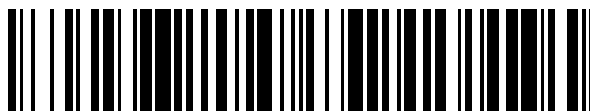


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 363**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6813 (2008.01)

C12Q 1/6834 (2008.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.05.2013 PCT/US2013/043295**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2013 WO13181356**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2013 E 13796774 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 2856167**

54 Título: **Detección instantánea de biomarcadores y usos de los mismos**

30 Prioridad:

30.05.2012 US 201261652918 P

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

02.11.2018

73 Titular/es:

**LI, ZHONG (100.0%)
7 Wordsworth Road
Short Hills, NJ 07078, US**

72 Inventor/es:

LI, ZHONG

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 688 363 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

Detección instantánea de biomarcadores y usos de los mismos

Referencia cruzada a solicitud relacionada

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense n.º 61/652.918, presentada el 30 de mayo de 2012.

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a métodos para la detección instantánea de biomarcadores y a usos de los mismos.

Antecedentes de la invención

10 La detección de biomarcadores (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico, moléculas de aminoácido o células) mediante el uso de sondas (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico complementario o anticuerpos) que tienen alta afinidad de unión con los biomarcadores se ha usado de manera rutinaria en laboratorios de investigación biomédica y en diagnóstico clínico. Habitualmente requieren un tiempo de incubación bastante prolongado para la unión y largos protocolos para garantizar sensibilidad y especificidad suficientes para la detección.

15 Las velocidades de hibridación y deshibridación promedio de pares de bases individuales en una formación de ADN dúplex son del orden de un milisegundo. Sin embargo, una etapa limitante de la velocidad es cuando dos oligonucleótidos complementarios chocan entre sí e inician el proceso de apareamiento de bases. Los oligonucleótidos unidos a superficie también se comportan de manera diferente que los oligonucleótidos en una disolución. Una extensa bibliografía ha demostrado que la hibridación que se produce en la superficie de contacto
20 entre un sólido y una disolución (es decir, la hibridación basada en superficie) muestra sustancialmente cinéticas de hibridación diferentes a las observadas en disoluciones a granel. La hibridación basada en superficie puede producirse por medio de cualquiera de dos mecanismos: hibridación directa a partir de la fase a granel (es decir, difusión 3D) o hibridación después de una etapa de adsorción no específica inicial seguida por difusión de superficie posterior a la sonda (es decir, difusión 2D). El modelado apoyado por datos experimentales ha demostrado que el
25 mecanismo de dos etapas que implica difusión 2D es varias magnitudes más rápido que el mecanismo de hibridación directa con una densidad de diana y una concentración de sonda apropiadas. En los mecanismos de dos etapas, la etapa de difusión en superficie, que sigue el modelo de Langmuir de segundo orden, es una etapa limitante de la velocidad para la hibridación eficaz, puesto que la adsorción inicial se completa normalmente en milisegundos.

30 Se han usado agentes paramagnéticos para etiquetar biomoléculas para concentrar las biomoléculas etiquetadas cuando se aplica un campo magnético. Sin embargo, los agentes paramagnéticos son mucho más grandes que las sondas de ADN, lo que limita la accesibilidad de la sonda de ADN etiquetada a las moléculas de ADN diana y satura la superficie para la hibridación. La solicitud de patente internacional n.º PCT/US00/14969 (publicada como WO 00/73506) da a conocer que el uso de una sonda unida a partículas superparamagnéticas que tienen un diámetro de
35 aproximadamente 1-10 nanómetros reduce el tiempo de hibridación desde días hasta minutos.

El documento US2009/170212 da a conocer sistemas y métodos para detectar moléculas en una muestra usando partículas magnéticas así como cartuchos desechables para su uso con tales sistemas y sistemas y métodos para mover tales partículas magnéticas.

Sigue existiendo la necesidad de métodos fiables y sensibles para detectar biomarcadores de manera instantánea.

40 **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para detectar de manera instantánea un biomarcador inmovilizado a una superficie sólida.

Se proporciona un método para detectar de manera instantánea un biomarcador inmovilizado a una superficie sólida. El método comprende:

- 45 (a) exponer el biomarcador a una sonda que tiene una etiqueta magnética en una disolución;
- (b) aplicar un campo magnético a la disolución, con lo que la sonda se mueve hacia y a través de la superficie sólida y forma un complejo con el biomarcador sobre la superficie sólida;
- (c) retirar el campo magnético;
- (d) eliminar la disolución de la superficie sólida; y
- 50 (e) detectar el complejo no más de 1 minuto después de exponer el biomarcador a la sonda, en el que la presencia

del complejo sobre la superficie sólida indica la presencia del biomarcador,

en el que dicho método no implica lavar el complejo antes de dicha detección.

5 El biomarcador puede comprender un polinucleótido diana que tiene una primera secuencia de nucleótidos, y la sonda puede ser una sonda de polinucleótido que comprende una segunda secuencia de nucleótidos, que es complementaria con la primera secuencia de nucleótidos. El complejo puede comprender un híbrido del polinucleótido diana y la sonda de polinucleótido.

El polinucleótido diana puede ser un ARN o ADN monocatenario, preferiblemente ADN. El polinucleótido diana puede comprender 8-50 nucleótidos.

10 El biomarcador puede comprender un polipéptido diana, y la sonda puede ser una sonda de polipéptido que se une específicamente al polipéptido diana. La sonda de polipéptido puede ser un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido diana.

La sonda puede unirse a una partícula que comprende un material magnético. La partícula puede tener un diámetro de aproximadamente 1 μm . La sonda puede unirse a la partícula por medio de un ligador. La sonda puede estar biotinizada, y la partícula puede ser una perla superparamagnética recubierta con estreptavidina.

15 El campo magnético puede aplicarse horizontal o verticalmente a través de la superficie sólida, o de forma uniforme sobre la superficie sólida. Preferiblemente, el campo magnético se aplica horizontalmente a través de la superficie sólida. El campo magnético puede aplicarse durante no más de 5 segundos.

El complejo puede detectarse visualmente. El biomarcador puede detectarse no más de 5 segundos después de exponer el biomarcador a la sonda.

20 El biomarcador puede obtenerse de una muestra biológica. El biomarcador puede estar sobre un producto, que puede ser un producto farmacéutico. El producto farmacéutico puede ser un fármaco. El método de detección instantánea de la presente invención puede comprender además la autenticación del producto, en el que la presencia del biomarcador sobre el producto indica que el producto es auténtico.

Breve descripción de los dibujos

25 La figura 1 muestra una matriz de manchas representada por círculos rellenos y sin rellenar. Las manchas en cada columna contienen el mismo oligonucleótido diana T1, T2, T3 o T4 tal como se indica en la parte superior de cada columna. Mientras que un círculo relleno representa la presencia del oligonucleótido diana, un círculo sin rellenar representa la ausencia del oligonucleótido diana correspondiente. La presencia o ausencia de los oligonucleótidos diana en cada fila de las manchas constituye un código indicado a la derecha de la fila.

30 La figura 2 es un diagrama esquemático que ilustra el movimiento de una disolución de hibridación que comprende sondas etiquetadas magnéticamente en un canal conectado con una cámara que comprende un marcador EZTag que tiene una matriz de manchas que contienen cada una un oligonucleótido diana, en respuesta a un campo magnético creado por un imán para la hibridación de ADN. Etapa 1: el imán se coloca lejos de la cámara y la disolución de hibridación está lejos de la cámara; etapa 2: la disolución de hibridación fluye hacia el marcador EZTag y llena la cámara; etapa 3: el imán se coloca bajo la cámara, y los oligonucleótidos diana en el marcador EZTag se exponen a las sondas en la disolución de hibridación de manera que se produce la hibridación de ADN; etapa 4: el imán se aleja de la cámara; etapa 5: la disolución de hibridación fluye lejos de la cámara, dejando sólo sondas magnéticas unidas a los oligonucleótidos diana en el marcador EZTag.

40 La figura 3 es un diagrama esquemático que ilustra el movimiento de fluido de una disolución de hibridación y una disolución de separación en respuesta a un campo magnético creado por un imán en un dispositivo microfluídico durante un ciclo de 5 etapas. El dispositivo microfluídico comprende dos canales que están alineados horizontalmente y están conectados con una cámara que comprende un marcador EZTag que tiene una matriz de manchas que contienen cada una un oligonucleótido diana, un canal a la izquierda y el otro canal a la derecha de la cámara. Etapa 1: el imán se coloca lejos de la cámara y los canales. La disolución de hibridación se sitúa en el canal izquierdo y la disolución de separación se sitúa en el canal derecho, ambos lejos de la cámara; etapa 2: el imán se mueve hacia y finalmente debajo de la cámara. La disolución de hibridación fluye hacia el marcador EZTag y llena la cámara mientras que la disolución de separación fluye lejos del marcador EZTag; etapa 3: el imán se aleja de la cámara. La disolución de hibridación fluye lejos de la cámara, dejando sólo sondas magnéticas unidas a los oligonucleótidos diana en el marcador EZTag en la cámara. La disolución de separación fluye más cerca de la cámara; etapa 4: el imán se mueve adicionalmente lejos de la cámara. La disolución de separación fluye y llena la cámara. La disolución de hibridación fluye adicionalmente lejos de la cámara; etapa 5: el imán se mueve hacia la cámara hacia donde está en la etapa 1. La disolución de separación fluye de nuevo hacia donde está en la etapa 1. La disolución de hibridación fluye de nuevo hacia donde está en la etapa 1.

55 La figura 4 muestra una matriz de 34 sensores de magnetorresistencia gigante (GMR) en un módulo de detección de señales magnéticas, que incluye una matriz de 4x8 sensores de GMR que coincide con la matriz de manchas de

oligonucleótido diana en un marcador EZTag en la figura 1, y dos sensores de referencia.

Descripción detallada de la invención

5 La presente invención se refiere a un método novedoso para detectar de manera instantánea un biomarcador inmovilizado a una superficie sólida, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas. Una sonda etiquetada magnéticamente se usa para formar un complejo con el biomarcador de manera instantánea en presencia de un campo magnético. El presente método no implica amplificación del biomarcador ni lavado del complejo antes de detectar el complejo del biomarcador y la sonda.

10 La presente invención proporciona un método para detectar un biomarcador tal como se define en las reivindicaciones adjuntas. El biomarcador se inmoviliza a una superficie sólida. El método comprende exponer el biomarcador a una sonda que tiene una etiqueta magnética en una disolución; aplicar un campo magnético a la disolución, con lo que se forma un complejo del biomarcador y la sonda sobre la superficie sólida; retirar el campo magnético; eliminar la disolución de la superficie sólida; y detectar el complejo de manera instantánea. La presencia del complejo sobre la superficie sólida indica la presencia del biomarcador.

15 El término "biomarcador" tal como se usa en el presente documento se refiere a un material que se produce de manera natural o artificial fabricado por el hombre, por ejemplo, de manera recombinante o química, que comprende una molécula biológica, un compuesto químico, una célula o un tejido diana. Los ejemplos de biomarcadores incluyen polinucleótidos, polipéptidos, polisacáridos, anticuerpos, anticuerpos monoclonales, receptores de la membrana celular, cofactores, azúcares, lectinas, células, membrana celular y fármacos. El biomarcador puede comprender uno o más polinucleótidos diana o uno o más polipéptidos diana.

20 El biomarcador puede aislarse de una muestra. La muestra puede ser una muestra biológica o una muestra del entorno. Una muestra biológica se obtiene de una fuente biológica, por ejemplo, un organismo tal como un microorganismo, animal o planta, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano. Los ejemplos de muestras biológicas incluyen sangre, suero, líquido ascítico, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, líquido sinovial, líquido pleural, saliva, esputo, heces, orina, semen, tejido, biopsias, muestras obtenidas con hisopos y similares de fuentes humanas y no humanas. Una muestra del entorno se obtiene a partir de una fuente del entorno tal como aire, agua, suelo y entornos expuestos a situaciones extremas de condiciones (por ejemplo, de temperatura o presión). Las muestras del entorno pueden incluir muestras de procedimientos industriales. El biomarcador también puede estar presente como un marcador de identificación o autenticación en un producto, por ejemplo, un producto biológico o farmacéutico, u otros productos comerciales tales como prendas de vestir, bolsos, zapatos y automóviles.

35 El término "polinucleótido" tal como se usa en el presente documento se refiere a un polímero de nucleótidos de cualquier longitud. Un polinucleótido puede ser un oligonucleótido que tiene menos de 100 nucleótidos. El polinucleótido puede ser de cualquier tipo de ARN, ADNc, ADN monocatenario, o una combinación o derivado de los mismos. El polinucleótido puede ser un ácido nucleico peptídico (PNA). El polinucleótido puede ser lineal o circular, preferiblemente lineal. Un ADN bicatenario puede convertirse en un ADN monocatenario para su uso en el método de detección según la presente invención. Un polinucleótido puede tener aproximadamente 5-1000, 5-100, 5-50, 8-50, 10-40, 20-40 u 8-25 nucleótidos, por ejemplo, aproximadamente 8, 24 ó 50 nucleótidos.

40 El término "complementario" tal como se usa en el presente documento se refiere a la capacidad de dos polinucleótidos monocatenarios, o bien dos cadenas de ADN o una cadena de ADN y una cadena de ARN, para formar un dúplex bicatenario que tiene, por ejemplo, al menos aproximadamente el 80%, el 90%, el 95% o el 99%, preferiblemente al menos aproximadamente el 90%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 95%, lo más preferiblemente aproximadamente el 100%, de bases de purina y bases de pirimidina correspondientes. Dos polinucleótidos complementarios pueden tener menos de aproximadamente 5, 4, 3, 2 ó 1 apareamientos erróneos de bases.

45 El término "hibridación" tal como se usa en el presente documento se refiere al proceso en el que dos polinucleótidos complementarios monocatenarios se unen de manera no covalente para formar un polinucleótido bicatenario estable, también conocido como híbrido. Los dos polinucleótidos monocatenarios pueden ser complementarios entre sí perfectamente, es decir, tener un 100% de bases correspondientes, o parcialmente o con menos del 100% de bases correspondientes, por ejemplo, tener al menos aproximadamente el 80%, el 90%, el 95% o el 99% de bases correspondientes. El grado de hibridación es la proporción de polinucleótidos monocatenarios que forman híbridos estables, que puede ser de al menos aproximadamente el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95% o el 99%, preferiblemente de al menos aproximadamente el 90%, más preferiblemente de al menos aproximadamente el 95%. Las condiciones de hibridación pueden elegirse por el profesional experto para proporcionar un grado deseado de hibridación específica de secuencia. En diversas realizaciones, pueden permitirse uno o más apareamientos erróneos de bases, o puede requerirse una complementariedad perfecta. En el método de detección de la presente invención, el grado de hibridación es la proporción de polinucleótidos diana que forman híbridos estables con la sonda de polinucleótidos, que puede ser de al menos aproximadamente el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95% o el 99%, preferiblemente al menos aproximadamente el 90%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 95%.

Un nucleótido puede sintetizarse o modificarse a partir de un nucleótido que se produce de manera natural, por ejemplo, un nucleótido metilado o un análogo de nucleótido. Un nucleótido modificado puede tener suficientes características estructurales en común con un nucleótido que se produce de manera natural de manera que, cuando se incorpora en una secuencia de polinucleótidos, permite la hibridación con una secuencia de nucleótidos que se produce de manera natural en disolución. Uno o más nucleótidos en un polinucleótido pueden modificarse para estabilizar o desestabilizar la formación del híbrido o para potenciar la especificidad de la hibridación con un polinucleótido complementario según se desee.

El término “especificidad de hibridación” tal como se usa en el presente documento se refiere al grado de bases correspondientes en un híbrido. La especificación de hibridación en el método de detección de la presente invención puede tener al menos aproximadamente el 80%, el 90%, el 95%, el 99% o el 100% de bases correspondientes, preferiblemente al menos aproximadamente el 90%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 95%, de la manera más preferible aproximadamente el 100% de bases correspondientes, en el híbrido del polinucleótido diana y la sonda de polinucleótido.

Los términos “polipéptido” y “proteína” se usan en el presente documento de manera intercambiable, y se refieren a un polímero de aminoácidos de cualquier longitud. El polipéptido puede tener aproximadamente 5-1000, 10-100, 10-50, 10-40 ó 10-20 aminoácidos. Un aminoácido puede modificarse con respecto a un aminoácido que se produce de manera natural, por ejemplo, mediante glicosilación o fosforilación. En algunas realizaciones, uno o más aminoácidos en el polipéptido diana pueden modificarse para estabilizar o desestabilizar la formación del complejo de unión entre el polipéptido diana y la sonda de polipéptido, o para potenciar la especificidad de unión con la sonda de polipéptido.

La superficie sólida puede ser cualquier superficie sólida adecuada para la unión del biomarcador. La superficie sólida puede obtenerse a partir de uno o más materiales seleccionados del grupo que consiste en polímeros, plásticos, resinas, polisacáridos, sílice o materiales basados en sílice, carbono, metales, vidrios inorgánicos y membranas. La superficie sólida puede ser plana o curvada. La superficie sólida puede separarse en diferentes regiones, por ejemplo, pocillos. La superficie sólida también puede estar en forma de perlas, resinas, geles, microesferas u otras configuraciones geométricas.

El biomarcador puede unirse a la superficie sólida directamente por medio de un enlace covalente o no covalente, preferiblemente un enlace covalente. El biomarcador también puede unirse a la superficie sólida indirectamente, por ejemplo, por medio de un ligador, que puede ser escindible. Por ejemplo, el ligador puede seleccionarse del grupo que consiste en biotina-estreptavidina, Acrydite-SH, COOH-NH₂, NH₂-COOH, OH-BrCN, enlace disulfuro, hidrazida-ligando con hidrato de carbono oxidado, proteína A-anticuerpo tal como IgG, anti-IgG de ratón-IgG de ratón y moléculas de conjugación escindibles.

El término “sonda” tal como se usa en el presente documento se refiere a un agente que puede unirse a un biomarcador específicamente. Cuando el biomarcador comprende un polinucleótido diana, la sonda puede ser una sonda de polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria con la secuencia de nucleótidos del polinucleótido diana, y puede formarse un híbrido del polinucleótido diana y la sonda de polinucleótido sobre la superficie sólida. La sonda de polinucleótido puede ser un oligonucleótido que tiene aproximadamente 5-100, 5-50 ó 10-25 nucleótidos, y puede ser lineal o circular, preferiblemente lineal.

Cuando el biomarcador comprende un polipéptido diana, la sonda puede ser una sonda de polipéptido que se une específicamente al polipéptido diana. La sonda de polipéptido puede comprender aproximadamente 5-1000, 10-100, 10-50, 10-40 ó 10-20 aminoácidos. La sonda puede ser un anticuerpo o un fragmento variable de cadena sencilla que se une específicamente al polipéptido diana. El término “anticuerpo” tal como se usa en el presente documento incluye anticuerpos completos, fragmentos de unión a antígeno (o partes de unión a antígeno) y cadenas sencillas de los mismos. Un anticuerpo completo se refiere a una glicoproteína que tiene normalmente dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, e incluye una parte de unión a antígeno. El término “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo tal como se usa en el presente documento se refiere a uno o más fragmentos del anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. El término “fragmento variable de cadena sencilla” de un anticuerpo tal como se usa en el presente documento se refiere a una proteína de fusión de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo, conectada con un péptido ligador corto, por ejemplo, de aproximadamente 20-25 aminoácidos, que conserva la capacidad de unirse específicamente a un antígeno.

El término “etiqueta magnética” tal como se usa en el presente documento se refiere a un resto unido a la sonda, directa o indirectamente, que puede mover la sonda en respuesta a un campo magnético. La etiqueta magnética puede ser una partícula (por ejemplo, perla) que comprende un material magnético, y puede ser magnética, paramagnética, superparamagnética, ferromagnética o diamagnética. La partícula puede estar compuesta por cualquier material inerte conocido en la técnica, por ejemplo, plástico, metal, vidrio y cerámica, y puede tener cualquier forma, preferiblemente redonda. La partícula magnética puede tener un diámetro que oscila entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 100 μm , desde aproximadamente 500 nm hasta aproximadamente 10 μm , desde aproximadamente 750 nm hasta aproximadamente 5 μm , o desde aproximadamente 900 nm hasta aproximadamente 2 μm , preferiblemente aproximadamente 1 μm .

La sonda puede unirse a una partícula magnética por medio de un ligador. El ligador puede ser cualquier material que puede unirse a la sonda específicamente, pero no al biomarcador, por ejemplo, una sonda de captura, biotina-estreptavidina, Acrydite-SH, COOH-NH₂, NH₂-COOH, OH-BrCN, enlace disulfuro, hidrazida-ligando con hidrato de carbono oxidado, proteína A-anticuerpo tal como IgG, anti-IgG de ratón-IgG de ratón o molécula de conjugación escindible. Una sonda de captura puede ser un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria con al menos una parte de la secuencia de nucleótidos de la sonda de polinucleótido, y que puede formar un híbrido con la sonda de polinucleótido sobre la superficie de la partícula magnética. La parte de la sonda de polinucleótido que no se hibrida con la sonda de captura puede hibridarse con el polinucleótido diana. En una realización, la sonda puede estar biotilada, y la partícula magnética puede ser una perla superparamagnética recubierta con estreptavidina (por ejemplo, perlas MyOne de Life Technologies, o perlas ProMag de Bangs Lab).

El biomarcador puede exponerse a la sonda poco antes de o simultáneamente con la aplicación del campo magnético. Por ejemplo, la exposición puede durar no más de aproximadamente 30, 20, 10, 5, 3, 1, 0,5 ó 0,1 segundos, preferiblemente no más de aproximadamente 5 segundos, más preferiblemente no más de aproximadamente 1 segundo, antes de aplicar el campo magnético. Puede añadirse una disolución que comprende la sonda marcada magnéticamente a la superficie sólida a la que está inmovilizado el biomarcador. La disolución se formula preferiblemente de manera adecuada para la hibridación de un polinucleótido diana con una sonda de polinucleótido o para la unión específica de un polipéptido diana con una sonda de polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo).

Se aplica un campo magnético a la disolución para acelerar la formación de un complejo del biomarcador y la sonda. El campo magnético puede ser de cualquier tipo y puede crearse a través de un mecanismo electromagnético, usando un imán u otras técnicas convencionales conocidas en la técnica. El campo magnético puede aplicarse a la superficie sólida, o bien en un mecanismo de barrido a través de la superficie horizontal o verticalmente, o de manera uniforme a lo largo de toda la superficie. Preferiblemente, el campo magnético puede aplicarse horizontalmente. La aplicación de un campo magnético hace que la sonda se mueva hacia y a través de la superficie sólida hasta encontrarse con el biomarcador inmovilizado a la superficie sólida. El campo magnético puede aplicarse durante un periodo de tiempo suficiente para que el biomarcador y la sonda formen un complejo, por ejemplo, no más de aproximadamente 1 minuto, o 30, 10, 5, 1, 0,5 ó 0,1 segundos, preferiblemente no más de aproximadamente 1 segundo.

Después de que el campo magnético se retira o se inactiva, permanecen sondas que no han formado complejo con los biomarcadores en la disolución, que se elimina posteriormente. En una realización, sondas de oligonucleótido etiquetadas magnéticamente en una disolución de hibridación pueden llevarse en contacto con oligonucleótidos diana inmovilizados a un marcador EZTag para la hibridación. Un imán de neodimio puede moverse horizontalmente por debajo del marcador EZTag para facilitar la hibridación de los oligonucleótidos diana y las sondas de oligonucleótido en el marcador EZTag, y entonces alejarse del marcador EZTag después de la hibridación. La disolución de hibridación que comprende sondas de oligonucleótido etiquetadas magnéticamente no hibridadas con los oligonucleótidos diana (es decir, las sondas de oligonucleótido etiquetadas magnéticamente no unidas) se elimina entonces del marcador EZTag (figura 2).

En otro aspecto de la divulgación que no forma parte de la invención, puede llevarse a cabo detección de oligonucleótidos diana en un dispositivo microfluídico (figura 3). El dispositivo microfluídico puede comprender una cámara y dos canales. El dispositivo puede comprender adicionalmente un controlador de motor, un micromotor, una luz LED, una bomba de jeringa, un imán y engranajes asociados, dos pequeños depósitos para disoluciones, cuatro fragmentos de tubo y un alojamiento de plástico para alojar las partes. El movimiento de fluido en el dispositivo puede controlarse por la bomba de jeringa, que a su vez puede controlarse por el movimiento del imán. El movimiento del imán hacia el marcador EZTag en la cámara puede colocar las sondas de oligonucleótido etiquetadas magnéticamente en una disolución de hibridación en contacto con los oligonucleótidos diana inmovilizados a un marcador EZTag, mover la disolución de separación adicionalmente lejos de la cámara, y facilitar la hibridación de los oligonucleótidos diana con las sondas de polinucleótido en el marcador EZTag. Entonces, el movimiento inverso del imán alejándose del marcador EZTag puede mover las sondas de oligonucleótido etiquetadas magnéticamente no unidas en la disolución de hibridación desde la cámara y entregar la disolución de separación a la cámara del marcador EZTag. Por último, la retirada del campo magnético eliminando el imán puede alejar la disolución de separación de la cámara.

La señal de los complejos de los biomarcadores y las sondas puede detectarse entonces usando diversos medios. En la detección de señales pueden implementarse muchas tecnologías de detección de señales usadas de manera rutinaria en la investigación y el desarrollo biomédicos, tal como etiquetado fluorescente, etiquetado colorimétrico y etiquetado magnético. Preferiblemente, el complejo se detecta visualmente. Puede usarse un módulo de detección de señales para detectar etiquetado colorimétrico. Tras la hibridación de un polinucleótido diana con una sonda de polinucleótido, las zonas que tienen hibridación se vuelven más oscuras que las zonas sin hibridación. El módulo de detección de señales puede usar una cámara tal como la de un teléfono móvil para capturar la imagen de hibridación sobre la superficie sólida, procesar la imagen usando un software de procesamiento de imágenes, y traducir la señal de hibridación a datos en formato digital. Los datos pueden enviarse entonces a una unidad de procesamiento de datos, que puede ser cualquiera como parte de un lector o en una ubicación remota a través de conexión por cable o inalámbrica. Los datos pueden verificarse o autenticarse entonces, y puede enviarse una señal de verdadero o falso

de vuelta a la unidad de procesamiento de datos, que a su vez puede presentar tal información al usuario.

En algunas realizaciones, un módulo de detección de señales magnéticas puede comprender una matriz de sensores de magnetorresistencia gigante (GMR) que se corresponde con la matriz de manchas en el marcador EZTag (figura 4). Dos sensores de GMR (etiquetados como "Ref" en la figura 4) en el lateral de la matriz pueden servir como sensores de referencia. La presencia de una sonda etiquetada en un campo magnético puede inducir un efecto de GMR, que se captura por una placa de circuito integrada, se compara con los sensores de referencia y se interpreta por el software cargado en un dispositivo portátil como código binario "1". La ausencia de una sonda etiquetada puede interpretarse como código binario "0". Junto con las ubicaciones de las sondas etiquetadas en la matriz, estos códigos binarios pueden interpretarse adicionalmente por el software cargado en un dispositivo portátil para producir lectura digital por el marcador EZTag.

Según el método de detección de la presente invención, un biomarcador se detecta de manera instantánea. El término "detectar de manera instantánea" tal como se usa en el presente documento se refiere a detectar la presencia del biomarcador basándose en la presencia del complejo del biomarcador y la sonda en el plazo de no más de 1 minuto, o 30, 10, 5, 1, 0,5 ó 0,1 segundos, preferiblemente no más de aproximadamente 5 segundos, más preferiblemente no más de 1 segundo, después de exponer el biomarcador a la sonda.

El método de detección instantánea de la presente invención puede usarse para diversos fines. Por ejemplo, el presente método de detección instantánea puede usarse para autenticar un producto, incluyendo un producto farmacéutico. También puede usarse en una prueba de diagnóstico para detectar la presencia de patógenos, armas biológicas, antígenos tumorales o biomarcadores; mejorar el rendimiento de las plataformas de cálculo basadas en ADN; y acelerar una reacción de PCR, obtener el perfil de expresión génica basándose en microalineamientos o secuenciación de ADN/ARN basándose en hibridación. Adicionalmente puede usarse para desarrollar dispositivos de encriptación/desencriptación novedosos usando ADN. Por ejemplo, un marcador de ADN puede servir como token de seguridad.

Para cada método de detección de la presente invención, se proporciona un kit, que no forma parte de la invención, para llevar a cabo el método. El kit puede comprender la sonda que tiene una etiqueta magnética y la disolución.

Para cada método de detección de la presente invención, se proporciona un dispositivo, que no forma parte de la invención, para llevar a cabo el método. El dispositivo puede comprender un módulo de unión, un módulo magnético y un módulo de detección. El biomarcador y la sonda pueden formar el complejo en el módulo de unión. El módulo magnético puede usarse para aplicar o activar y retirar o inactivar el campo magnético. El módulo de detección puede usarse para detectar el complejo del biomarcador y la sonda sobre la superficie sólida.

El término "aproximadamente" tal como se usa en el presente documento, cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, un porcentaje y similares, quiere decir que engloba variaciones del $\pm 20\%$, el $\pm 10\%$, más preferiblemente el $\pm 5\%$, incluso más preferiblemente el $\pm 1\%$ y todavía más preferiblemente del $\pm 0,1\%$ con respecto al valor especificado, según sean apropiadas tales variaciones.

Ejemplo 1. Detección instantánea

Se ilustrará la detección instantánea de oligonucleótidos diana T1-T4 mediante hibridación con sondas de oligonucleótido P1-P4 en la construcción de un marcador EZTag y la posterior hibridación en el marcador EZTag. Para construir un marcador EZTag, se configurará una matriz de manchas de 4 x 8 sobre una superficie sólida, que contiene T1, T2, T3 o T4 (representado por círculos rellenos), o que no contiene T1, T2, T3 o T4 (representado por círculos sin rellenar) en una de las cuatro columnas tal como se indica en la parte superior de las columnas (figura 1, panel izquierdo). Un código binario indicará la presencia o ausencia de T1, T2, T3 o T4 en las cuatro manchas en cada fila (figura 1, panel derecho). Las secuencias de T1-T4 y P1-P4 se exponen en la tabla 1. Se colocarán machas de oligonucleótidos modificados con amino 20 μM (MWG/Operon, AL), disueltos en Na_2HPO_4 150 mM, pH 8,5, según los círculos rellenos en el panel izquierdo de la figura 1 en un portaobjetos de vidrio recubierto con resina epoxídica (Corning, NY) usando un dispositivo de microalineamiento manual (VP scientific, CA) o a mano. Se usarán 50 ml de SSC 5x que tiene SDS al 0,1% y BSA 0,1 mg/ml para eliminar las sondas de oligonucleótido no unidas y para bloquear los sitios de unión no específicos en el portaobjetos, que se cubrirá y se sellará.

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos para dianas y sondas

Diana/sonda	Secuencia	Nº de ID de secuencia
T1	ATCTCGGTACAGTGCAGATAGACGC	1
T2	TATCGCTGCAGTACGAGATAGGCC	2
T3	CTGTGTCGAGACCATTAGACGGAC	3
T4	TCTGTAACGACGGTAGTACGCAGC	4
P1	GCGTCTATCGCACTGTACCGAGAT	5
P2	GGCCTATCTCGTACTGCAGCGATA	6

P3	GTCCGTCTAATGGTCTCGACATAG	7
P4	GCTGCGTACTACCTGCGTTACAGA	8

Se acoplarán 500 pmol de cada una de las sondas P1-P4 a 100 µl de perlas superparamagnéticas recubiertas con estreptavidina disponibles comercialmente 10 mg/ml (por ejemplo, perlas MyOne de Life Technologies) a través de un resto de biotina-estreptavidina, siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante (por ejemplo, Life Technologies). Se suspenderán las perlas unidas a la sonda en una disolución de hibridación que tiene formamida al 10%, SSC 5x, SDS al 0,1%, ADN de timo de ternero 0,1 mg/ml a temperatura ambiente. Se aplicará la disolución de hibridación que contiene las perlas unidas a la sonda a la matriz usando una pipeta o una bomba de jeringa. Se creará un campo magnético usando un imán de neodimio y se aplicará a la disolución de hibridación.

La aplicación de la disolución de hibridación al marcador EZTag y la aplicación del campo magnético a la disolución de hibridación tendrán lugar al mismo tiempo con un pequeño intervalo de tiempo tal como medio segundo, aplicándose el campo magnético tras la aplicación de la disolución de hibridación. El campo magnético se aplicará a través de la superficie sólida horizontalmente durante de medio segundo a un segundo antes de la retirada. La disolución de hibridación se eliminará al mismo tiempo que o después de que se retira el campo magnético. Después de esto, la señal de hibridación, representada por zonas oscurecidas en el marcador EZTag donde T1, T2, T3 o T4 unidas a la superficie, se unirá a las perlas superparamagnéticas recubiertas con estreptavidina a través de P1, P2, P3, o P4, respectivamente, y será detectable visualmente a simple vista. Puede usarse una cámara digital, o un smartphone equipado con una cámara digital, para grabar la imagen de la señal de hibridación. La señal de hibridación se correlacionará con los círculos rellenos en el panel izquierdo de la figura 1. Se generarán los códigos binarios tal como se muestra en el panel derecho de la figura 1 en el plazo de 5 segundos tras la aplicación de la disolución de hibridación al marcador EZTag.

Se pretende que la memoria descriptiva y los ejemplos se consideren únicamente a modo de ejemplo, indicándose el verdadero alcance de la invención mediante las siguientes reivindicaciones.

Lista de secuencias

<110> Li, Zhong

<120> DETECCIÓN INSTANTÁNEA DE BIOMARCADORES Y USOS DE LOS MISMOS

<130> HTB-100WO

<150> Documento US 61/652.918

<151> 30-05-2012

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 1

atctcgtac agtgcgatag acgc 24

<210> 2

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 2

tatcgtgca gtacgagata ggcc 24

<210> 3

<211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sintética

<400> 3
ctgtgtcgag accattagac ggac 24

10 <210> 4
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sintética

<400> 4
 20 **tctgtaacga cggtagtacg cagc** 24

<210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 5
 30 **gcgctctatcg cactgtaccg agat** 24

<210> 6
 <211> 24
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 6
 40 **ggcctatctc gtactgcagc gata** 24

<210> 7
 <211> 24
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 7
 50 **gtccgtctaa tggctcgcac atag** 24

<210> 8
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 8
 60 **gctgcgtact acctgcgta caga** 24

65

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar un biomarcador inmovilizado a una superficie sólida, que comprende
- (a) exponer el biomarcador a una sonda que tiene una etiqueta magnética en una disolución;
- 5 (b) aplicar un campo magnético a la disolución, con lo que la sonda se mueve hacia y a través de la superficie sólida y forma un complejo con el biomarcador sobre la superficie sólida;
- (c) retirar el campo magnético;
- (d) eliminar la disolución de la superficie sólida; y
- (e) detectar el complejo no más de 1 minuto después de exponer el biomarcador a la sonda, en el que la presencia del complejo sobre la superficie sólida indica la presencia del biomarcador,
- 10 en el que dicho método no implica lavar el complejo antes de dicha detección.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el biomarcador comprende un polinucleótido diana que tiene una primera secuencia de nucleótidos, en el que la sonda es una sonda de polinucleótido que comprende una segunda secuencia de nucleótidos complementaria con la primera secuencia de nucleótidos, y en el que el complejo comprende un híbrido del polinucleótido diana y la sonda de polinucleótido.
- 15 3. Método según la reivindicación 2, en el que el polinucleótido diana es un ADN monocatenario.
4. Método según la reivindicación 1, en el que el polinucleótido diana comprende 8-50 nucleótidos.
5. Método según la reivindicación 1, en el que el biomarcador comprende un polipéptido diana, y en el que la sonda es una sonda de polipéptido que se une específicamente al polipéptido diana.
- 20 6. Método según la reivindicación 5, en el que la sonda de polipéptido es un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido diana.
7. Método según la reivindicación 1, en el que la sonda se une a una partícula que comprende un material magnético.
8. Método según la reivindicación 7, en el que la partícula tiene un diámetro que oscila entre 1 nm y 100 µm.
9. Método según la reivindicación 7, en el que la sonda se une a la partícula por medio de un ligador.
- 25 10. Método según la reivindicación 7, en el que la sonda está biotinilada, y en el que la partícula es una perla superparamagnética recubierta con estreptavidina.
11. Método según la reivindicación 1, en el que el campo magnético se aplica horizontalmente y verticalmente a través de la superficie sólida.
12. Método según la reivindicación 1, en el que el campo magnético se aplica durante no más de 5 segundos.
- 30 13. Método según la reivindicación 1, en el que el complejo se detecta visualmente.
14. Método según la reivindicación 1, en el que el biomarcador se detecta no más de 5 segundos después de la exposición a la sonda.
15. Método según la reivindicación 1, en el que el complejo se detecta no más de 30 segundos después de exponer el biomarcador a la sonda.

FIGURA 1

T1	T2	T3	T4	Código
●	●	○	●	1101
●	○	●	●	1011
○	●	○	●	0101
●	○	●	○	1010
●	●	●	○	1110
●	●	○	●	1101
○	●	●	○	0110
●	○	○	●	1001

FIGURA 2

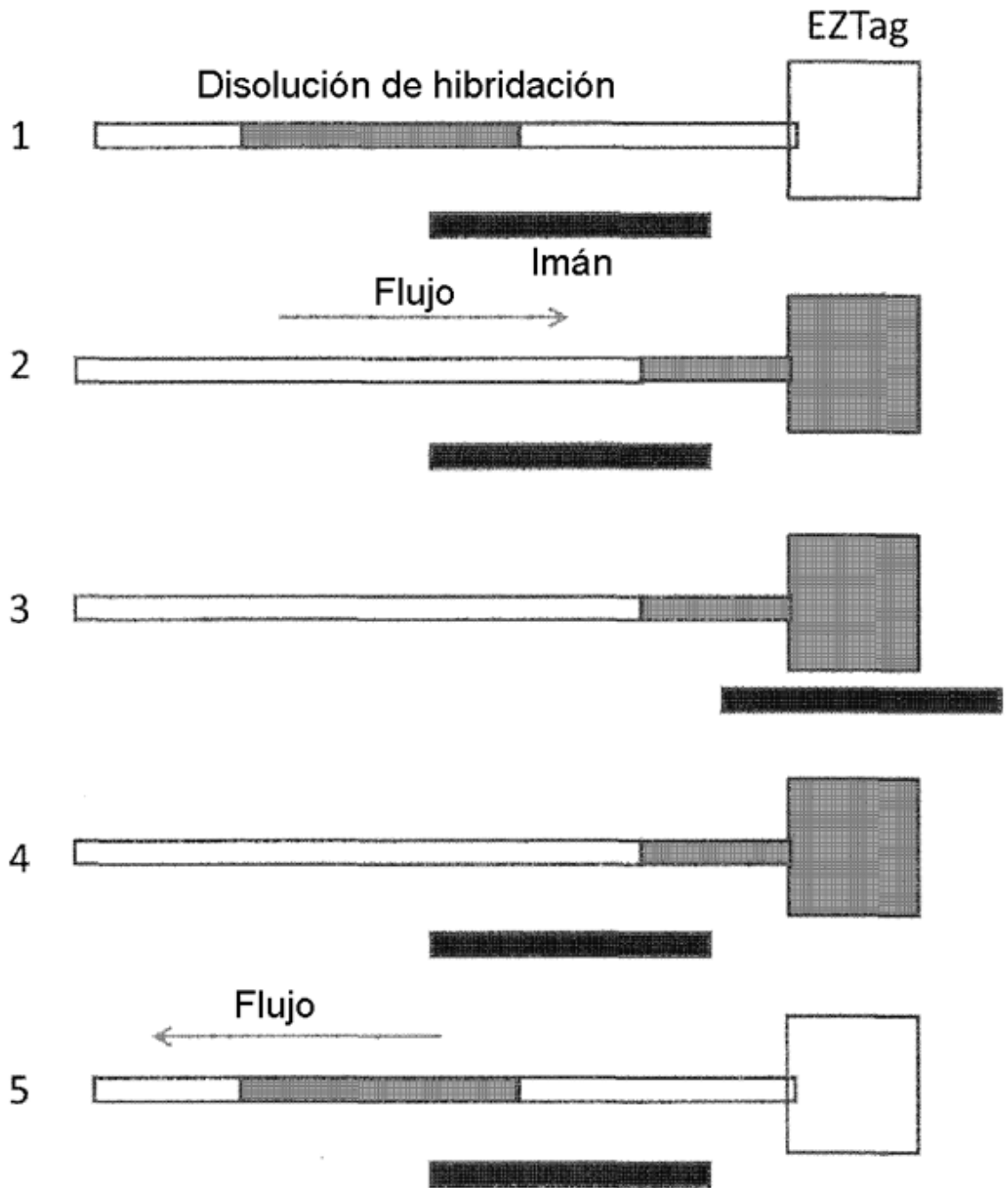


FIGURA 3

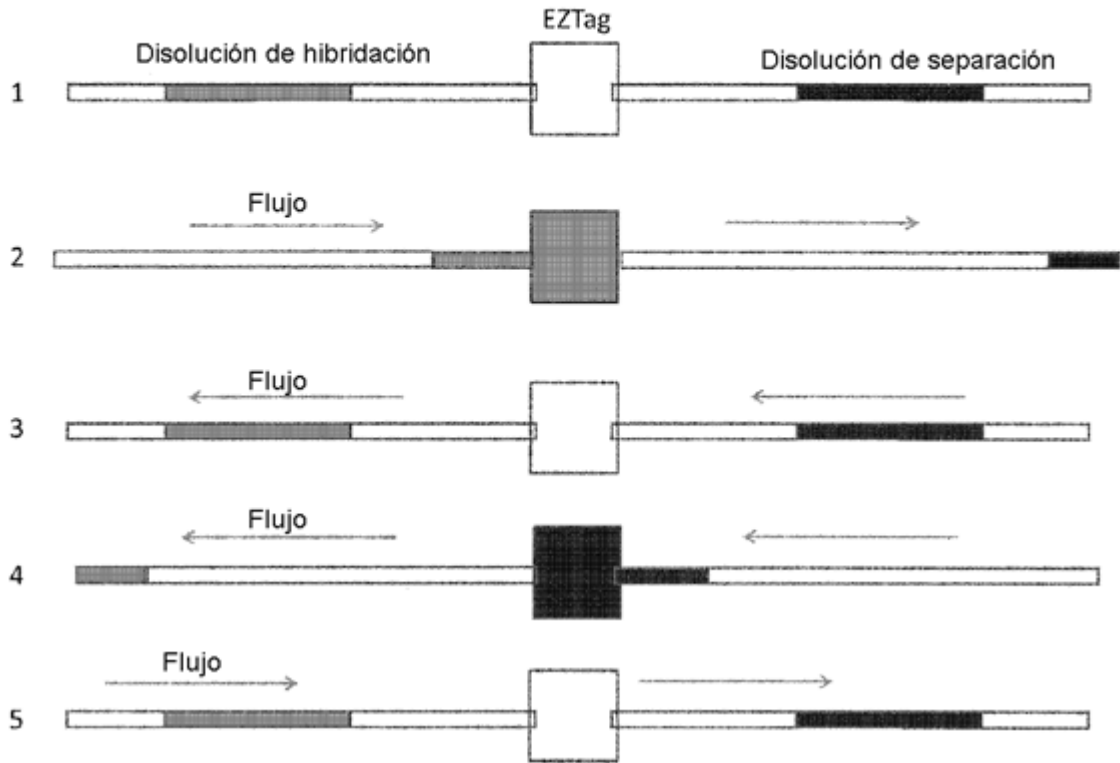


FIGURA 4

