz de excitación mediante filtros de emisión 1 correspondientes y se registra mediante una cámara sensibilizada 3. La platina presenta un accionamiento x/y que presenta una exactitud de menos de 0,1 mm y aloja el termociclador con soporte para muestras (en este caso para 96 recipientes de reacción con una capacidad de 0,2 ml). Bajo los recipientes de reacción, que presentan un fondo plano, está ubicado opcionalmente un imán 11 (imán permanente o un electroimán), de modo que las micropartículas paramagnéticas se inmovilizan bien durante la operación de medición.

35 Un control por ordenador automático comprende el programa de PCR y con ello el perfil de temperatura de la reacción de PCR, los cambiadores de filtro, la cámara, la adquisición de imágenes y el procesamiento de imágenes, el accionamiento x/y/z y el control de la luz de excitación, así como la superficie de usuario, de modo que durante, por ejemplo, la reacción de PCR puede garantizarse la emisión de las fluorescencias de amplificado para las diferentes poblaciones de partículas.

Alternativamente al microscopio de fluorescencia directa, el aparato puede estar realizado también como microscopio de fluorescencia inversa.

40 (B) Como recipientes de reacción se usan por ejemplo NucleoSorb de 8 tiras 12, que se cierran con un cubreobjetos de vidrio.

(C) La mezcla maestra de PCR se pipetea junto con el ADN de muestra 16 en el recipiente de reacción y se recubre con aceite. Después se cierra opcionalmente el recipiente de reacción con un cubreobjetos y se inicia la operación de PCR/medición. Mientras transcurren los ciclos de PCR tiene lugar la medición de las fluorescencias preferiblemente en la fase de hibridación (adición del cebador) en condiciones isotérmicas. Alternativamente tiene lugar el registro de una curva de fusión al final de la PCR. Las micropartículas están inmovilizadas durante la PCR preferiblemente de manera constante mediante acoplamiento covalente, sedimentación o atracción magnética. En caso de usar electroimanes, las partículas pueden encontrarse durante la PCR inmovilizadas o flotando libremente y se inmovilizan de nuevo para cada medición.

1- Filtro de emisión

50 2- Filtro para luz de excitación

3- Cámara (CCD o CMOS)

4- LED o láser para excitación

5- Sistema óptico de larga distancia

- 6- Bastidor
- 7- Accionamiento z
- 8- Termociclador
- 9- Accionamiento x/y
- 5 10- Marcaje de corte
- 11- Imán
- 12- NucleoSorb o NucleoLink de 8 tiras
- 13- Alojamiento de recipiente de reacción en el bloque térmico
- 14- Tapa
- 10 15- Recubrimiento (por ejemplo aceite)
- 16- Mezcla maestra + ADN de muestra

Ejemplos

Ejemplo 1: Detección del patógeno virus del herpes simple 1 en una muestra

- 15 Se añade un volumen de 5 µl de frotis de ampollas labiales de ADN de muestra purificado a una mezcla maestra de 25 µl con la siguiente composición:

cebador 1 400 nM

cebador 2 300 nM

disuelto en Taq ADN polimerasa, nucleótidos, cloruro de magnesio, tampón Tris/HCl y Tween 20.

- 20 Se pipetea la mezcla básica de reacción en una cavidad de una placa Nucleolink y a continuación se pasa al termociclador del aparato de medición (véase la figura 3) y se amplifica de manera termocíclica. El principio de reacción del procedimiento se muestra esquemáticamente en la figura 1. Los cebadores 1 y 2 se unen a la secuencia diana del genoma del virus del herpes simple 1 así como al patrón interno. Mediante una ADN polimerasa se amplifican los fragmentos flanqueados por los cebadores en condiciones adecuadas. Tras la desnaturalización de la hebra doble puede hibridarse la sonda sobre la superficie de la partícula, que porta un marcaje de rodamina en el extremo 5', con las hebras complementarias del amplificado. En caso de prolongación del cebador en el siguiente ciclo de reacción, las sondas hibridadas se degradan mediante la 5'-3'-exonucleasa de la Taq polimerasa y se libera el colorante, lo que conduce a una disminución de la fluorescencia de rodamina en caso de un aumento de la cantidad de amplificado.

- 30 Las partículas están compuestas por polimetacrilato y tienen un diámetro de 10 µm. La superficie de las partículas está modificada con carboxilo y con ayuda de un acoplamiento de carbodiimida se acoplan las sondas de captación 3'-aminomodificadas y una molécula ligadora poli-T(50) 3'-aminomodificada y 5'-fosforilada a las partículas activadas de manera correspondiente a protocolos convencionales. Las partículas recubiertas con las sondas de captación y moléculas ligadoras en una relación de 1:5 se unen entonces igualmente a través de un acoplamiento de carbodiimida al fondo de una placa Nucleolink.

- 35 Partícula 1:

La partícula contiene por ejemplo 100 partes de aminocumarina y por ejemplo 20 partes de azul Nilo (100/30).

Partícula 2:

La partícula contiene por ejemplo 100 partes de aminocumarina y por ejemplo 100 partes de azul Nilo (100/100).

Partícula 3:

- 40 La partícula contiene por ejemplo 100 partes de aminocumarina y por ejemplo 0 partes de azul Nilo (100/0).

- 45 Tras haber pipeteado la mezcla maestra en los recipientes de reacción recubiertos con partículas y haberlos cerrado, se registra la fluorescencia de partícula para aminocumarina y azul Nilo usando un objetivo con un aumento de 20 veces. Se localizan e identifican las partículas de las poblaciones de partículas 1 y 2. La fluorescencia superficial de rodamina se registra preferiblemente entre el ciclo de PCR 20-30 usando un objetivo con un aumento de 4 veces a densidades de partículas reducidas y con un aumento de 10 veces a densidades de partículas

5 elevadas, hasta que se detectó claramente amplificado, es decir la fluorescencia superficial de las partículas específicas de virus del herpes simple 1 (partícula 1) y/o de partículas de patrón interno (partícula 2) ha disminuido claramente en comparación con la fluorescencia de referencia (partícula 3). Las partículas de referencia pueden aprovecharse opcionalmente para poder reconocer posibles efectos no específicos tales como actividades nucleasa no deseadas o efectos de blanqueamiento.

Secuencias

Cebador 1: 5'-CAT CAC CGA CCC GGA GAG GGA C-3' (SEQ ID No: 1)

Cebador 2: 5'-GGG CCA GGC GCT TGT TGG TGT A-3' (SEQ ID No: 2)

Sonda del virus del herpes simple 1:

10 rodamina-5'-GGACTTTGTCCTCACCGCCGAAGTATTTTTTTTTTTTTTTT-3'-partícula 1 (SEQ ID No: 3)

Sonda del patrón interno:

rodamina-5'-GACCGCTTGCTGCAACTCTCTCAGTTTTTTTTTTTTTTT-3'-partícula 2 (SEQ ID No: 4)

Sonda para partículas de referencia para excluir efectos no específicos:

rodamina-5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'-partícula 3 (SEQ ID No: 5)

15 Patrón interno:

**5'-CATCACCGAC CCGGAGAGGG ACCCAGCGTG GACCGCTTGC
TGCAACTCTC TCAGGGCCAG GCGGTGAAGG GCAATCAGCT
GTTGCCCGTC TCGCTGGTGA AAAGAAAAC CACCCTGGCG
CCCAATACGC AAACCGCCTA CACCAACAAG CGCCTGGCCC-3'
(SEQ ID No: 6)**

El grado de múltiple puede aumentarse amplificando secuencias objetivo adicionales, como por ejemplo virus del herpes simple 2, simultáneamente en la mezcla básica de reacción y detectándose en poblaciones de partículas adicionales con las sondas de captación específicas en cada caso.

20 Es posible sin problemas transferir este formato de prueba para la caracterización de enzimas tales como por ejemplo proteasas, fosfatasas, glicosidasas, que presentan la propiedad de degradar las moléculas aceptoras marcadas con fluorescencia sobre la superficie de las partículas.

Ejemplo 2: Ensayo de cinasa para la detección de diferentes especificidades de sustrato

25 Se añade un volumen de 5 µl de una muestra que contiene ERK1 a una mezcla de reacción de 25 µl con la siguiente composición:

30 ATP, cloruro de magnesio, EGTA, DTT, tampón Tris/HCl y Tween 20, dado el caso inhibidores enzimáticos, anticuerpo anti-fosfopéptido marcado con rodamina dado el caso de especificidad diferente. Alternativamente al anticuerpo anti-fosfopéptido también pueden utilizarse colorantes fluorescentes específicos de grupo fosfo. En el caso de otras modificaciones, tales como por ejemplo glicosilaciones, también pueden emplearse otros colorantes fluorescentes específicos de modificación.

35 Para someter a prueba los inhibidores de cinasa se añaden a las cavidades de una microplaca de prueba con diferentes mezclas básicas de reacción diferentes inhibidores de cinasa tales como por ejemplo estaurosporina y se registra la reacción en péptidos control y péptidos que pueden fosforilarse inmovilizados sobre partículas. En caso de usar diferentes péptidos que pueden fosforilarse, inclusive los péptidos control, es posible alternativamente comparar diferentes especificidades de sustrato en el enfoque múltiple.

Si un péptido puede fosforilarse, se une simultáneamente el anticuerpo anti-grupos fosfo marcado con rodamina y genera una fluorescencia de ligando medible.

40 Las partículas están compuestas por polimetacrilato y tienen un diámetro de 10 µm. La superficie de las partículas está modificada con carboxilo y con ayuda de un acoplamiento de carbodiimida se acoplan a las partículas activadas de manera correspondiente a protocolos convencionales. Las partículas recubiertas con péptidos y dado el caso con moléculas ligadoras en una relación de 1:5 se unen entonces igualmente a través de un acoplamiento de carbodiimida al fondo de una placa Nukleolink. Alternativamente, las partículas pueden inmovilizarse por sedimentación por gravedad o magnética.

Se usan las siguientes partículas de manera correspondiente a la figura 2:

Partícula 1:

5 El núcleo contiene por ejemplo 100 partes de aminocumarina y por ejemplo 100 partes de azul Nilo (100/100). La capa central contiene por ejemplo 100 partes de fluoresceína y la capa externa contiene por ejemplo 50 partes de aminocumarina y por ejemplo 100 partes de azul Nilo.

Partícula 2:

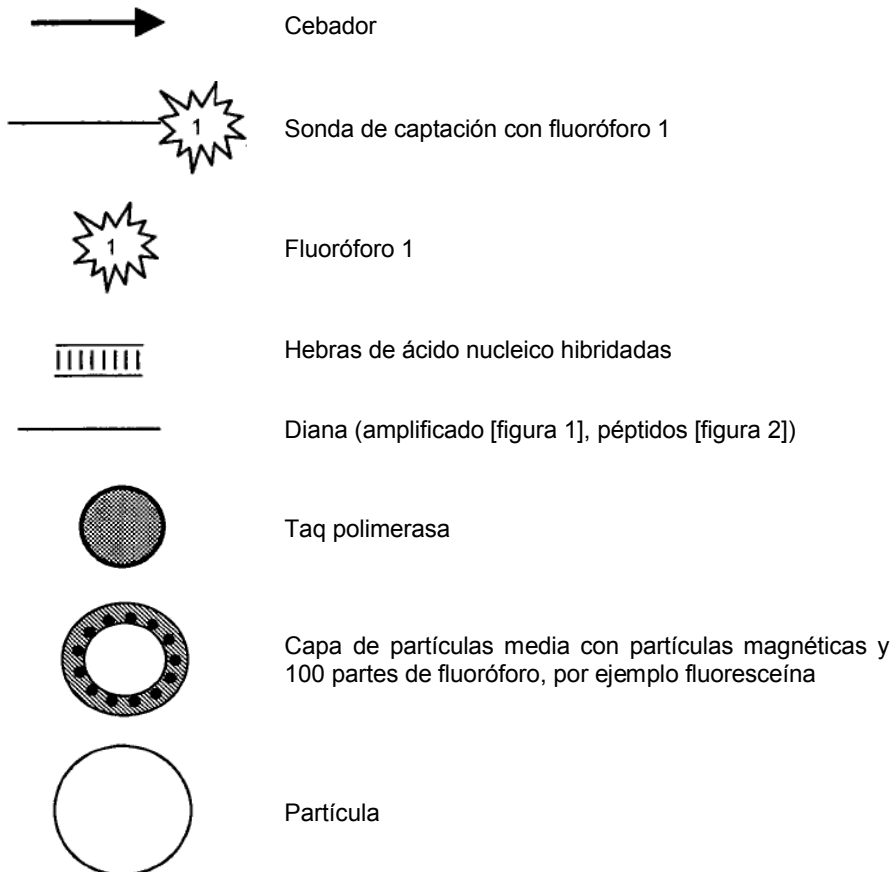
El núcleo contiene por ejemplo 100 partes de aminocumarina y por ejemplo 100 partes de azul Nilo (100/100). La capa central contiene por ejemplo 100 partes de fluoresceína y la capa externa contiene por ejemplo 100 partes de aminocumarina y por ejemplo 100 partes de azul Nilo.

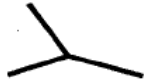
10 La partícula 1 porta un péptido que puede fosforilarse mediante ERK1 y la partícula 2 con fines de referencia un péptido similar, pero que no puede fosforilarse. En caso de usar poblaciones de micropartículas adicionales pueden integrarse péptidos que pueden fosforilarse adicionales en la prueba, lo que aumenta el grado de múltiplex del análisis.

15 Tras registrarse la fluorescencia de partícula para aminocumarina y para azul Nilo usando un objetivo con un aumento de 20 veces y localizarse e identificarse las partículas de las poblaciones de partículas 1 y 2, se pipetea la mezcla de reacción en los recipientes de reacción recubiertos con partículas y se cierran. El desarrollo de la fluorescencia de ligando de rodamina como consecuencia de la reacción de cinasa se registra en función de la velocidad de reacción en diferentes puntos de tiempo usando un objetivo con un aumento de 4 veces en el caso de densidades de partículas reducidas y con un aumento de 10 veces en el caso de densidades de partículas elevadas hasta que se detectó una señal clara.

Alternativamente, según el principio expuesto en el presente documento pueden establecerse muchas otras aplicaciones para la detección de antígenos y anticuerpos, con pero también sin una reacción enzimática que transcurra simultáneamente.

Leyenda de las figuras





Anticuerpo anti-grupos fosfo

P

Grupo fosfo

Lista de secuencias

- <110> Attomol GmbH
- 5 <120> Procedimiento para la realización y evaluación de ensayos de mezclado y medición para la medición de cinéticas de reacción así como de concentraciones y afinidades de analitos en formato múltiplex
- <130> P471207 PCT2
- 10 <150> Documento DE 10 2007 031 137.2-41
- <151> 29-06-2007
- <160> 6
- 15 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 22
- <212> ADN
- 20 <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> cebador
- 25 <400> 1
- catcaccgac ccggagaggg ac 22
- <210> 2
- <211> 22
- 30 <212> ADN
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> cebador
- 35 <400> 2
- gggccaggcg cftgttggtg ta 22
- <210> 3
- <211> 41
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial
- <220>
- 45 <223> sonda
- <400> 3
- ggacttgtc ctcaccgccc aactgatttt tttttttt t 41
- 50 <210> 4
- <211> 38
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial
- 55 <220>
- <223> sonda

ES 2 538 100 T3

	<400> 4		
	gaccgctgc tgcaactctc tcagttttt tttttt		38
5	<210> 5		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
10	<220>		
	<223> sonda		
	<400> 5		
	tttttttt tttttttt tttt		24
15	<210> 6		
	<211> 160		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
20	<220>		
	<223> patrón interno		
	<400> 6		
	catcaccgac ccggagaggg acccagcgtg gaccgcttgc tgcaactctc tcagggccag		60
	gcggtgaagg gcaatcagct gttgcccgtc tcgctggtga aaagaaaaac caccctggcg		120
25	cccaatacgc aaaccgccta caccaacaag cgcttgccc		160

REIVINDICACIONES

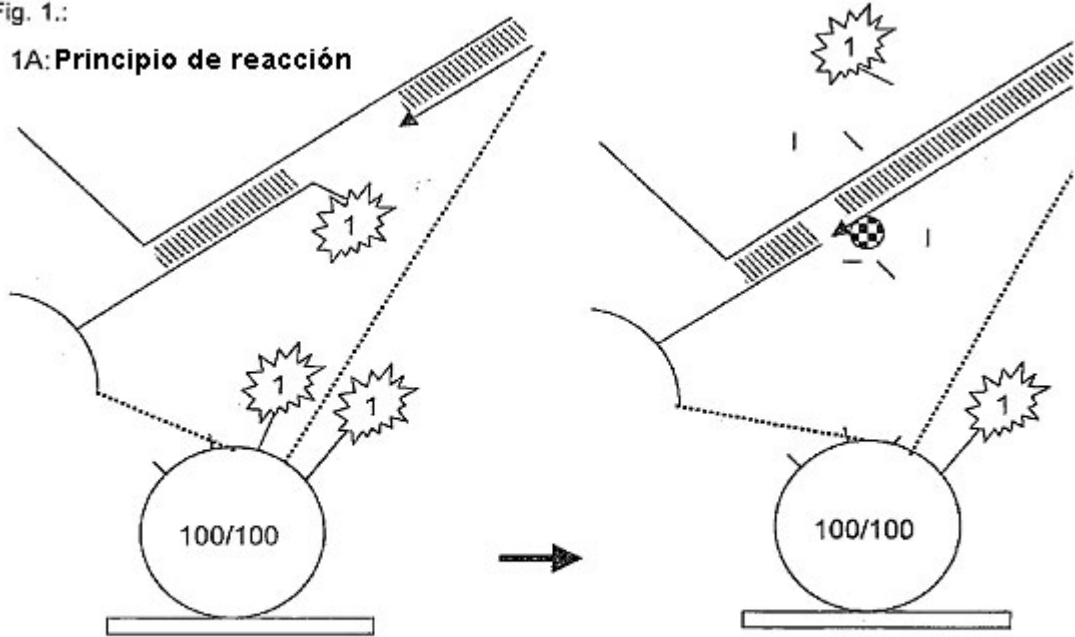
1. Procedimiento para el análisis múltiple de varios analitos que comprende las etapas de:
 - a) Utilizar un portador, sobre el que están inmovilizadas al menos dos poblaciones de micropartículas diferentes, diferenciándose las diferentes poblaciones de micropartículas en su codificación de fluorescencia y conteniendo al menos dos de las poblaciones de micropartículas con codificación de fluorescencia diferentes en cada caso micropartículas, que están ocupadas con una determinada población de moléculas aceptoras específica, diferenciándose entre sí las poblaciones de moléculas aceptoras de las al menos dos poblaciones de micropartículas con codificación de fluorescencia diferentes.
 - b) Medir la fluorescencia del portador de la etapa a) con una resolución óptica 1 antes de poner en contacto el portador con la muestra que va a analizarse o antes del inicio de la reacción, permitiendo la resolución 1:
 - una diferenciación de singletes, dupletes, tripletes, multipletes y monocapas de micropartículas, y
 - la determinación de la situación local de las micropartículas inmovilizadas individuales de las respectivas al menos dos poblaciones de micropartículas diferentes sobre el portador teniendo en cuenta la codificación de fluorescencia en cada caso diferente de las al menos dos poblaciones de micropartículas diferentes.
 - c) Poner en contacto el portador de la etapa a) con la muestra que va a analizarse, provocando la interacción del respectivo analito con la molécula aceptora específica para el mismo sobre la micropartícula inmovilizada correspondiente una variación de la fluorescencia.
 - d) Realizar al menos una medición adicional de la fluorescencia del portador durante o después de la puesta en contacto o del inicio de la reacción según la etapa c) con una resolución 2.
 - e) Asociar los valores de fluorescencia medidos con la resolución 2 con los singletes, dupletes, tripletes, multipletes y monocapas de micropartículas individuales identificados localmente sobre el portador según la etapa b) y asociados a una determinada población de moléculas aceptoras.
 - f) Determinar la variación de la fluorescencia mediante la puesta en contacto según la etapa c) para cada singlete de micropartículas identificado localmente y cada micropartícula en un duplete, triplete, multiplete y monocapa sobre el portador.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el portador estructurado o no estructurado según la reivindicación 1, etapa a) presenta zonas planas que pueden observarse al microscopio.
3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado porque las micropartículas están codificadas por fluorescencia mediante uno o varios colorantes fluorescentes en la partícula o en la superficie de la partícula y adicionalmente están codificadas por tamaño a través del tamaño de partícula o codificadas por estructura mediante patrones morfológicos y por consiguiente pueden asociarse a poblaciones de micropartículas diferenciadas.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque las micropartículas están compuestas por un núcleo y al menos una envuelta, pudiendo diferenciarse los materiales de núcleo y envuelta en composición, forma, densidad, transparencia, capacidad de modificación y presentando diferentes codificaciones de fluorescencia con al menos un colorante fluorescente, pudiendo utilizarse colorantes fluorescentes diferentes o idénticos.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque en el portador según la reivindicación 1, etapa a) están inmovilizadas adicionalmente células vivas o destruidas o células en combinación con micropartículas.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el analito se marca directamente o indirectamente a través de una molécula adicional con una fluorescencia de ligando o un extintor.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la reducción de la fluorescencia mediante extinción de la fluorescencia superficial o la pérdida de la fluorescencia superficial de la superficie de la partícula se produce durante la degradación de las moléculas aceptoras durante la reacción.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el aumento de la fluorescencia de ligando mediante la neutralización de la extinción de sistemas de indicador, mediante FRET o mediante

enriquecimiento local de moléculas de fluorescencia de ligando sobre la superficie de la partícula se produce mediante la interacción con las moléculas aceptoras o el analito así como mediante el desplazamiento de moléculas extintoras durante la reacción.

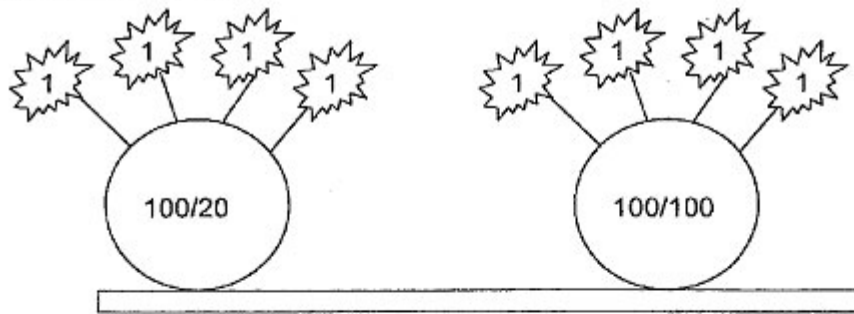
- 5 9. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque a la mezcla de reacción para el aumento del contraste de la fluorescencia de ligando se le añaden un colorante extintor o nanopartículas que absorben luz.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque se utiliza un aparato de medición para la medición de variaciones de fluorescencia, que comprende:
- un control completamente automático por medio de ordenador,
 - 10 - un termociclador para la atemperación rápida de las muestras, con una velocidad de calentamiento/enfriamiento de 3-20°C por segundo, que presenta una zona de reacción con varios alojamientos que pueden atemperarse para portadores según la reivindicación 1, etapa a),
 - un dispositivo de posicionamiento para el termociclador y/o el entorno de reacción que puede controlarse de manera termocíclica,
 - 15 - uno o varios dispositivos de iluminación asociados a la zona de reacción con los que puede irradiarse luz de excitación,
 - un dispositivo óptico que es adecuado preferiblemente para la detección de fluorescencia con luz transmitida o luz reflejada con filtros ópticos correspondientes,
 - 20 - uno o varios dispositivos de detección (por ejemplo CCD, CMOS), que generan imágenes en función de una intensidad de fluorescencia medida, y
 - una unidad de evaluación, que genera valores de medición a partir de las imágenes.
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque durante el registro de puntos de medición adicionales sólo se registra o se procesa adicionalmente la fluorescencia superficial o de ligando de un número de píxeles definidos mediante coordenadas espaciales de las partículas seleccionadas previamente según el punto de medición 1.
- 25 12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque las diferentes fluorescencias de partícula se comparan entre sí y/o con la fluorescencia superficial o con el tamaño de partícula, para decodificar las al menos dos poblaciones de micropartículas diferentes.
- 30 13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque los valores de medición registrados en la evolución de tiempo o en diferentes ciclos de reacción de los puntos de medición adicionales de una serie de medición de un mismo lugar de medición toman como referencia uno o varios valores de medición de la misma serie de medición, del mismo lugar de medición o también de otros lugares de medición.
- 35 14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque las diferentes fluorescencias de partícula de diferentes capas de partículas se comparan entre sí y/o con la fluorescencia superficial/de ligando o con el tamaño de partícula, para decodificar las poblaciones de micropartículas y/o establecer una referencia para la fluorescencia superficial o la fluorescencia de ligando.

Fig. 1.:

1A: Principio de reacción



1B: Ciclo de reacción 1



1C: Ciclo de reacción 30

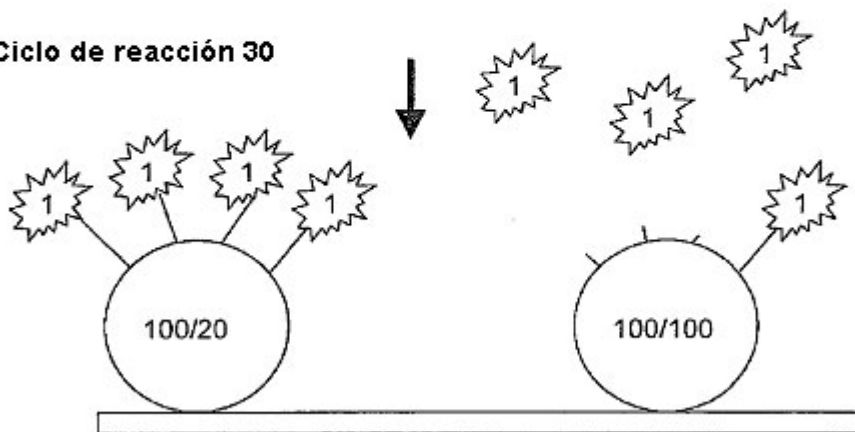


Fig. 2:

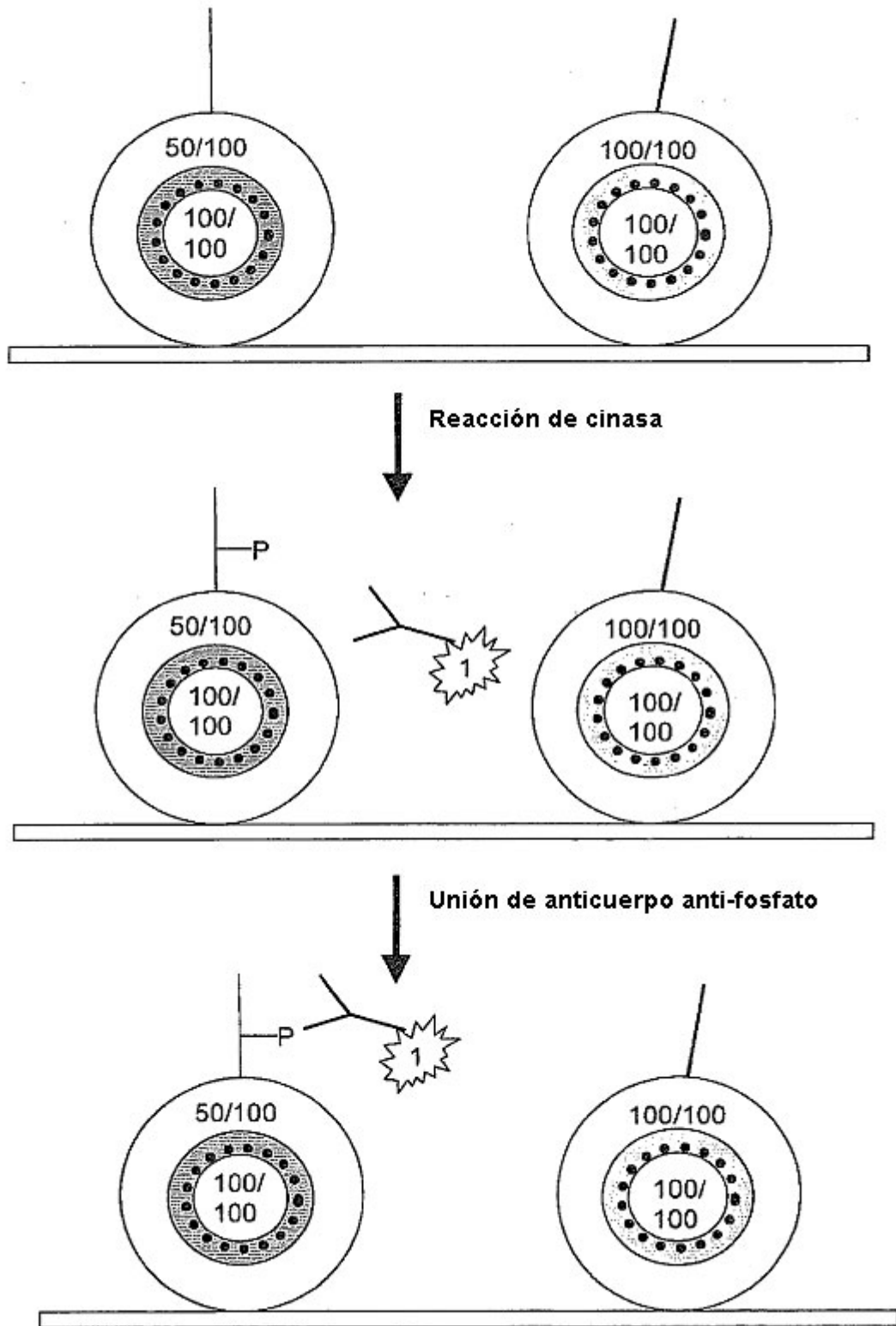


Fig. 3:

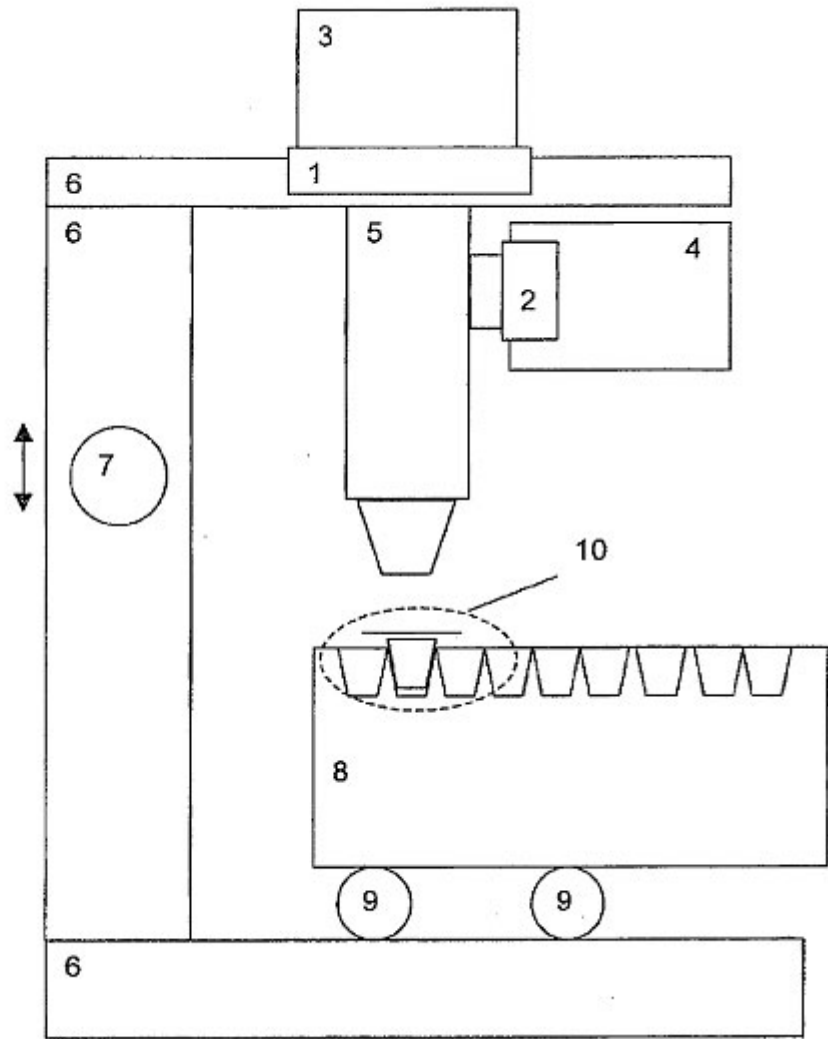


Fig. 3B: Fragmento de 3A

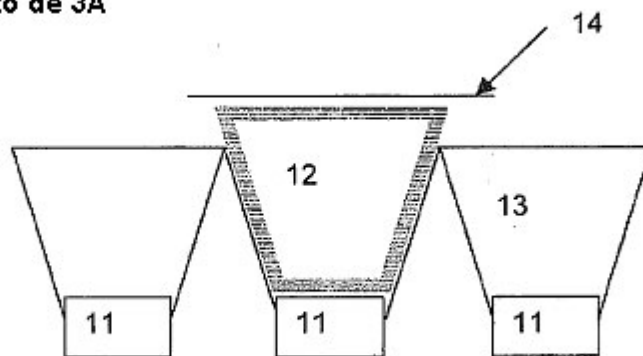


Fig. 3, C: Fragmento de B

