

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 584**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2008** **E 08857258 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2015** **EP 2217729**

54 Título: **Proceso de concentración de moléculas de ácido nucleico**

30 Prioridad:

03.12.2007 EP 07023377

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

14.09.2015

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH
(100.0%)**

**Binger Strasse 173
55216 Ingelheim am Rhein, DE**

72 Inventor/es:

**GUMBRECHT, WALTER;
PAULICKA, PETER y
STANZEL, MANFRED**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 545 584 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

Proceso de concentración de moléculas de ácido nucleico

- 5 La presente invención se refiere a un proceso de concentración de moléculas de ácido nucleico a detectar en una muestra en una superficie.

Cada vez con mayor frecuencia, el diagnóstico de ácidos nucleicos recurre a los "biochips". Se emplean, por ejemplo, para detectar varios tipos y especies de ácidos nucleicos, que pueden ser el DNA, RNA, cDNA u otros ácidos nucleicos. Los métodos analíticos basados en biochips se centran normalmente en la detección de ácidos nucleicos especiales de una muestra. Por lo tanto, por ejemplo, puede examinarse el DNA de un paciente para detectar la presencia de una secuencia particular que indique la predisposición a un trastorno. De igual manera es posible detectar patógenos tales como virus y bacterias (p. ej. VIH, VPH, VCH) en una muestra de sangre de un paciente demostrando la presencia de sus DNA o RNA en dicha muestra. Estos análisis tienen la ventaja de que son más precisos que los inmunoensayos clásicos, ya que el patógeno se detecta directamente y no a partir de los anticuerpos que se generan contra él.

En su forma más simple, los biochips empleados se basan en un sustrato de vidrio, sobre el que se inmovilizan las moléculas de captura (p. ej. oligonucleótidos), que pueden unirse de modo específico con el ácido nucleico a detectar. Estos fragmentos cortos de ácido nucleico, producidos a menudo por síntesis, son, en lo que respecta a su secuencia, por lo menos parcialmente complementarios de la secuencia del ácido nucleico a detectar, resultando de ello una unión muy específica. Tiene que evitarse a toda costa la unión de ácidos nucleicos distintos del que se pretende detectar con el fin de no obtener un resultado positivo falso. En muchos métodos, la detección actual del ácido nucleico tiene lugar mediante procesos de fluorescencia, en los que se fija un colorante fluorescente sobre el ácido nucleico a detectar, por ejemplo mediante una unión con biotina-estreptavidina. Después de la hibridación específica del ácido nucleico con las moléculas de captura (captación), se enjuaga el biochip para eliminar el material no fijado. Por consiguiente, la solución ya no contiene ningún colorante fluorescente. Por excitación de los colorantes puede observarse la fluorescencia mediante una cámara CCD, lo cual hace posible la detección.

Una ventaja de los biochips es la posibilidad de detección multiplex. De este modo es posible inmovilizar sobre varias posiciones del biochip varios tipos de moléculas de captura que tienen como diana varios ácidos nucleicos a detectar. Entonces la detección puede llevarse a cabo con una medición de fluorescencia resuelta en el espacio. Por lo tanto es también posible llevar a cabo un gran número de detecciones de ácidos nucleicos en un solo proceso.

Antes de la detección, los ácidos nucleicos se copian (amplifican), ya que el número de copias de ácido nucleico presentes normalmente no es suficiente para que sea posible la detección directa. Dicha amplificación puede llevarse a cabo, por ejemplo, por una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR se basa en la replicación de los ácidos nucleicos mediante polimerasas de DNA termoestables. Esto implica poner en contacto un par de cebadores oligonucleótidos (oligonucleótidos de hebra simple) con el ácido nucleico a amplificar. Los cebadores se eligen de tal manera que se unan a los dos extremos de un fragmento a amplificar de las hebras complementarias. Durante el alargamiento, los cebadores se alargan, pues, en la dirección a 3' a lo largo de la hebra del ácido nucleico diana particular (cebadores directos e inversos). Los cebadores directos e inversos pueden denominarse también de modo alternativo como cebadores sentido y antisentido. De esta manera es posible amplificar la pieza situada entre los sitios del ácido nucleico diana que son complementarios de los cebadores. Para las ulteriores reacciones de detección, los productos de la PCR se separan con ventaja de los cebadores, nucleótidos y otros componentes de la mezcla PCR que pudieran interferir.

El proceso PCR abarca una pluralidad de termociclos, cada uno de ellos consta de tres pasos: en primer lugar se calienta la muestra (p. ej. a 94°C) con el fin de separar las hebras del DNA diana de doble hebra de la muestra (desnaturalización). A continuación se baja la temperatura (p. ej. a 45-60°C) para que los cebadores sean capaces de unirse a las regiones complementarias del DNA que ahora posee una sola hebra (reasociación o "annealing"). En este último paso, los cebadores unidos a la hebra simple se extienden con la polimerasa de DNA en dirección al extremo 3' con arreglo a la información de la hebra del molde de DNA, empleándose los correspondientes trifosfatos de nucleósido de la solución como bloques de síntesis (alargamiento, p. ej. a 72°C). Este ciclo se realiza aprox. 15-50 veces durante la PCR. Las temperaturas anteriores se mencionan meramente a título ilustrativo y pueden ajustarse en cada caso de modo específico a la PCR que se quiera realizar.

A partir de unas pocas muestras presentes en el DNA (o en general en un ácido nucleico) es, pues, posible preparar una multiplicidad de copias en un período de tiempo muy corto, cuya concentración es suficiente para la posterior detección cualitativa de dicha DNA o ácido nucleico de la muestra. Por ejemplo, con 20 ciclos de PCR (que por lo general durante de 20 a 40 minutos) se produce teóricamente una cantidad 220 veces mayor, es decir, unas 106 veces mayor que la cantidad de ácido nucleico originalmente presente. Al mismo tiempo, la PCR permite que al producto de la PCR resultante se le incorpore un marcador, que hace posible la detección. Es posible, pues, emplea por ejemplo cebadores de PCR marcados con biotina o trifosfatos nucleósidos, obteniéndose de este modo productos sintetizados de PCR que están biotinilados. Una vez el producto de la PCR se ha unido a las moléculas de captura inmovilizadas, la biotina está, como resultado, igualmente inmovilizada en el biochip en la posición

correspondiente. En otro paso pueden unirse a dicha biotina los colorantes fluorescentes marcados con estreptavidina, lo cual permite detectar el ácido nucleico o su producto de PCR. Como alternativa a los colorantes fluorescentes pueden emplearse otros sistemas de detección, basados por ejemplo en la detección electroquímica.

Un punto central de los métodos de detección basados en los biochips es la hibridación, es decir, la unión del ácido nucleico a detectar (este término se entiende como sinónimo de los productos de la PCR generados a partir de los ácidos nucleicos). La sensibilidad de la detección del ácido nucleico dependerá de la eficacia de la hibridación. Normalmente se incuba el ácido nucleico con el biochip, permitiendo de este modo que tenga lugar la hibridación. Esta última puede mejorarse eligiendo una temperatura y un medio tampón adecuados. Es también importante que los ácidos nucleicos se muevan hacia la superficie del biochip que está ocupada por las moléculas de captura para que sea posible que la hibridación pueda tener lugar. Por lo tanto, no es óptimo que el movimiento del ácido nucleico se base únicamente en la difusión térmica. La constante de velocidad es, por ejemplo solamente de $8 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ para un oligonucleótido 25mero ("Observation of hybridization and dehybridization of Thiol-tethered DNA using two-color surface plasmon resonance spectroscopy", Peterlinz y col., J. Am. Chem. Soc. 119, 3401-3402, 1997), resultando de ello únicamente una migración promedio de 0,096 cm para un tiempo de hibridación de dieciséis horas. Por lo tanto, suponiendo que la superficie tiene un tamaño de 4 cm^2 , la difusión pasiva por sí sola hace que únicamente un 1,5 % de la muestra de ácido nucleico sea accesible para la hibridación con las moléculas de captura inmovilizadas en el biochip. Un gran número de procesos activos pueden aumentar la eficacia de la hibridación.

Por ejemplo, C.F. Erdmann y col. en "Electric field directed nucleic acid hybridization on microchips", Nucleic Acids Research 25, 4907-4914, 1997, describen ácidos nucleicos que se desplazan por electroforesis hacia el biochip aplicando un campo eléctrico. La hibridación que resulta es sustancialmente más rápida si se concentra el ácido nucleico junto a la superficie del biochip que si únicamente hay un movimiento térmico de los ácidos nucleicos. Además invirtiendo el potencial eléctrico es posible separar los ácidos nucleicos hibridados de la superficie del biochip. El método descrito requiere que los electrodos se preparen de modo especial con una capa protectora, con el fin de prevenir que los radicales libres y los cambios de pH, que pueden tener lugar durante la reacción del electrodo, puedan dañar a los ácidos nucleicos concentrados. M.J. Heller y col. describen un método similar en "An Active Microelectronics Device for Multiplex DNA Analysis", IEEE Engineering in Medicine and Biology, 100-104, marzo-abril de 1996.

Ahora un gran número de métodos en bioquímica y de diagnóstico médico emplean materiales soporte poliméricos magnéticos, en particular partículas poliméricas, para simplificar la separación de células, proteínas y ácidos nucleicos. Si se compara con los métodos convencionales de separación, que emplean materiales magnéticos de soporte, es ventajoso porque mediante las fuerzas magnéticas los materiales de soporte cargados pueden separarse con facilidad y rapidez de los demás componentes de una muestra. Las partículas magnéticas esféricas o de forma de perla basadas en el alcohol polivinílico, que tienen una distribución estrecha de tamaños de partícula, dentro de un intervalo inferior a $10 \mu\text{m}$, han demostrado ser especialmente adecuadas para tales métodos de separación (WO 97104862).

Se sabe también que los materiales biológicos especiales, en particular los ácidos nucleicos y las proteínas, solamente con grandes esfuerzos pueden aislarse de su entorno natural. Esto se debe en especial al hecho de que tienen que aplicarse procesos mecánicos, químicos y biológicos de lisis celular para aislar los ácidos nucleicos y proteínas de los núcleos, de la membrana celular o de los organelos. Además, las muestras biológicas en cuestión contienen además por lo general compuestos sólidos y/o disueltos así como otras proteínas y componentes del citoesqueleto, que pueden perturbar el aislamiento. Una dificultad adicional es el hecho de que muy a menudo en la muestra biológica a estudiar están presentes solamente concentraciones muy bajas de los ácidos nucleicos o proteínas.

Sin embargo, con el fin de ser capaces de aprovechar las ventajas del uso de las partículas magnéticas para aislar ácidos nucleicos de las muestras biológicas, se ha propuesto entre otras cosas aislar los ácidos nucleicos mediante partículas magnéticas que tengan una superficie de vidrio que está esencialmente libre de poros (WO 96141811). Estas partículas han de tener una composición especial, es decir, su superficie de vidrio ha de tener una composición particular, con el fin de lograr la eficacia deseada. La preparación de estas partículas requiere además un proceso relativamente complicado para conseguir el necesario sinterizado de la superficie de vidrio.

Los procesos de diagnóstico ya conocidos, por ejemplo los diagnósticos a partir de ácidos nucleicos y de proteínas, requieren por lo general una multiplicidad de operaciones manuales con el fin de llegar a un resultado analítico. Esto requiere entre otras cosas la separación de los componentes a detectar del resto de la muestra. Los ejemplos ya conocidos de métodos de separación son la filtración, la centrifugación, la cromatografía y la extracción. Todos ellos son procesos químicos y físicos de separación que por lo general no son adecuados para el aislamiento específico de las secuencias de DNA o de proteínas de la muestra. Se recurre, por ejemplo, a resinas, cuyas superficies contienen grupos funcionales, de modo que son capaces de unir el DNA o las proteínas. Estas moléculas diana se purifica por unión a la fase sólida de la resina, después siguen un gran número de pasos de lavado y la posterior separación de la molécula diana de la fase sólida en condiciones de tampón adecuado. La molécula diana tiene que estar unida firmemente, mientras que los componentes contaminantes de la muestra se disuelven en una fase líquida diferente. Después de varias operaciones de lavado, la molécula diana tiene que separarse de la fase sólida,

por ejemplo cambiando la fase líquida. En primer lugar, el cambio repetido de medio muy costoso en cuanto al material, y en segundo lugar los rendimientos de producto fluctúan en cada paso adicional del proceso, lo cual dificulta el calibrado cuantitativo. En especial en un proceso analítico integrado, por ejemplo en los sistemas llamados "lab-on-a-chip", en los que se preparan y se analizan las muestras de modo esencialmente automático, a menudo no es posible el chequeo de los pasos individuales del proceso y, como resultado de ello, las desviaciones de los pasos individuales del proceso se van amplificando entre sí, lo cual se traduce en desviaciones importantes de los resultados analíticos.

Los pasos individuales pueden simplificarse o incluso automatizarse por completo mediante las partículas de soporte descritas, también llamadas perlas magnéticas. Dichas perlas magnéticas se proporcionan con ligandos de afinidad u otras modificaciones de la superficie y por ello son adecuadas para unir a su superficie biomoléculas especiales, por ejemplo el DNA, de una solución. Un proceso de purificación consiste por lo general en añadir una suspensión de perlas magnéticas a la muestra a separar en un tubo de ensayo. Después de un tiempo de incubación de varios minutos para permitir que el ligando de afinidad se una a la molécula biológica deseada, se aplica un campo magnético, que separa las partículas acumulándolas en la pared del tubo. Se descarga el líquido sobrenadante y después se lavan las partículas por lo menos una vez. A tal fin, en primer lugar se retira el campo magnético y se suspenden las partículas en una solución tampón recién preparada, que contiene por lo general sales caotrópicas, que impiden que las biomoléculas se separan del material soporte. Entonces las perlas magnéticas se depositan sobre la pared del recipiente cuando se vuelve a aplicar el campo magnético. Por lo tanto, después de varios pasos de lavado, es posible eluir las moléculas con la solución tampón de bajo contenido de sales, que separa las biomoléculas unidas de las perlas magnéticas, en una solución que está exenta de componentes interferentes, a diferencia del extracto en bruto. Las perlas magnéticas se depositan de nuevo en la pared del recipiente, dejando disponibles las biomoléculas en la solución sobrenadante. Un inconveniente del proceso descrito es la gran cantidad de líquido que se requiere para cada caso, del orden de varios centenaes de microlitros para cada paso individual del proceso.

Se sabe que las células eucariotas o procariotas o los virus pueden aislarse, a título ilustrativo, por unión de anticuerpos específicos a un marcador fluorescente o a perlas magnéticas. El anticuerpo es normalmente monoclonal y está dirigido a sitios de unión específicos, por ejemplo a una molécula receptora de superficie del antígeno correspondiente de la célula o del virus. Las células o virus deseados se marcan uniendo los anticuerpos a un sitio de unión especial y clasificándolos, por ejemplo, mediante el FACS o un imán permanente. El proceso de clasificación puede llevarse a cabo realizando en primer lugar una "selección positiva", que incluye el posterior procesamiento de las células o virus marcados. En segundo lugar puede realizarse una "selección negativa", que implica la separación de las células marcadas y posterior procesamiento de las células restantes. Ambos métodos permiten cuantificar las células o virus y, como resultado de ello, se pueden calcular las cantidades de reactivos requeridas para dicho procesamiento posterior.

En la patente DE 101 11 520 B4 se describe un proceso de purificación de biomoléculas mediante partículas magnéticas, que permite en particular purificar cantidades relativamente pequeñas de líquido de una manera esencialmente automática. Se describe la suspensión de partículas magnéticas que pasan por un tubo sometido a un campo magnético fuerte. Con ajustes apropiados de diámetro, caudal e intensidad de campo magnético, las partículas magnéticas se depositan en la pared del tubo cuando pasan a través del mismo. Se descarta el líquido sobrenadante vaciando el tubo o recogiendo en un recipiente. Después pueden lavarse las partículas frenadas enjuagando con soluciones de lavado. Durante la operación de lavado pueden mantenerse las partículas magnéticas en el tubo o suspenderse y depositarse de nuevo. Se separan las biomoléculas de las partículas magnéticas de la suspensión enjuagando con una solución tampón apropiada. En este caso, el tubo debería diseñarse de manera que puedan tratarse también pequeñas cantidades de líquido, inferiores a 50 µl. El proceso descrito es especialmente indicado para la purificación del DNA o del RNA. Al final del proceso, el DNA o RNA disponible en solución puede introducirse de modo automático en un sistema analítico apropiado. La automatización puede llevarse a cabo mediante un robot pipeteador. Si se tiene que detectar el DNA mediante una hibridación específica, entonces se sugiere además incorporar además al tubo un elemento calefactor para realizar la desnaturalización del DNA de doble hebra. No obstante, con el fin de analizar el DNA mediante el proceso descrito, será necesario además extraer dicho DNA de la muestra mediante pasos de proceso que todavía no se han descrito.

Las perlas magnéticas son solo adecuadas para purificar muestras sino que además pueden emplearse para otros fines. Por ejemplo, en la patente US 2004/0219066 A1 se describe un dispositivo, gracias al cual se pueden clasificar varias partículas. Dichas partículas se une a diferentes perlas magnéticas que tienen diferentes momentos magnéticos. En una cámara de proceso se genera un gradiente de campo magnético que mueve las perlas magnéticas, gracias a sus diferentes momentos magnéticos, en diferentes cajas colectoras. Por lo tanto pueden distinguirse las diferentes partículas con perlas magnéticas de diferentes diseños.

En WO 00/47983 se describe un biosensor electroquímico, en el que las perlas magnéticas se unen a los componentes de una muestra mediante ligandos de afinidad. Se une una enzima a los componentes de la muestra ya fijados y dicha enzima despegue un sustrato añadido. Dicho sustrato genera una molécula, que se somete a un proceso de ciclación redox. El componente particular de la muestra puede detectarse de este modo.

Se conoce además el uso de las perlas magnéticas paramagnéticas para detectar el DNA. En este caso se colocan las moléculas de captura, complementarias del DNA a detectar, en un sensor magnetorrestrictivo. Si la muestra estudiada contiene el DNA a detectar, entonces tiene lugar la hibridación entre dicho DNA a detectar y las moléculas de captura. El DNA hibridado ya se ha marcado o se marca con biotina, a la que se unen las perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina. Normalmente se introduce el marcador biotina en el DNA a detectar mediante una PCR anterior (upstream), en la que se emplean cebadores o nucleótidos marcados con biotina. Después de la unión a las perlas paramagnéticas, estas últimas se magnetizan con la aplicación de un campo magnético y se mide su campo de dispersión con el sensor magnetorresistivo. Esto permite una detección cuantitativa indirecta del DNA de la muestra.

En los documentos DE 41 27 657 y WO 97104862, que se incorporan a la presente como referencia en lo que respecta a los métodos de preparación de materiales de soporte, se describen procesos de preparación de materiales de soporte magnéticos de alcohol polivinílico, con preferencia en un diseño de partícula de tipo perla. Según los procesos descritos, las partículas magnéticas pueden prepararse con una distribución muy estrecha de tamaños de partícula y con tamaños de partícula comprendidos entre 1 y 4 μm , empleados en particular para aislar biosustancias en suspensión y para el diagnóstico médico.

Las partículas de alcohol polivinílico se preparan añadiendo mezclas de emulsionantes especiales a la fase aceite de la emulsión de agua en aceite. Los emulsionantes adecuados, que se añaden como aditivos a la fase aceite, son copolímeros de bloques de óxido de propileno y óxido de etileno, ésteres de ácidos grasos de sorbita, ésteres complejos mixtos de ácidos grasos y pentaeritrita con ácido cítrico, derivados de aceite de ricino y polietilenglicol, copolímeros de bloques de derivados de aceite de ricino, polietilenglicoles, poliésteres modificados, ésteres de ácidos grasos y sorbita con poli(óxido de etileno), copolímeros de bloques de etilenodiamina y polioxietileno-polioxipropileno, derivados de poliglicerilo, derivados de alcohol y polioxietileno, derivados de alquilfenilpolietilenglicol, copolímeros de bloques de ácidos polihidroxigrasos y polietilenglicol, derivados de éteres de polietilenglicol. Las sustancias de este tipo son productos comerciales conocidos entre otros con los nombres de: Pluronic[®], Synperonic[®], Tetronic[®], Triton[®], Arlacel[®], Span[®], Tween[®], Brij[®], ReneX[®], Hyperme[®], Lameform[®], Dehymuls[®] o Eumulgin[®].

Para obtener partículas poliméricas uniformes de tipo perla, con preferencia con tamaños de partícula entre 0,5 y 10 μm , se añade a la fase aceite una mezcla por lo menos de dos, con preferencia de tres o de cuatro de dichos tensioactivos. Es preferible mezclar un componente emulsionante lipófilo con por lo menos un emulsionante que tenga propiedades semihidrófilas, es decir, que sea soluble tanto en agua como en aceite. Los ejemplos de emulsionantes que cumplen las últimas propiedades son: los derivados copolímeros de bloques de óxido de etileno y óxido de propileno con una proporción predominante de óxido de etileno, los éteres de hexadecilo y polietilenglicol, los ésteres de ácidos grasos con sorbita y polioxietileno de cadena corta, los polietilenglicoles o los ésteres de ácidos grasos con sorbita de cadena corta. La concentración de los emulsionantes en la fase aceite se sitúa normalmente entre el 2 y el 6 % en volumen, con preferencia entre el 3,5 y el 5,0 % en volumen. Son ventajosos con respecto a la finura y a la distribución estrecha de tamaños de partícula de las gotitas de polímeros aquellas mezclas de emulsionantes que contienen por lo menos dos componentes lipófilos y un emulsionante semihidrófilo. La concentración del emulsionante semihidrófilo se sitúa normalmente entre el 15 y el 30 % en volumen, porcentajes referidos a la cantidad total de emulsionante. Además de la finura de las partículas, dichas partículas presentan una forma de tipo perla.

Aparte de los emulsionantes para la fase aceite, hay tensioactivos especiales, que son solubles en la fase acuosa del polímero y que también contribuyen a mejorar la calidad de la emulsión, en especial las soluciones de alcohol polivinílico de peso molecular bajo (Mowiol, Clariant GmbH, Frankfurt del Main, Alemania). Además, los coloides magnéticos, que se añaden en forma sólida, se dispersan finamente con éxito añadiendo emulsionantes iónicos. Son ejemplos de tales emulsionantes, que pueden emplearse también como mezclas binarias, los siguientes: la albúmina de suero, la gelatina, los derivados de ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, los polietilenglicoles, la poli-N-vinilpirrolidona o el acetobutirato de celulosa. Las cantidades de emulsionantes se sitúan normalmente entre el 0,01 y el 2 % en peso, porcentajes referidos a la fase de polímero, situándose siempre la concentración de los emulsionantes iónicos entre el 0,01 y el 0,05 % en peso. Los expertos ya están familiarizados con los efectos que tienen las velocidades de agitador y las concentraciones y viscosidades de las dos fases en el tamaño de las partículas. Para obtener los tamaños de partícula preferidos, comprendidos entre 0,5 y 10 μm , la velocidad del agitador deberá situarse entre 1500 y 2000 revoluciones por minuto, cuando se emplean agitadores convencionales de hélice de dos paletas.

En principio, estos coloides ferro- o superparamagnéticos, que tienen un tamaño de partícula apropiado y una saturación magnética situada normalmente entre 50 y 400 Gauss, pueden emplearse como partículas magnéticas que durante el proceso quedan encapsuladas dentro de la matriz de alcohol polivinílico. Otro requisito que tienen que cumplir las partículas magnéticas es la dispersabilidad en la fase acuosa del polímero que contiene el alcohol polivinílico. Durante la emulsión posterior en la fase orgánica, los coloides magnéticos quedan ocluidos simultáneamente en las gotitas de polímero.

Los coloides magnéticos adecuados son con preferencia magnetitas de tamaños de partícula comprendidos entre 10 y 200 nm. Estas sustancias son también productos comerciales suministrados por ejemplo con los nombres de Bayferrox o Ferrofluidics. Dado que la preparación de tales coloides forma parte de la técnica anterior en general, las partículas magnéticas pueden obtenerse también por los procesos descritos por ejemplo por Shinkai y col., Biocatalysis, vol. 5, 61, 1991, o Kondo y col., Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 41, 99, 1994. Las concentraciones de los coloides de la fase del polímero se sitúa normalmente entre el 4 y el 14 % en volumen, referidos en cada caso a esta fase, para los coloides que ya son coloides acuosos debido a su propia preparación y entre el 0,3 y el 2 % en peso para las sustancias sólidas. La preparación consiste en mezclar directamente los coloides magnéticos con la fase del polímero. Con el fin de asegurar que la distribución de las partículas sea finamente dispersada y uniforme, es beneficioso un mezclado breve de la dispersión acuosa mediante una herramienta dispersante muy revolucionada (Ultra-Turrax) y el posterior tratamiento con ultrasonidos. La fase de polímero requerida para preparar las partículas magnéticas contiene normalmente una solución de alcohol polivinílico del 2,5 al 10 % en peso.

El material de soporte magnético con alcohol polivinílico puede obtenerse después a partir de la suspensión por métodos que los expertos ya conocen, por ejemplo por filtración y lavado.

Un proceso conocido de funcionalización consiste en equipar la superficie del material soporte con ligandos de afinidad. Esto requiere por lo general fijar químicamente grupos reactivos a dicha superficie, a los que después se unen dichos ligandos de afinidad. Estos grupos pueden ser, por ejemplo, grupos tosilo, hidroxilo, aldehído o carboxilo, amino, tiol o epoxi. Pueden aportarse en general tratando las partículas superparamagnéticas monodispersadas sin recubrir con el fin de proporcionarles una capa una capa de superficie provista de un polímero que lleva tales grupos funcionales, por ejemplo un derivado de celulosa o un poliuretano junto con un poliglicol para aportar los grupos hidroxilo, un polímero o copolímero de ácido acrílico o de ácido metacrílico para aportar grupos carboxilo o un polímero amino-alquilado para aportar grupos aminos. En la patente US 4,654,267 se describe una pluralidad de recubrimiento de superficie.

En DE 100 13 995 A1 se describen materiales magnéticos de soporte basados en el alcohol polivinílico, cuya superficie está por lo menos parcialmente silanizada y, si procede, están equipados con ligandos de afinidad para la unión con las biomoléculas. Los materiales de soporte descritos pueden diseñarse en forma de filtros, membranas o partículas. Es preferido el material magnético de soporte en forma de perla o de partículas esféricas, dichas partículas tienen un tamaño comprendido con preferencia entre 0,2 y 50 μm , con preferencia especial entre 0,5 y 5 μm . Aparte del diseño preferido para las partículas en forma de perla o esférica, su distribución de tamaños debería ser tan estrecha como sea posible. Los materiales de soporte se preparan con preferencia en forma de partícula por reacción del material soporte de alcohol polivinílico con un compuesto silano orgánico. Las partículas silanizadas se hacen reaccionar después con ligandos de afinidad.

Los ligandos de afinidad que pueden unirse son en principio cualquier ligando empleado en cromatografía de afinidad. Los ejemplos de ello son: la proteína A, la proteína G, la proteína L, la estreptavidina, la biotina, la heparina, los anticuerpos, la albúmina del suero, la gelatina, la lisina, la concanavalina A, los oligosacáridos, los oligonucleótidos, los polinucleótidos, los iones metálicos de unión a proteínas, las lectinas, los aptámeros o las enzimas. Forman parte de la técnica anterior en general los fraccionamientos especiales que se llevan a cabo empleando tales matrices de afinidad.

Las ventajas descritas de las perlas magnéticas pueden aprovecharse también para concentrar ácidos nucleicos en los biochips, tal como se describe en la patente US 2002/0166764 A1. El dispositivo allí descrito consta de un biochip, que está dispuesto en una cámara. Puede ajustarse el caudal de líquido que pasa por la cámara. Fuera de la cámara hay un generador de campo magnético que permite que las perlas magnéticas del interior de la cámara se muevan hacia la superficie del biochip. Los ácidos nucleicos se fijan específicamente sobre las perlas magnéticas antes de su introducción en la cámara. Tal fijación se consigue con los oligonucleótidos de las perlas magnéticas. Las perlas magnéticas, y por lo tanto también los ácidos nucleicos, se mueven a continuación en la cámara mediante el generador de campo magnético hacia la superficie del biochip y se mantienen en ella. La presencia de los ácidos nucleicos sobre las perlas magnéticas se detecta mediante un proceso de ciclación redox. El proceso descrito no es capaz de multiplexado, ya que las perlas magnéticas no pueden dirigirse a posiciones individuales, como se requeriría en los microordenamientos (microarrays). Las perlas magnéticas se mantienen de modo inespecífico junto a la superficie del biochip.

En WO 98/4584 se describe un proceso para detectar proteínas (inmunoensayos), que también emplea perlas magnéticas. Se inmoviliza sobre la perla magnética una molécula de captura, capaz de unirse a una molécula diana de unión. La molécula diana de unión está unida a su vez a la proteína a detectar. Después de haberse formado un complejo de la proteína, la molécula diana a unir, la molécula de captura y la perla magnética, este complejo podrá separarse del resto de la muestra mediante fuerzas magnéticas. En condiciones "suaves", que no se describen con detalle, puede romperse la unión entre la molécula de captura y la molécula diana de unión, sin que la molécula diana de unión pierda su capacidad de unión. Las perlas magnéticas se separan con las moléculas de captura que permanecen sobre ellas. Las proteínas quedan unidas mediante anticuerpos inmovilizados en una superficie y por lo tanto están también inmovilizadas. Las moléculas de detección, por ejemplo los colorantes fluorescentes, quedan

unidas a las moléculas diana de unión para su detección. De este modo pueden detectarse las proteínas de la muestra.

En WO 2007/002567 A se describen métodos para detectar una molécula de ácido nucleico diana de una muestra. A diferencia del método descrito en WO 2007/002567, en la presente invención se disuelven las moléculas de ácido nucleico (5a) de las perlas magnéticas (1) aumentando la temperatura hasta una temperatura T2, que es superior a la temperatura de fusión de los híbridos de las moléculas de ácido nucleico (5a, 5b) y las moléculas de transferencia (3a, 3b) y que es inferior a la temperatura de fusión de los híbridos de las moléculas de ácido nucleico (5a, 5b) y las moléculas de captura (203).

En WO 2006/122002 A se describe un método de captura simultánea de dos o más ácidos nucleicos en una sola muestra. En este método se hibrida en primer lugar un ácido nucleico a detectar con el correspondiente subgrupo de sondas de captación de n-dianas, que después, en un segundo paso, se hibridan con la sonda de captación del soporte correspondiente, que está asociada a un soporte sólido. Es decir, en WO 2006/122002 no se hibrida directamente la muestra a detectar con una sonda de captura de un soporte sólido, sino que en primer lugar se hibrida con la correspondiente sonda de captura diana y esta sonda de captura diana se hibrida después con una sonda de captura existente en el soporte sólido. Además, en WO 2006/122002 no se describe que las moléculas de ácido nucleico (5a, 5b) se muevan a través del campo magnético, que se aplica mediante el generador de campo magnético (105), hacia la superficie (101) del biochip. Tampoco en WO 2006/122002 se describe que la molécula de ácido nucleico a detectar se disuelva de la perla magnética aumentando la temperatura hasta una temperatura que es superior a la temperatura de fusión de los híbridos de las moléculas de ácido nucleico (5a, 5b) y la molécula de transferencia (3a, 3b) y que es inferior a la temperatura de fusión de los híbridos de las moléculas de ácido nucleico (5a, 5b) y las moléculas de captura (203).

En US 2004/110222 A1 se describen un método de detección de biopolímeros y los biochips empleados en dicho método. En este método se emplean perlas para pescar una sonda de DNA a detectar y se fija el DNA en la superficie de la perla. Las perlas contienen engarces de direccionado (3) ubicados en sus superficies. Estos engarces de direccionado están unidos a las proteínas de la sonda de direccionado (12), inmovilizadas en una superficie por una reacción entre antígeno y anticuerpo. Por lo tanto, en este método, la molécula a detectar no se hibrida directamente con una molécula de captura inmovilizada en la superficie del sensor sino que la molécula a detectar está unida a una perla que, mediante el engarce de direccionado, está unida a la proteína de la sonda de direccionado inmovilizada sobre el sustrato. En la patente US 2004/110222 A1 no se describe un paso de aplicación de un campo magnético mediante un generador de campo magnético (105) para mover las moléculas de ácido nucleico (5a, 5b) unidas a la perla magnética (1) a través del campo magnético hacia la superficie (101) del biochip. Además, la molécula de ácido nucleico a detectar permanece unida a la perla y la perla propiamente dicha está unida a la molécula de captura de la superficie sólida por una reacción entre antígeno y anticuerpo.

Es objeto de la presente invención proporcionar un proceso mejorado de concentración ácidos nucleicos en biochips.

Este objeto se alcanza con un proceso definido en la reivindicación 1:

Un proceso de concentración de moléculas de ácido nucleico (5a, 5b), en una superficie (201) de un campo sensor (103a) de un biochip, el proceso consta de los pasos siguientes:

(a) proporcionar perlas magnéticas (1), con moléculas de transferencia (3a, 3b, 3c) inmovilizadas sobre ellas, que son capaces de hibridarse con una porción de las moléculas de ácido nucleico (5a, 5b), con lo cual forman complejos que contienen dichas perlas magnéticas (1), dichas moléculas de transferencia (3a, 3b, 3c) y dichas moléculas de ácido nucleico;

proporcionar una superficie (201) de un campo sensor (103a, 103b, 103c), que constituye una parte de una superficie (101) de un biochip, dichas moléculas de captura (203) se inmovilizan sobre dicha superficie (201), dichas moléculas de captura (203) se hibridan de modo específico con una porción de las moléculas de ácido nucleico (5a, 5b), en el que las secuencias de ácido nucleico de las moléculas de captura (203) y las moléculas de transferencia (3a, 3b, 3c) se eligen de tal manera que la temperatura de fusión del híbrido entre una molécula de ácido nucleico (5a, 5b) y una molécula de transferencia (3a, 3b, 3c) sea inferior a la temperatura de fusión del híbrido entre una molécula de ácido nucleico (5a, 5b) y una molécula de captura (203); y proporcionar un generador de campo magnético (105);

(b) incubar las perlas magnéticas (1) con las moléculas de ácido nucleico (5a, 5b), a una temperatura T1 que es inferior a la temperatura de fusión de los híbridos entre las moléculas de ácido nucleico (5a, 5b) y las moléculas de transferencia (3a, 3b), permitiendo de este modo que las moléculas de ácido nucleico (5a, 5b) se hibriden con las moléculas de transferencia (3a, 3b);

(c) aplicar un campo magnético con el generador de campo magnético (105), con lo cual se mueven las moléculas de ácido nucleico (5a, 5b) unidas a las perlas magnéticas (1) a través del campo magnético hacia la superficie (101) del biochip, con lo cual se ponen en contacto las moléculas de ácido nucleico (5a, 5b) unidas a las perlas magnéticas (1) con una superficie (201) del campo sensor (103a, 103b);

(d) aumentar la temperatura desde una temperatura T1 a una temperatura T2, que es superior a la temperatura de fusión de los híbridos de las moléculas de ácido nucleico (5a, 5b) y las moléculas de transferencia (3a, 3b) y que es inferior a la temperatura de fusión de los híbridos de las moléculas de ácido nucleico (5a, 5b) y las moléculas de captura (203), con lo cual se disuelven o separan las moléculas de ácido nucleico (5a) de las perlas magnéticas (1) y se permite la unión de por lo menos una porción de la molécula de ácido nucleico (5a, 5b) con la molécula de captura (203);

(e) mover las perlas magnéticas (1) para separarlas de la superficie (101) del biochip por interrupción de la aplicación del campo magnético;

(f) repetir los pasos de (b) a (e).

Se describe también un proceso de concentración moléculas de ácido nucleico a detectar de una muestra en una superficie, con moléculas de captura que se unen de manera específica con una sonda de captura que está inmovilizada en dicha superficie. El proceso consta de los pasos siguientes:

- proporcionar un material de soporte, que tiene la sonda de captura y que puede fijarse de modo específico a las moléculas de ácido nucleico a detectar para generar complejos, que contienen dicho material soporte y dichas moléculas de ácido nucleico,
- incubar el material soporte con la muestra y formar los complejos,
- mover los complejos hacia la superficie,
- unir por lo menos una porción de los complejos con las moléculas de captura mediante la sonda de captura.

El proceso tiene la ventaja de emplear la sonda de captura y de unirla con las moléculas de captura inmovilizadas en la superficie del biochip, lo cual permite que las perlas magnéticas queden unidas con eficacia a las moléculas de captura. De ello resulta que el ácido nucleico a detectar queda inmovilizado junto a la superficie y que puede detectarse mediante procesos ya conocidos. Además, el biochip no es específico de ácidos nucleicos y por lo tanto puede tener un uso universal. La especificidad se deriva únicamente del diseño del material soporte que contiene en primer lugar una sonda de captura independiente de la muestra para la unión selectiva (selectiva en sentido genérico (direccionable)) con la superficie y que en segundo lugar es capaz de unirse específicamente con el ácido nucleico a detectar. De este modo en la preparación de la muestra es posible mezclar un ácido nucleico a detectar con materiales de soporte de diseño apropiado e incubarlo con el biochip. El biochip propiamente dicho puede producirse en masa siempre de la misma manera y emplearse sin modificación para cualquier detección de diversos ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos forman la parte genéricamente activa (que se une a las moléculas de captura inmovilizadas en la superficie del chip) del material soporte, mientras que la parte específica de la molécula diana puede contener ácidos nucleicos, proteínas o aptámeros.

El proceso puede ponerse en práctica de manera simple, es decir, es capaz de multiplexado. Esto requiere una pluralidad de tipos de materiales de soporte con varias sondas de captura, que en cada caso pueden unirse a diferentes ácidos nucleicos a detectar para generar varios complejos. Dichos ácidos nucleicos diversos pueden, pues, frenarse o retenerse en varios sitios del biochip con moléculas de captura, que están inmovilizadas en varios sitios del biochip y que están dirigidas contra dichas diversas sondas de captura. Los procesos de detección ya conocidos permiten detectar los ácidos nucleicos de una manera resuelta en el espacio.

Se describe también que los complejos no fijados se separan de la superficie y se mueven de nuevo hacia la superficie. A continuación sigue la unión de por lo menos otra porción de los complejos con las moléculas de captura. Así se aborda el problema del material soporte con los ácidos nucleicos inmovilizados que se distribuyen por lo general de modo uniforme sobre la superficie del biochip, debido al movimiento causado por el campo magnético. De este modo es posible la redistribución, en particular en procesos multiplex, para los ácidos nucleicos en ubicaciones de medición (manchas, spots) del biochip, en las que no encuentran ningún reactivo inmovilizador en forma de moléculas de captura. Las dimensiones de una mancha son por lo general pequeñas si se comparan con toda la superficie del biochip. Repitiendo los pasos del proceso varias veces puede aumentarse la eficacia de la hibridación, ya que los complejos que todavía no se han hibridado pueden moverse de nuevo hacia la superficie y en parte fijarse en ella.

En un desarrollo ventajoso del proceso, el material soporte tiene una superficie en la que se inmovilizan las sondas de captura y las moléculas de transferencia que se unen a las moléculas de ácido nucleico. Un material soporte de este tipo puede producirse con facilidad por los procesos descritos previamente. Una unión muy específica de únicamente el ácido nucleico seleccionado para cada especie de material soporte proporciona un alto grado de fiabilidad contra los errores.

En un desarrollo ventajoso del proceso, las moléculas de captura, la sonda de captura y las moléculas de transferencia son ácidos nucleicos. De este modo es posible generar de manera sencilla los episodios de unión muy específica que se requieren para el proceso. Se describe también un proceso alternativo de concentración de moléculas de ácido nucleico a detectar de una muestra en una superficie, con moléculas de captura que se unen de modo específico con la molécula de ácido nucleico que está inmovilizada sobre dicha superficie, dicho proceso consta de los pasos siguientes:

- proporcionar un material de soporte, que puede fijarse de modo específico a las moléculas de ácido nucleico a detectar para generar complejos, que contienen dicho material soporte y dichas moléculas de ácido nucleico,
- incubar el material soporte con la muestra y formar los complejos,
- mover los complejos hacia la superficie,
- separar las moléculas de ácido nucleico del material soporte y
- unir por lo menos una porción de las moléculas de ácido nucleico con las moléculas de captura.

Una ventaja especial de este proceso consiste en el hecho de que dicha porción de las moléculas de ácido nucleico se une a la superficie con gran eficacia, ya que el movimiento de los complejos a la superficie se traduce en su concentración. Además, si se compara con el proceso descrito en la reivindicación 1, se puede dispensar al mismo tiempo la sonda de captura adicional. Sin embargo, son idénticas las ventajas recién mencionadas con respecto a los procesos ya conocidos. La especificidad del proceso de detección en esta forma de ejecución está en el biochip propiamente dicho, debido a las moléculas de captura inmovilizadas en su superficie.

Se describe también que las moléculas de ácido nucleico a detectar se separan del material soporte y este último se retira de la superficie. Esto puede impedir una posible influencia del material soporte en los pasos posteriores del proceso, por ejemplo, en la detección del ácido nucleico. El ácido nucleico propiamente dicho permanece en este caso inmovilizado en la molécula de captura de la superficie del biochip.

Se describe también que el material soporte se presenta en forma de perlas magnéticas, cuya superficie tiene moléculas de transferencia para fijar el ácido nucleico. Es también posible que las moléculas de captura unidas al chip y las moléculas de transferencia se presenten en forma de ácidos nucleicos.

Se describe además que el proceso consta de los pasos siguientes:

- las moléculas de captura contienen en cada caso una secuencia de ácido nucleico que es parcialmente complementarios de la secuencia de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico a detectar,
- las moléculas de transferencia contienen en cada caso una secuencia de ácido nucleico que es parcialmente complementarios de la secuencia de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico a detectar y
- las secuencias de ácido nucleico de las moléculas de captura y de las moléculas de transferencia, que son complementarias de las moléculas de ácido nucleico a detectar, se eligen de tal manera que la temperatura de fusión de un híbrido de molécula de ácido nucleico-molécula de transferencia se inferior a la temperatura de fusión de un híbrido de molécula de ácido nucleico-molécula de captura.

El uso descrito de las moléculas de captura y de transferencia proporciona una posibilidad simple de separar el complejo. Las secuencias de ácido nucleico parcialmente complementarias son normalmente contiguas. Las diferentes temperaturas de fusión de los híbridos pueden lograrse de manera simple mediante la longitud de las secuencias complementarias de ácidos nucleicos. Esto asegura que, si se rompe el engarce entre la molécula de transferencia y el ácido nucleico, permanece intacto el engarce entre la molécula de ácido nucleico y la molécula de captura y la molécula de ácido nucleico continúa estando inmovilizada. Así puede separarse el material soporte de una manera simple. Para la separación puede aplicarse en general cualquier modificación de las condiciones de restricción (stringency). De este modo es posible, por ejemplo, modificar las condiciones de restricción cambiando la concentración de sal o el contenido de formamida.

Se describe también que el proceso consiste en incubar en condiciones de restricción que son inferiores a la fusión (desnaturalización) de los híbridos de molécula de ácido nucleico-molécula de transferencia. Los complejos se mueven hacia la superficie en las condiciones de restricción, que son inferiores a la fusión de los híbridos de molécula de ácido nucleico-molécula de transferencia.

Se describe también que el proceso consiste en incubar a una primera temperatura, que es inferior a la temperatura de fusión de los híbridos de molécula de ácido nucleico-molécula de transferencia. Los complejos se mueven hacia la superficie en una segunda temperatura, que es inferior a la temperatura de fusión de los híbridos de molécula de ácido nucleico-molécula de transferencia. Después de unir los complejos a las moléculas de captura, la temperatura se eleva hasta una tercera temperatura que se sitúa entre las temperaturas de fusión de los híbridos de molécula de ácido nucleico-molécula de transferencia y de los híbridos de molécula de ácido nucleico-molécula de captura. Esto asegura que el engarce entre el ácido nucleico y las moléculas de captura permanecerá intacto, mientras que se rompe o se separa el engarce entre la molécula de ácido nucleico y la molécula de transferencia.

El proceso descrito y los desarrollos ventajosos pueden ponerse fácilmente en práctica. Solamente es necesario equipar varios sitios del biochip con diversas moléculas de captura, que son parcialmente complementarias de los diversos ácidos nucleicos a detectar. Es también necesario proporcionar varios materiales de soporte que tengan diferentes moléculas de transferencia que después transporten dichos ácidos nucleicos diversos a la superficie. En función de los ácidos nucleicos a detectar es posible también como alternativa emplear perlas magnéticas del mismo tipo, todas ellas son capaces de fijar cualquiera de los ácidos nucleicos a detectar. Esto es posible por la inmovilización en la superficie del biochip es muy específica gracias a las moléculas de captura situadas en ella.

Se describe además un proceso alternativo de concentración de diferentes moléculas de ácido nucleico a detectar de una muestra en una superficie, estando las moléculas de captura, que se unen de modo específico a dichas moléculas de ácido nucleico, inmovilizadas en grupos y en diferentes sitios de la superficie (201), dicho proceso consta de los pasos siguientes:

- proporcionar un material de soporte, que puede fijarse de modo específico a las moléculas de ácido nucleico a detectar para generar complejos, que contienen dicho material soporte y dichas moléculas de ácido nucleico,
- incubar el material soporte con la muestra y formar los complejos,
- mover los complejos hacia la superficie,
- separar las moléculas de ácido nucleico del material soporte y
- unir por lo menos una porción de las moléculas de ácido nucleico con las moléculas de captura.

Este proceso multiplex puede llevarse a la práctica con una facilidad especial, ya que solamente se requiere un tipo de materiales de soporte que tenga propiedades de unión con los diferentes ácidos nucleicos.

De igual manera pueden llevarse a la práctica los mismos desarrollos ventajosos del proceso, que se han descrito previamente.

Otras ventajas y desarrollos de los procesos se deducen de las formas de ejecución ilustrativas descritas a continuación y explicadas con referencia a las figuras que acompañan, en las que:

en las figuras de 1 a 10 se representan varios pasos del proceso de hibridación y en las figuras de 11 a 13 se representan varios pasos del proceso alternativo de hibridación.

En las formas de ejecución ilustrativas descritas a continuación se describen procesos de concentración de moléculas de DNA. En principio pueden aplicarse de igual manera a cualquier ácido nucleico. También es posible concentrar otras biomoléculas, para las que se dispone de reactivos de unión específicos aplicando los procesos aquí descritos. Los procesos se representan a título ilustrativo para pocos tipos o para solo un tipo de ácido nucleico. Normalmente se emplea un gran número de muestras con el fin de permitir la detección posterior de los ácidos nucleicos.

En la figura 1 se representa un diagrama de una perla magnética 1, que tiene tres oligonucleótidos diferentes, 3a, 3b, 3c, como moléculas de transferencia. Se representan igualmente dos moléculas de DNA diferentes a detectar, 5a y 5b. Los oligonucleótidos 3a y 3b tienen secuencias que son parcialmente complementarios de las moléculas de DNA 5a y 5b. Las moléculas de DNA 5a y 5b llevan en cada caso una molécula de biotina 7. La situación de la figura 1 corresponde al inicio de una fase de incubación del proceso.

Las moléculas de DNA 5a y 5b se han aislado, purificado y, si procede, amplificado por procesos conocidos, por ejemplo, a partir una muestra de sangre de un paciente antes de la fase de incubación. Sin embargo, el aislamiento y la purificación son también posibles por el proceso posterior propiamente dicho. Previamente se requiere solo una lisis posiblemente necesaria con el fin de soltar o liberar las moléculas de DNA 5a y 5b de las células o virus en cuestión.

En la figura 2, ya ha finalizado la incubación de la perla magnética 1 con las moléculas de DNA 5a y 5b. Las moléculas de DNA 5a y 5b se han unido a los oligonucleótidos 3a y 3b, respectivamente, y de este modo quedan inmovilizadas sobre la perla magnética 1. La unión de la molécula de DNA 5a con el oligonucleótido 3a se indica de manera simbólica con dos líneas de conexión. Dichas líneas de conexión simbolizan una secuencia de ácido nucleico de la molécula de DNA 5a complementaria solapada y el oligonucleótido 3a. La unión entre la molécula de DNA 5b y el oligonucleótido 3b se representa de manera similar.

En la figura 3 se representa un diagrama de la superficie de un biochip 101. El biochip 101 consta de tres campos sensores, 103a, 103b y 103c, equipados para detectar varias moléculas de DNA. Se proporciona un generador de campo magnético 105 (representado aquí solo en modo esquemático). Puede diseñarse, por ejemplo, en forma de imán permanente móvil o en forma de bobina. El biochip 101 está ubicado en una cámara de reacción (no representada), que se llena con una solución. Dicha solución contiene las perlas magnéticas incubadas 1 en una concentración $C_1 = n_1/V_1$, en la que n_1 es el número de perlas magnéticas 1 y V_1 es el volumen de la solución.

En la figura 4 se representa el biochip 101 después de aplicar un campo magnético con el generador de campo magnético 105. Las perlas magnéticas 1 se han movido a través del campo magnético hacia la superficie del biochip 101 y en ella están presentes en una concentración $C_2 = n_1/V_2$, en la que V_2 es el volumen por encima del biochip 101 en el que ahora se concentran las perlas magnéticas 1. La concentración C_2 es mayor que C_1 porque $V_2 \ll V_1$. Por lo tanto, las perlas magnéticas 1 se han concentrado junto a la superficie del biochip 101.

En la figura 5 se representa una sección de la situación en la superficie 201 del campo sensor 103a. Las moléculas de captura que son oligonucleótidos 203 están inmovilizadas sobre el campo sensor 103a. Al igual que los oligonucleótidos 3a, están dirigidas a la molécula de DNA 5a, aunque a una subsecuencia diferente.

Al igual que el oligonucleótido 3a, el oligonucleótido 203 tiene una subsecuencia que es complementaria de la molécula de DNA 5a. No obstante, esta subsecuencia es más larga que la subsecuencia complementaria de la molécula de DNA 5a y del oligonucleótido 3a. La molécula de DNA 5a unida a la perla magnética 1 se incuba con la superficie 201 del campo sensor 103a a una temperatura T_1 que es inferior a la temperatura de fusión del híbrido de la molécula de DNA 5a y el oligonucleótido 3a. Por lo tanto, este híbrido permanecerá estable a la presente temperatura T_1 . Dado que las subsecuencias complementarias tienen longitudes diferentes, la molécula de DNA 5a tiende a formar un híbrido con el oligonucleótido 203 a la temperatura T_1 . La temperatura de fusión de los híbridos formados de este modo es superior a la temperatura de fusión del híbrido de la molécula de DNA 5a y el oligonucleótido 3a.

En la figura 6 se representa la situación en la superficie 201 del campo sensor 103a después de separar los complejos de la perla magnética 1 y las moléculas de DNA 5a y 5b, respectivamente. La separación de los complejos se ha realizado aumentando la temperatura hasta la temperatura T_2 . La temperatura T_2 elegida es superior a la temperatura de fusión de los híbridos de las moléculas de DNA 5a y 5b y los oligonucleótidos 3a y 3b, respectivamente. El aumento de la temperatura hasta la temperatura T_2 se traduce en una separación (disolución) de los híbridos, de modo que la perla magnética 1 con los oligonucleótidos 3a inmovilizados sobre ella se separa de la molécula de DNA 5a.

El aumento de la temperatura hasta la temperatura T_2 separa igualmente el híbrido entre la molécula de DNA 5b y el oligonucleótido 3b y como resultado de ello la molécula de DNA 5b queda otra vez libre en solución, con independencia de la perla magnética 1. La temperatura T_2 es inferior a la temperatura de fusión de los híbridos de la molécula de DNA 5a y el oligonucleótido 203, y dicho híbrido es por lo tanto estable a la temperatura T_2 elegida.

En la figura 7 se representa la superficie 201 después de la hibridación de la molécula de DNA 5a con el oligonucleótido 203. Los engarces de la molécula de DNA 5a con el oligonucleótido 203 se simbolizan con cuatro líneas de conexión. La molécula de DNA 5b, que está igualmente inmovilizada sobre la perla magnética 1, no encuentra ningún reactivo de unión en los oligonucleótidos 203 de la superficie 201 del campo sensor 103a, por ello en este caso no se establece ningún engarce.

Si se pretende detectar también la molécula de DNA 5b, entonces los oligonucleótidos correspondientes tendrán que inmovilizarse en un campo sensor separado (por ejemplo en el campo sensor 103b), en el que la molécula de DNA 5b puede unirse gracias a una subsecuencia complementaria de los oligonucleótidos allí inmovilizados. Por consiguiente, la molécula de DNA 5a no encuentra un reactivo de unión en el campo sensor 103b.

Después de interrumpirse la aplicación del campo magnético, las perlas magnéticas 1 quedarán de nuevo libres en solución, de modo que la superficie 201 del campo sensor 103a dejará de estar ocupada por las perlas magnéticas 1. Esta situación corresponde la de la figura 3, aparte de la molécula de DNA 5a que se ha hibridado previamente. Se descarta, por tanto, la interferencia con la siguiente reacción de detección de la molécula de DNA 5a.

Se puede suponer que la distribución aleatorio uniforme de las perlas magnéticas 1 en la totalidad de la superficie del biochip 101 no conseguiría inmovilizar muestras suficientes de la molécula de DNA 5a en la superficie 201 del campo sensor 103a. Con arreglo a una distribución uniforme, las perlas magnéticas 1 con las moléculas de DNA 5a se distribuyen de manera uniforme sobre la superficie después de activarse la aplicación del campo magnético. En la figura 7 se demuestra esto por el hecho de que aquí la molécula de DNA 5b está presente por encima del campo sensor 103a y no, como se desea realmente, en el campo sensor 103b. Por consiguiente, las perlas magnéticas 1 con copias adicionales de la molécula de DNA 5a estarán presentes en las superficies de otros campos sensores del biochip o intercaladas. Repitiendo los pasos del proceso recién mencionados pueden moverse otras muestras de la molécula de DNA 5a hacia la superficie 201 del campo sensor 103a. A la temperatura T_2 y con el campo magnético desconectado, las perlas magnéticas y las moléculas de DNA 5a y 5b, que todavía no están inmovilizadas sobre un campo sensor, estarán de nuevo en solución con un volumen V_1 . Bajando de nuevo la temperatura hasta la temperatura T_1 que, como antes, es inferior a las temperaturas de fusión de los híbridos de molécula de DNA 5a y oligonucleótido 3a, las moléculas de DNA 5a y 5b, que están libres en solución, se inmovilizarán de nuevo sobre las perlas magnéticas 1. Este proceso es eficaz, porque se ha añadido una gran concentración de perlas magnéticas 1 y por ello está disponible un número suficiente de reactivos de hibridación para las moléculas de DNA 5a y 5b. La probabilidad de que las moléculas de DNA 5a y 5b encuentren un reactivo de hibridación es poco tiempo es suficientemente elevada. Cuando se activa de nuevo la aplicación del campo magnético, este mueve de nuevo las perlas magnéticas 1 con las moléculas de DNA 5a y 5b inmovilizadas de nuevo sobre ellas, hacia la superficie del biochip, en la que se concentran en un volumen netamente menor V_2 , correspondiendo en lo sustancial a la situación de la figura 4.

En la figura 8 se representa esta situación. La molécula de DNA 5a, que se ha transportado a la superficie 201 del campo sensor 103a en el proceso previo, continúa estando unida a uno de los oligonucleótidos 203 y por lo tanto inmovilizada en la superficie 201. Sobre la perla magnética 1, una molécula de DNA 5a', que es idéntica a la molécula de DNA 5a, está ahora unida de nuevo con el oligonucleótido 3a y ahora puede hibridarse con otro de los

oligonucleótidos 203. Al igual que en el primer ciclo del proceso, este proceso es eficaz porque la molécula de DNA 5a' está concentrada junto a la superficie 201.

Después de la hibridación de la molécula de DNA 5a' con el oligonucleótido 203, la temperatura se eleva de nuevo hasta una temperatura T_2 superior a la temperatura de fusión de los híbridos de la molécula de DNA 5a' y el oligonucleótido 3a, y como resultado de ello las perlas magnéticas se separan de la molécula de DNA 5a. Esto se representa en la figura 9. El proceso descrito puede repetirse las veces que se desee, de modo que la concentración de las moléculas de DNA 5a y 5b en las correspondientes superficies de sensor se lleva a cabo con eficacia. También es posible, en la situación de la figura 5, que la molécula de DNA 5a se hibride con el oligonucleótido 203 antes de que la molécula de DNA 5a se separe de la perla magnética 1. Esto se representa en la figura 10. La elevación de la temperatura hasta la temperatura T_2 produce la misma situación que en la figura 7. Los híbridos de la molécula de DNA 5a y el oligonucleótido 3a se funden, mientras que el híbrido de la molécula de DNA 5a y el oligonucleótido 203 es estable. Un proceso de este tipo consta de los pasos siguientes:

- unir por lo menos una porción de las moléculas de ácido nucleico con las moléculas de captura,
- proporcionar un material de soporte, que puede fijarse de modo específico a las moléculas de ácido nucleico a detectar para generar complejos, que contienen dicho material soporte y dichas moléculas de ácido nucleico,
- incubar el material soporte con la muestra y formar los complejos,
- mover los complejos hacia la superficie y
- unir por lo menos una parte de los complejos con las moléculas de captura.

En el proceso descrito con referencia a las figuras de 1 a 10 se emplean perlas magnéticas 1 con en cada caso oligonucleótidos diferentes 3a, 3b y 3c en la superficie. Esto tiene la ventaja de que solo se tiene que emplear una especie de perlas magnéticas 1, pero al mismo tiempo todavía es posible llevar a cabo un proceso multiplex. En una forma de ejecución ilustrativa alternativa es posible inmovilizar en cada caso una especie de oligonucleótidos 3a, 3b o 3c para un solo reactivo de unión (molécula de DNA 5a o 5b) en la perla magnética 1, con lo cual se generan diferentes especies de perlas magnéticas 1. Esto se requiere en primer lugar si solo se tiene que detectar una especie de moléculas de DNA. No obstante, también en este caso el proceso puede llevarse a la práctica añadiendo diferentes especies de perlas magnéticas 1 que en su superficie tengan en cada caso un tipo de oligonucleótido 3a, 3b o 3c. De este modo es posible, por ejemplo, guardar existencias de una gran multiplicidad de varios tipos de perlas magnéticas 1 que en cada caso están recubiertos con un tipo de oligonucleótidos, 3a, 3b o 3c, y mezclarlos en una mezcla reaccionante en función de las moléculas de DNA a detectar, 5a o 5b.

En la figura 11 se representa una forma de ejecución ilustrativa alternativa (no acorde con la presente invención). Se representan dos perlas magnéticas, 501a y 501b, que en cada caso llevan una especie de oligonucleótidos 3a y 3b. El oligonucleótido 3a está dirigido a una molécula de DNA 5a, que está presente en la solución. El oligonucleótido 3b está dirigido a una molécula de DNA, que no está presente en la solución. Además, otros oligonucleótidos 503a y 503b están inmovilizados en las superficies de las perlas magnéticas 501a y 501b. En la figura 13 se ilustra la función de los oligonucleótidos 503a y 503b.

En la figura 12 se representa la situación después de que las perlas magnéticas 501a y 501b se hayan incubado con la solución que contienen las moléculas de DNA 5a presentes. Se han formado los híbridos de las moléculas de DNA 5a y el oligonucleótido 3a. Debido a la ausencia del reactivo de unión de los oligonucleótidos en cuestión, no se produce la hibridación en la perla magnética 501b.

A continuación se mueven las perlas magnéticas 501a y 501b por acción de un campo magnético hasta una superficie de un biochip y se mantienen allí. Esto se representa en la figura 13. El biochip 505 contiene dos campos sensores, 507a y 507b. En el campo sensor 507a se inmoviliza un oligonucleótido 509a que tiene una secuencia de ácido nucleico que es parcialmente complementaria del oligonucleótido 503a. De igual manera se inmoviliza en el campo sensor 507b un oligonucleótido 509b que tiene una secuencia de ácido nucleico que es parcialmente complementaria del oligonucleótido 503b. De manera similar al proceso descrito en párrafos anteriores, la concentración de las perlas magnéticas 501a y 501b y por lo tanto de los oligonucleótidos 503a y 503b da apoyo a la hibridación de dichos oligonucleótidos 503a y 503b con los oligonucleótidos 509a y 509b en los campos sensores 507a y 507b. Después de un período suficiente de incubación, se interrumpe la aplicación del campo magnético con el fin de separar o retirar de la superficie las perlas magnéticas no inmovilizadas 501a y 501b. De ello resulta que las moléculas de DNA marcadas 5a están unidos simplemente por inmovilización mediante el híbrido de oligonucleótidos 503a y 509a por encima del campo sensor 507a. Por lo tanto se descarta la inmovilización solamente por el campo magnético sobre el sensor 507b. Después puede detectarse la molécula de DNA 5a mediante el marcador 511 ubicado en el sitio del campo sensor 507a mediante procesos de detección ya conocidos. La asignación de la molécula de DNA 5a al campo sensor 507a es inequívoca mediante la unión específica de la molécula de DNA 5a con el oligonucleótido 3a de la perla magnética 501a y la hibridación de la misma a través del oligonucleótido 503a con el oligonucleótido 509a en el campo sensor 507a. Esto requiere la remoción o separación de la especie no inmovilizada de las perlas magnéticas 501a y 501b en las superficies sensoras. Debido a que la muestra facilitada no contiene un reactivo de unión para el oligonucleótido 3b, no se detectará la molécula de DNA en el campo sensor 507b y el ensayo será por consiguiente negativo.

De manera similar a la forma de ejecución ilustrativa mencionada previamente, este proceso puede repetirse también de modo cíclico, con lo cual se permite que más especies de la perla magnética 501a puedan ocupar posiciones contiguas a la superficie sensora 507a e inmovilizarse sobre ella. Esto contribuye a incrementar la eficacia de la concentración, en particular cuando están presentes pocas copias de la molécula de DNA 5a.

El proceso descrito puede aplicarse de modo universal porque la inmovilización de las perlas magnéticas 501a y 501b es inespecífica con respecto a la molécula de DNA a detectar, 5a. La especificidad de la detección se logra simplemente formando las perlas magnéticas 501a y 501b y los oligonucleótidos 3a y 3b inmovilizados sobre ellas. El correspondiente biochip 505 con los diferentes campos sensores 507a y 507b es, pues, adecuado para detectar cualquier tipo de moléculas de DNA. La detección requiere simplemente perlas magnéticas de diseños diferentes, que puedan unirse a la molécula de DNA a detectar.

Las formas de ejecución ilustrativas descritas se han limitado a título de ejemplo a la detección de una molécula de DNA. Sin embargo pueden emplearse de manera similar para cualquier molécula de ácido nucleico o para cualquier otra biomolécula que pueda unirse de modo específico. Por lo tanto es posible igualmente inmovilizar anticuerpos dirigidos contra proteínas presentes en la muestra para la detección en las perlas magnéticas de los procesos descritos. Las perlas magnéticas pueden inmovilizarse por tanto en este caso opcionalmente mediante las proteínas propiamente dichas (forma de ejecución ilustrativa 1) o mediante otra proteína con anticuerpo o incluso un ácido nucleico (forma de ejecución ilustrativa 2).

REIVINDICACIONES

1. Un proceso de concentración de moléculas de ácido nucleico (5a, 5b), en una superficie (201) de un campo sensor (103a) de un biochip, el proceso consta de los pasos siguientes:

(a) proporcionar perlas magnéticas (1), con moléculas de transferencia (3a, 3b, 3c) inmovilizadas sobre ellas, que son capaces de hibridarse con una porción de las moléculas de ácido nucleico (5a, 5b), con lo cual forman complejos que contienen dichas perlas magnéticas (1), dichas moléculas de transferencia (3a, 3b, 3c) y dichas moléculas de ácido nucleico;

proporcionar una superficie (201) de un campo sensor (103a, 103b, 103c), que constituye una parte de una superficie (101) de un biochip, dichas moléculas de captura (203) se inmovilizan sobre dicha superficie (201), dichas moléculas de captura (203) se hibridan de modo específico con una porción de las moléculas de ácido nucleico (5a, 5b), en el que las secuencias de ácido nucleico de las moléculas de captura (203) y las moléculas de transferencia (3a, 3b, 3c) se eligen de tal manera que la temperatura de fusión del híbrido entre una molécula de ácido nucleico (5a, 5b) y una molécula de transferencia (3a, 3b, 3c) sea inferior a la temperatura de fusión del híbrido entre una molécula de ácido nucleico (5a, 5b) y una molécula de captura (203); y proporcionar un generador de campo magnético (105);

(b) incubar las perlas magnéticas (1) con las moléculas de ácido nucleico (5a, 5b), a una temperatura T1 que es inferior a la temperatura de fusión de los híbridos entre las moléculas de ácido nucleico (5a, 5b) y las moléculas de transferencia (3a, 3b), permitiendo de este modo que las moléculas de ácido nucleico (5a, 5b) se hibriden con las moléculas de transferencia (3a, 3b);

(c) aplicar un campo magnético con el generador de campo magnético (105), con lo cual se mueven las moléculas de ácido nucleico (5a, 5b) unidas a las perlas magnéticas (1) a través del campo magnético hacia la superficie (101) del biochip, con lo cual se ponen en contacto las moléculas de ácido nucleico (5a, 5b) unidas a las perlas magnéticas (1) con una superficie (201) del campo sensor (103a, 103b);

(d) aumentar la temperatura desde una temperatura T1 a una temperatura T2, que es superior a la temperatura de fusión de los híbridos de las moléculas de ácido nucleico (5a, 5b) y las moléculas de transferencia (3a, 3b) y que es inferior a la temperatura de fusión de los híbridos de las moléculas de ácido nucleico (5a, 5b) y las moléculas de captura (203), con lo cual se disuelven o separan las moléculas de ácido nucleico (5a) de las perlas magnéticas (1) y se permite la unión de por lo menos una porción de la molécula de ácido nucleico (5a, 5b) con la molécula de captura (203);

(e) mover las perlas magnéticas (1) para separarlas de la superficie (101) del biochip por interrupción de la aplicación del campo magnético;

(f) repetir los pasos de (b) a (e).

2. El proceso según la reivindicación 1, en el que se proporcionan diferentes especies de perlas magnéticas (1), cada perla magnética tiene una molécula de transferencia específica (3a, 3b, 3c) inmovilizada sobre ella, que es capaz de unirse a una molécula específica de ácido nucleico (5a, 5b) a detectar.

FIG 1

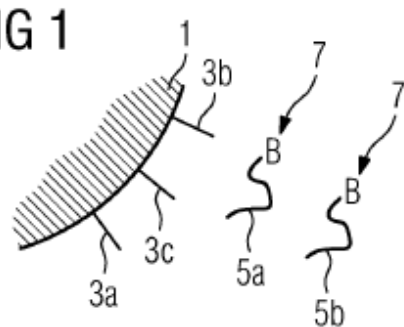


FIG 2

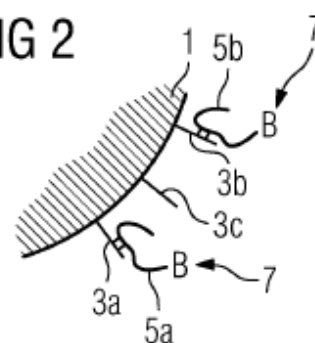


FIG 3

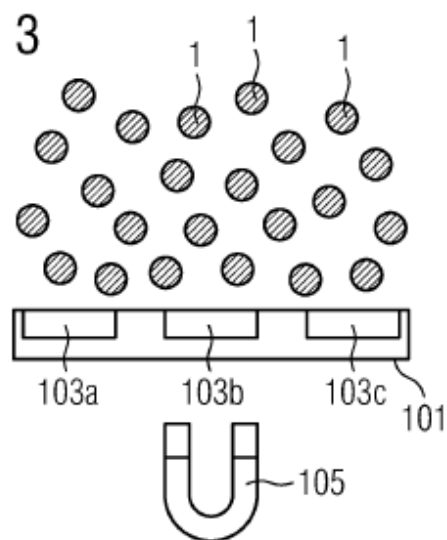


FIG 4

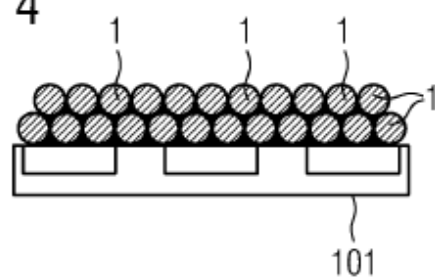


FIG 5

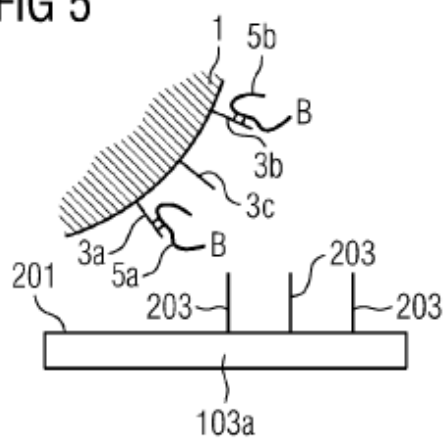


FIG 6

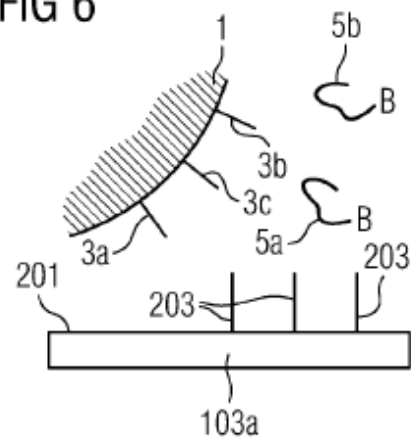


FIG 7

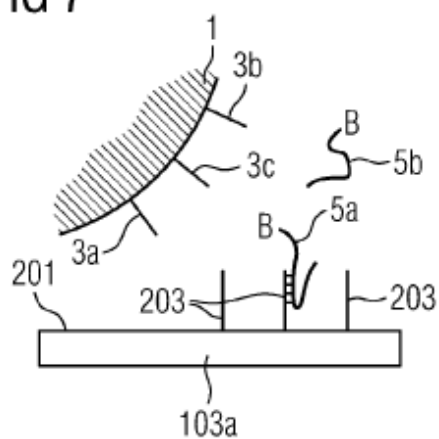


FIG 8

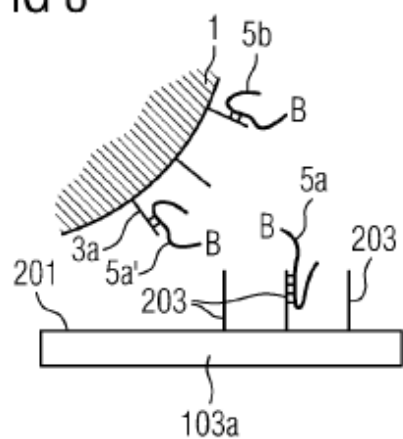


FIG 9

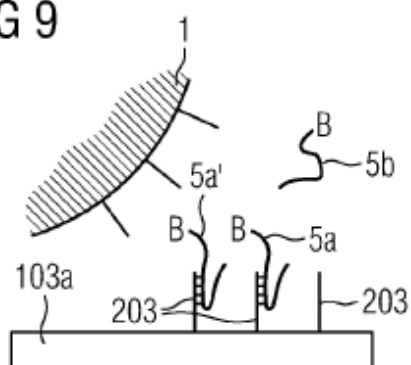


FIG 10

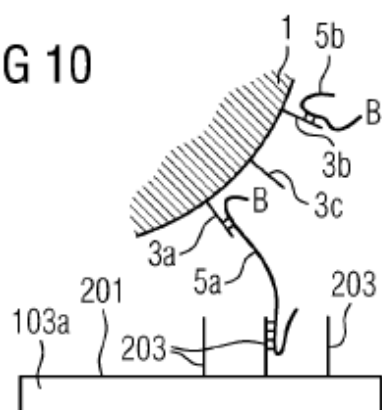


FIG 11

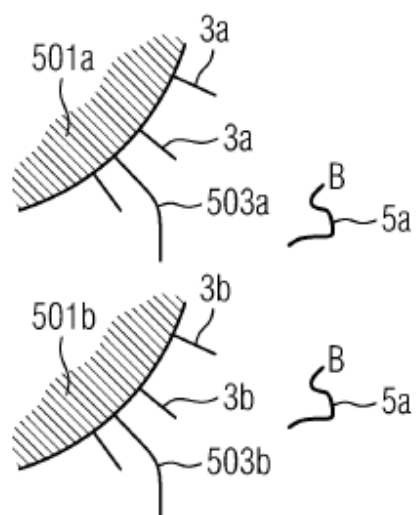


FIG 12

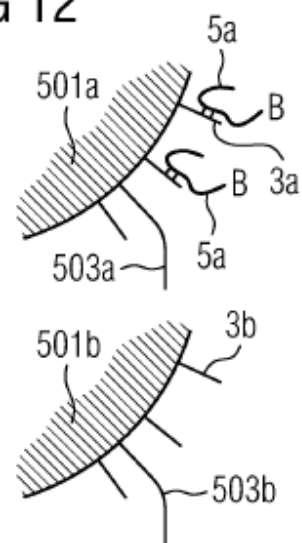


FIG 13

