

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 761**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.12.2013 PCT/SG2013/000533**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.06.2014 WO14092653**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2013 E 13863040 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 2931921**

54 Título: **Métodos sin marcadores para el aislamiento y análisis de ácidos nucleicos en dispositivos en fase sólida**

30 Prioridad:

13.12.2012 SG 201209173

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

01.04.2019

73 Titular/es:

**ONE BIOMED PTE LTD. (100.0%)
385B Bukit Timah Road
Singapore 259730, SG**

72 Inventor/es:

**SHIN, YONG y
PARK, MI KYOUNG**

74 Agente/Representante:

DÍAZ DE BUSTAMANTE TERMINEL, Isidro

ES 2 706 761 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

Métodos sin marcadores para el aislamiento y análisis de ácidos nucleicos en dispositivos en fase sólida.

5 **Campo**

Métodos de aislamiento de ácidos nucleicos preferentemente en un dispositivo en fase sólida.

Antecedentes

10 El ácido nucleico es una herramienta de análisis importante cuando se identifica una patología. Los biomarcadores de ADN (por ejemplo, polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), mutaciones y metilación del ADN) ofrecen pistas importantes para ayudar a los investigadores a buscar las causas del cáncer y proporcionan grandes oportunidades para diagnosticar y monitorizar el estado de la enfermedad durante las primeras fases de la enfermedad, así como para el pronóstico y la vigilancia. Debido a la extremadamente baja concentración fisiológica de ADN en comparación con otros componentes tales como proteínas (es decir, decenas de nanogramos de ADN frente a microgramos de proteína en un microlitro de sangre completa), la extracción eficiente y la preconcentración de ADN de muestras clínicas es fundamental para los procesos posteriores corriente abajo tales como la amplificación y la detección. Cuando se trata de ADN metilado, este problema se magnifica.

20 La metilación del ADN desempeña un papel crucial en la regulación de la expresión génica y la organización de la cromatina dentro de las células eucariotas normales. La metilación del ADN se produce mediante la adición covalente de un grupo metilo en el carbono 5 del anillo de citosina, lo que da como resultado 5-metilcitosina. Estos grupos de metilo se proyectan en el surco principal del ADN e inhiben efectivamente la transcripción. En el ADN de mamíferos, la 5-metilcitosina se encuentra en aproximadamente el 4% del ADN genómico, principalmente en los dinucleótidos de citosina-guanosina (CpG). Dichos sitios de CpG aparecen a frecuencias más bajas de lo esperado en todo el genoma humano, pero se encuentran con mayor frecuencia en pequeños tramos de ADN llamados islas CpG. Estas islas se encuentran típicamente en o cerca de las regiones promotoras de los genes, donde se inicia la transcripción. En contraste con la mayor parte del ADN genómico, en la que la mayoría de los sitios CpG están muy metilados, las islas CpG en el tejido de la línea germinal y los promotores de las células somáticas normales permanecen sin metilar, permitiendo que se produzca la expresión génica. La metilación del ADN está mediada por un ADN estrechamente relacionado con las enzimas metiltransferasa (DNMT), que transfieren un grupo metilo de S-adenosil-L-metionina a citosinas en dinucleótidos CpG. Las metil-citosinas establecidas por las DNMT sirven como sitios de unión para las proteínas del dominio de unión de metil-CpG (MBD) MeCP2, MBD (S.B. Baylin, DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nature Clin. Prac. Oncol.* 2 (2005) 4-11.; M.T. McCabe, et al., Cancer DNA methylation: Molecular mechanisms and clinical implications. *Clin. Cancer Res.* 15 (2009) 3927-3937.; M. Wielscher, et al. Methyl-binding domain protein-based DNA isolation from human blood serum combines DNA analyses and serum-autoantibody testing. *BMC Clin. Pathol.* 11 (2011) 11-20.; y B.R. Cipriany, et al. Real-time analysis and selection of methylated DNA by fluorescence-activated single molecule sorting in a nanofluidic channel. *Proc. Nat. Acad. Sci USA.* 109 (2012) 8477-8482. A través de las interacciones con las histona desacetilasas, las histona metiltransferasas y las enzimas de remodelación de la cromatina dependientes de ATP, los MBD traducen el ADN metilado a una cromatina compactada que es represiva para la transcripción. Especialmente, MBD es el dominio de unión a metil CpG de la proteína MeCP2, que se une a los CpG simétricamente metilados en cualquier contexto de secuencia, y participa en la mediación de la represión transcripcional dependiente de la metilación. Aunque hay muchos indicios de que MeCP2 se une exclusivamente a fragmentos de ADN metilados in vivo, también se describió en la bibliografía concordante una actividad de unión independiente de la metilación del ADN de MeCP2 in vitro, lo que la hace adecuada para el análisis general de ADN in vitro. [S.B. Baylin; McCabe, et al.; M. Wielscher, et al.; y B.R. Cipriany, et al.]

45 La metilación del ADN provoca el silenciamiento de la expresión de genes supresores de tumores en los cánceres humanos. Un creciente trabajo en el campo de la epigenómica está reforzando el vínculo entre la hipermetilación de secuencias de nucleótidos clave y la aparición de muchos tipos de cáncer diferentes. Los patrones de metilación del ADN en las células cancerosas humanas están considerablemente distorsionados. Típicamente, las células cancerosas exhiben hipometilación de regiones intergénicas que normalmente comprenden la mayor parte del contenido de metilcitosina de una célula. En consecuencia, los elementos transponibles pueden volverse activos y contribuir a la inestabilidad genómica observada en las células cancerosas. Simultáneamente, las células cancerosas exhiben hipermetilación dentro de las regiones promotoras de muchos genes supresores de tumores asociados a la isla CpG. Como resultado, estos genes reguladores se silencian transcripcionalmente, lo que da como resultado una pérdida de función. Por tanto, a través de los efectos de la hipo- y la hipermetilación, la metilación del ADN afecta significativamente al panorama genómico de las células cancerosas, potencialmente en un grado incluso mayor que las mutaciones de la región codificante, que son relativamente raras. [S.B. Baylin;

McCabe, et al.; M. Wielscher, et al.; y B.R. Cipriany, et al]. La metilación del ADN es de gran importancia para la investigación del cáncer y las clínicas, dado que permite un diagnóstico del cáncer más temprano antes de llegar al punto de metástasis. Un ejemplo es RAR β , un receptor de hormonas tiroideas-esteroides que controla el crecimiento de muchos tipos de células mediante la regulación de la expresión génica. La metilación de RAR β se ha notificado en los cánceres de mama, pulmón y vejiga.

El reciente desarrollo de varias tecnologías de detección de metilación a escala genómica ha ampliado enormemente la comprensión de los patrones de metilación del ADN, tanto en células normales como en células cancerosas. En particular, MSP (PCR específica de metilación), que puede evaluar rápidamente el estado de metilación de virtualmente cualquier grupo de sitios CpG dentro de una isla CpG. Este ensayo implica la modificación inicial del ADN por bisulfito de sodio, que convierte todas las citosinas sin metilar, pero no metiladas, en uracilo, y la posterior amplificación con cebadores específicos para ADN metilado frente a no metilado. La MSP requiere solo pequeñas cantidades de ADN, es sensible al 0,1% de alelos metilados de un locus de isla CpG dado. La modificación química de la citosina a uracilo por tratamiento con bisulfito ha proporcionado otro método para el estudio de la metilación del ADN que evita el uso de enzimas de restricción. Sin embargo, estos métodos son técnicamente bastante difíciles y requieren mucha mano de obra y, sin la clonación de los productos amplificados, la técnica es menos sensible que el análisis de Southern, que requiere la metilación de un 25% de los alelos para su detección. Por lo tanto, el aislamiento del ADN metilado a partir del ADN genómico humano es una etapa importante para mejorar el análisis de metilación de ADN en cáncer, pero eso aún es un desafío. [J.G. Herman, J.R. et al., Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc. Nat. Acad. Sci USA. 93 (1996) 9821-9826.; S. Pan, et al., Double recognition of oligonucleotide and protein in the detection of DNA methylation with surface Plasmon resonance biosensors. Biosens. Bioelectron. 26 (2010) 850-853.; y J.D. Suter, et al., Label-free DNA methylation analysis using opto-fluidic ring resonators. Biosens. Bioelectron. 26 (2010) 1016-102].

En los métodos de fase en solución, para el aislamiento del ADN metilado a partir del ADN genómico, hasta ahora, la proteína MBD recombinante, que está disponible tras la sobreexpresión de la proteína marcada con His clonada en *E. coli*, se ha usado predominantemente para los ensayos de metilación del ADN. La proteína MBD se ha aplicado preferentemente estando inmovilizada de manera similar a cromatografía de afinidad con etapas de elución de gradiente de NaCl para aislar el ADN metilado para PCR y análisis en gel en fase de solución. De acuerdo con el protocolo comercializado de las empresas, la proteína MBD se adhiere a perlas de Ni-Sepharose o magnéticas para la purificación de ADN basada en afinidad que permite el análisis simultáneo del ADN metilado. Se ha descubierto que MBD aislado del ADN es particularmente adecuado para los análisis de metilación del ADN (figura 1, línea negra).

Sin embargo, los estudios anteriores para la detección de metilación de ADN basados en biosensores sin marcadores, sin modificación con bisulfito se han demostrado hasta ahora solo con oligonucleótidos sintéticos. La detección directa de ADN metilados nativos en ADN genómico en fluidos corporales, tales como sangre, orina o saliva, sería difícil debido a su concentración extremadamente baja. El número de un gen específico en el ADN total es extremadamente bajo. Por ejemplo, Su et al., han notificado que se pueden encontrar aproximadamente 2 copias de ADN de *Kristin-ras* de tumor mutado en 50-200 μ l de orina o muestras de sangre de pacientes con cáncer [Y.H. Su, et al., Block, Detection of mutated K-ras DNA in urine, plasma, serum of patients with colorectal carcinoma or adenomatous polyps, Annals of the New York Academy of Sciences 1137 (2008) 197-206]. La sensibilidad de los biosensores sin marcador notificados no es lo suficientemente buena como para detectar una concentración tan baja de biomarcadores de ADN nativos. Por lo tanto, estas técnicas sin marcador son inadecuadas para ser usadas como dispositivos de diagnóstico *in vitro* (IVD) sin amplificación de los ADN diana.

Recientemente se ha notificado que se usaron resonadores de microanillo basados en silicio altamente sensibles para detectar biomoléculas (por ejemplo, proteínas, ADN metilado, ácidos nucleicos) monitorizando un desplazamiento en la longitud de onda resonante. Los sensores de índice de refracción óptica (IR) se investigan exhaustivamente para una serie de aplicaciones y desempeñan un papel destacado en el análisis bioquímico. Entre los sensores de IR bioquímicos existentes, aquellos basados en guías de ondas ópticas integradas son de gran interés debido a su alta sensibilidad, pequeño tamaño e integración a gran escala. Recientemente, los sensores de IR basados en la guía de ondas de ranura han atraído un gran interés debido a la notable propiedad de la guía de ondas de ranura de proporcionar una alta intensidad óptica en una región de índice de refracción bajo (región de ranura) de tamaño de sublongitud de onda, intercalada entre dos tiras de alto índice de refracción. Al usar la ranura como región de detección, se puede obtener una mayor interacción luz-analito y, por lo tanto, una mayor sensibilidad en comparación con una guía de ondas convencional. La luz de detección se concentra cerca de la superficie mediante un campo evanescente que experimenta una descomposición exponencial con una longitud de descomposición característica de hasta unos cientos de nanómetros. Por tanto, el índice de refracción se ve afectado por la unión del analito con el ligando de captura inmovilizado dentro de la longitud de descomposición. Los resonadores de microanillo de silicio son sensores ópticos basados en índices de refracción que proporcionan una detección de biomoléculas multiplexada, en tiempo real, sin marcadores y altamente sensible, cerca de la superficie del sensor. Además, los dispositivos se fabrican usando tecnología CMOS estándar, lo que garantiza un coste bajo y capacidad de ampliación. Los métodos requieren etapas que requieren tiempo para inmovilizar las sondas sobre la superficie del dispositivo por personal altamente cualificado.

El objetivo de la invención es mejorar al menos algunas de las dificultades mencionadas anteriormente.

Resumen

5 Por consiguiente un primer aspecto de la invención definido en las reivindicaciones adjuntas incluye un método para el aislamiento y/o el análisis de moléculas de ácido nucleico en un dispositivo en fase sólida, que comprende

(i) incubar una muestra de ácido nucleico con adipimidato de dimetilo (DMA) en condiciones que permiten la formación de un complejo del ácido nucleico con el DMA;

(ii) poner en contacto el complejo de (i) con una superficie del dispositivo en fase sólida; y

(iii) aislar y/o analizar el ácido nucleico del complejo.

10 Otro aspecto de la invención definido en las reivindicaciones adjuntas incluye un sistema para aislar una molécula de ácido nucleico de interés en una muestra de ácido nucleico, que comprende:

(i) un compuesto de adipimidato de dimetilo (DMA) capaz de unirse directamente a la molécula de ácido nucleico; y

(ii) una superficie sólida para la interacción del ácido nucleico y el DMA.

15 Otros aspectos de la invención serían evidentes para un experto en la materia con referencia a los siguientes dibujos y descripción de diversas realizaciones no limitantes.

Breve descripción de los dibujos

20 Los dibujos no están necesariamente dibujados a escala, sino que el énfasis generalmente se coloca sobre la ilustración de los principios de diversas realizaciones. En la siguiente descripción, se describen diversas realizaciones de la invención con referencia a los siguientes dibujos ejemplares.

Figura 1. Flujo de trabajo para el aislamiento y análisis del ADN usando métodos de fase en solución frente a en fase sólida.

Figura 2. Complejo con DMA y el ADN metilado en el dispositivo en fase sólida (#1). Complejo con proteína MBD y el ADN metilado en el dispositivo en fase sólida (#2).

25 Figura 3. Resultado experimental del aislamiento (A) y análisis (B) del ADN metilado en un dispositivo en fase sólida.

Figura 4. Resultado experimental del aislamiento con DMA en comparación con la adición de ADN solo o DMA solo (A). El desplazamiento de longitud de onda del complejo de ADN metilado-DMA en 2 líneas celulares cancerosas (B).

30 **Descripción detallada**

Sorprendentemente, el DMA (adipimidato de dimetilo) se puede unir directamente al ácido nucleico sin ningún intermedio proteico reticulado. Esta interacción directa de DMA y ácido nucleico se puede usar en un método sin marcador para el aislamiento y análisis de ácido nucleico o ADN metilado, preferentemente en un dispositivo en fase sólida que incluye silicio, vidrio, película polimérica, plásticos o cualquier dispositivo en fase sólida adecuado. El método sería muy útil para la detección de ADN en aplicaciones clínicas tales como el cáncer humano. La unión directa de ácido nucleico y DMA proporciona un medio químico sencillo y rentable para capturar y medir ácidos nucleicos, incluyendo ADN metilado.

35 Por consiguiente, un primer aspecto de la invención incluye un método definido en las reivindicaciones adjuntas para el aislamiento y/o el análisis de moléculas de ácido nucleico en un dispositivo en fase sólida que comprende

40 (i) incubar una muestra de ácido nucleico con adipimidato de dimetilo (DMA) en condiciones que permiten la formación de un complejo del ácido nucleico con el DMA;

(ii) poner en contacto el complejo de (i) con una superficie del dispositivo en fase sólida; y

(iii) aislar y/o analizar el ácido nucleico del complejo.

El método permite que el aislamiento y análisis del ácido nucleico se realicen en tiempo real.

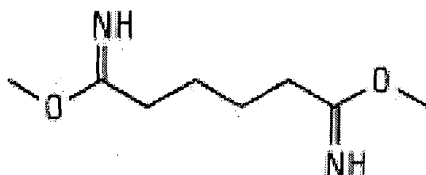
45 El término "ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada. El ácido nucleico puede ser ADN, ARN, híbridos de ADN:ARN, ANP y similares, pero preferentemente es

ADN.

La expresión "dispositivo en fase sólida" se refiere a una superficie sólida que permite la mezcla de una muestra de ácido nucleico y DMA, preferentemente en una fase líquida. Cualquier recipiente que proporcione espacio adecuado para una interacción entre la muestra de ácido nucleico y DMA sería adecuado, incluyendo silicio, vidrio, película polimérica, plásticos o cualquier otra superficie adecuada. En diversas realizaciones, el dispositivo en fase sólida incluye un dispositivo microfluídico. En diversas otras realizaciones, el dispositivo en fase sólida incluye un resonador de anillo, de la forma más preferente el resonador de anillo es a base de silicio. En diversas realizaciones, el resonador de anillo comprende una estructura de guía de ondas. En diversas otras realizaciones, se podrían usar otros dispositivos en fase sólida adecuados conocidos por los expertos en la materia, tales como, por ejemplo, perlas magnéticas.

Una "muestra de ácido nucleico" puede incluir cualquier muestra biológica, incluyendo: sangre líquida o, saliva líquida, orina o sangre, hisopos bucales, pelos, huesos, dientes, uñas, tejidos de cualquier órgano (incluyendo el cerebro), músculo, piel, tumores, bultos desconocidos, biopsias incluyendo biopsias con aguja, células o líneas celulares. La muestra se puede tomar de cualquier organismo biológico, incluyendo plantas, hongos y animales. Las muestras son preferentemente de vertebrados incluyendo mamíferos y de la manera más preferente seres humanos. Las muestras son, preferentemente, de tejido canceroso o tejidos sospechosos de ser cancerosos o que forman neoplasias incluyendo cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cáncer nasofaríngeo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer de huesos, cáncer testicular, cáncer de tiroides, linfoma, leucemia o cualquier otra neoplasia conocida. En diversas realizaciones, se pueden tomar muestras de tejidos o fluidos corporales no cancerosos sanos para compararlos con muestras de tejido o fluidos corporales cancerosos. En diversas realizaciones, el ácido nucleico se ha extraído de la muestra usando métodos conocidos en la técnica.

El adipimidato de dimetilo (DMA) comprende un reticulante permeable a la membrana que contiene imidoéster reactivo de amina en cada extremo de un brazo espaciador de 6 átomos. El DMA es un agente no caotrópico para unirse directamente al ácido nucleico, incluyendo el ADN metilado. El DMA comprende una estructura de fórmula I:



Fórmula I

En diversas realizaciones, los grupos NH de DMA se pueden convertir en los grupos NH_2^+ con ácidos, con cualquier contraión adecuado, por ejemplo, con sales de clorhidrato o cualquier otro ácido con un grupo de hidrógeno libre sería adecuado.

Sin estar limitados a ninguna teoría, se postula que el imidoéster bifuncional (grupo reactivo amina) en DMA reacciona con grupos amino libres en moléculas de ADN, dando como resultado la reticulación entre DMA y ADN. La reacción selectiva entre DMA y los grupos amino del ácido nucleico respecto a los de la proteína puede estar relacionada con que DMA está cargado positivamente, siendo por lo tanto atraído al ADN cargado negativamente en comparación con los fragmentos de proteína cargados negativamente digeridos. Adicionalmente, el ADN fragmentado durante la etapa de lisis contiene típicamente unos pocos pares de bases de ADN monocatenario en cada extremo del fragmento, conocidos como extremos "pegajosos", y DMA reacciona con grupos de amina de los extremos "pegajosos". El imidoéster bifuncional de DMA proporciona además una alta relación superficie-área respecto a volumen para capturar ADN.

En diversas realizaciones el método puede comprender funcionalizar la superficie del dispositivo en fase sólida que será aminada usando tratamientos de superficie conocidos en la técnica. La superficie se funcionaliza antes de incubar la muestra de ácido nucleico con el DMA. En diversas realizaciones, la superficie se fracciona con un aminosilano, preferentemente 3-aminopropiltrióxido de silano (APTES). El DMA interactuará con la superficie aminada mediante enlaces covalentes. Se observa que el enlace permanece o es más fuerte cuando el DMA forma un complejo con ácido nucleico. El complejo con DMA y ADN también reacciona con la superficie modificada con amina y forma enlaces covalentes estables. Los enlaces son enlaces de amidina que son reversibles a un pH alto (>pH 10) que se pueden usar como un medio para capturar y liberar el complejo cambiando el pH.

En diversas realizaciones la muestra de ácido nucleico se extrae con una proteasa antes de la incubación con el DMA, preferentemente la proteinasa K. La reacción selectiva entre el DMA y los grupos amino del ácido nucleico respecto a los de la proteína puede estar relacionada con la actividad proteasa de la proteinasa K. La proteinasa K tanto lisa las células como digiere la mayor parte de la proteína, eliminando la proteína de la muestra.

En diversas realizaciones El ácido nucleico comprende ADN metilado. La expresión "ADN metilado" tiene el

significado normal conocido en la técnica. La metilación del ácido desoxirribonucleico (ADN) incluye la adición de un grupo metilo en una o más citosina o adenina en ubicaciones a lo largo de un nucleótido.

En diversas realizaciones, el dispositivo en fase sólida es un dispositivo microfluídico.

5 La expresión "dispositivo microfluídico" incluye microchips, estructuras de microcanales o cualquier plataforma adecuada de laboratorio en un chip conocida en la técnica. La técnica de DMA se puede aplicar a un dispositivo microfluídico basado en fase sólida para aislar y purificar ácidos nucleicos y mejorar la amplificación del ADN.

En diversas otras realizaciones el dispositivo en fase sólida es un resonador de anillo.

10 En diversas realizaciones todas las etapas para el aislamiento y análisis del ácido nucleico se realizan en un dispositivo en fase sólida. La combinación de fabricación de bajo coste, alta sensibilidad y alta capacidad de multiplexación a través de pequeñas dimensiones hace que el resonador de microanillo sea un buen candidato para chips biosensores desechables para análisis de diagnóstico inmediato (POCT).

En diversas realizaciones donde el dispositivo en fase sólida es un resonador de anillo, el método puede comprender además

15 (i) determinar una intensidad luminosa de salida medida mediante un detector de un sistema de detección óptico;

(ii) determinar un cambio en un índice de refracción efectivo de un resonador del sistema de detección óptico, durante la incubación;

20 En diversas realizaciones el método puede comprender además eluir el complejo. Eluir preferentemente se refiere a eliminar el complejo del ADN metilado con el DMA rompiendo cualquier enlace covalente formado entre el complejo y la superficie del dispositivo en fase sólida. Un medio para eliminar el complejo del ácido nucleico con el DMA de la superficie incluye el uso de una solución de pH alto (>pH 10). Un ejemplo de solución de pH alto para eliminar el complejo del ácido nucleico con el DMA de la superficie incluye la ruptura de cualquier enlace covalente formado entre el complejo y la superficie fraccionada sería bicarbonato de sodio.

25 En diversas realizaciones preferidas, el método puede comprender además modificar el complejo en los residuos de citosina no metilados. El análisis de metilación del ADN usando conversión de bisulfito puede modificar el complejo en los residuos de citosina no metilados y puede operar en cantidades de picogramos del ADN de entrada, la conversión causa la modificación de al menos el 50% del ADN de entrada, más preferentemente al menos el 60%, 70 % u 80% del ADN de entrada, más preferentemente el 90% del ADN de entrada.

30 En diversas realizaciones el complejo o el complejo modificado se amplifica mediante cualquier método conocido en la técnica. La amplificación de ADN se puede llevar a cabo mediante diversos métodos diferentes, incluyendo PCR, preferentemente con cebadores específicos para ADN metilado y/o no metilado. Los ejemplos muestran que la eficiencia de la PCR específica de metilación y la amplificación de la PCR genómica mejoran mediante el uso del método.

35 En diversas realizaciones, el método puede comprender además detectar el complejo o el complejo modificado. La detección se puede realizar mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, aunque sin limitación, métodos de secuenciación, análisis por transferencia Southern o cualquier otra técnica de análisis conocida en la técnica.

Otro aspecto de la invención incluye un sistema definido en las reivindicaciones adjuntas para aislar una molécula de ácido nucleico de interés en una muestra de ácido nucleico, que comprende:

- 40
1. (i) un compuesto de adipimidato de dimetilo (DMA) capaz de unirse directamente a la molécula de ácido nucleico; y
 2. (ii) una superficie sólida para la interacción del ácido nucleico y el DMA.

La muestra de ácido nucleico, DMA y la superficie sólida tienen el mismo significado que se ha descrito anteriormente.

45 En diversas realizaciones la superficie sólida está funcionalizada. Una superficie funcionalizada es una superficie que ha sido aminada usando tratamientos de superficie conocidos en la técnica. En diversas realizaciones, la superficie está fraccionada con un aminosilano, preferentemente 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES).

En diversas realizaciones, la superficie sólida se encuentra en un dispositivo microfluídico. En diversas otras realizaciones, la superficie sólida está en un resonador de anillo.

50 En diversas realizaciones el resonador de anillo es un sensor de detección óptico, en el que dicho sensor de detección tiene una lectura alterada cuando dicha molécula de ácido nucleico está unida a dicho DMA, de manera

que dicho sensor está configurado para detectar un complejo formado entre la molécula de ácido nucleico y el DMA.

En diversas realizaciones el sensor de detección óptico está configurado para resonar a una longitud de onda resonante.

5 En diversas realizaciones el sistema comprende además un láser sintonizable capaz de proporcionar luz a dicha longitud de onda resonante para el sensor óptico.

En diversas realizaciones el sensor óptico o resonador de anillo comprende una estructura de guía de ondas.

En diversas realizaciones, dicho resonador tiene una longitud de onda resonante que se desplaza cuando dicha molécula de ácido nucleico está unida a dicho DMA, formando dicho complejo.

En lo sucesivo se describirá la "detección óptica".

10 La detección de la metilación del ADN se puede conseguir usando un sistema basado en óptica, tal como los que se conocen en la técnica. El sistema puede incluir una fuente de luz, un sensor óptico y un detector óptico. En diversas ocasiones, la fuente de luz emite un intervalo de longitudes de onda. Por ejemplo, la fuente de luz puede ser una fuente de luz de banda relativamente estrecha que emite luz que tiene un ancho de banda estrecho en el que la longitud de onda de la fuente de luz se barre sobre una región muchas veces el ancho de banda de la fuente de luz.
 15 El intervalo de longitudes de onda puede ser (400-700 nm (visible), 700-400 (IR-A), 1260-1360 nm (banda O), 1360-1460 nm (banda E), 1460-1530 nm (Banda S), 1530-1565 nm (banda C) y 1565-1625 nm (banda L). Esta fuente de luz puede ser, por ejemplo, un láser. Este láser puede ser un láser sintonizable tal que la longitud de onda de la salida del láser varíe. En algunas realizaciones, el láser es un láser de diodo que tiene una cavidad externa. No es necesario que este láser esté limitado a ningún tipo particular y puede ser, por ejemplo, un láser de fibra, un láser de estado sólido, un láser semiconductor u otro tipo de láser o sistema láser. El láser en sí puede tener una longitud de onda que es ajustable y que puede ser escaneada o barrida. Como alternativa, se pueden usar componentes ópticos adicionales para proporcionar diferentes longitudes de onda. En algunas realizaciones, la luz de salida de la fuente de luz tiene una longitud de onda para la cual la estructura de la guía de ondas es suficientemente transmisiva ópticamente. En algunas realizaciones, la estructura de la guía de ondas está dentro de un medio de muestra tal como un medio acuoso y la fuente de luz emite luz que tiene una longitud de onda para la cual el medio es sustancialmente ópticamente transmisor, de modo que se puede alcanzar la resonancia en el resonador óptico.
 20 Además, en algunas realizaciones, la salida de la fuente de luz tiene una longitud de onda en un intervalo en el que el complejo no tiene un índice de refracción no lineal. Del mismo modo, en diversas publicaciones, la fuente de luz puede ser una fuente de luz coherente y emitir una luz que tenga una longitud de coherencia relativamente larga. Sin embargo, en diversas realizaciones, la fuente de luz puede ser una fuente de luz coherente que emita luz con una longitud de coherencia corta. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, puede usarse una fuente de luz de banda ancha tal como un diodo emisor de luz superluminiscente (SLED). En tales casos, la longitud de onda no necesita ser barrida.
 25
 30

35 La fuente de luz proporciona luz al sensor óptico. La fuente de luz puede ser controlada por componentes electrónicos de control. Estos componentes electrónicos pueden, por ejemplo, controlar la longitud de onda de la fuente de luz y, en particular, hacer que la fuente de luz barra la longitud de onda de la salida óptica de la misma. En algunas realizaciones, se toma una muestra de una parte de la luz emitida desde la fuente de luz para determinar, por ejemplo, la longitud de onda de emisión de la fuente de luz.

40 En algunas realizaciones, el sensor óptico comprende un transductor que altera la entrada óptica basándose en la presencia y/o concentración del complejo a detectar. El sensor óptico puede ser una estructura de guía de ondas. El sensor óptico puede ser un dispositivo óptico integrado y puede estar incluido en un chip. El sensor óptico puede comprender material semiconductor tal como silicio. El sensor óptico puede ser una estructura interferométrica (por ejemplo, un interferómetro) y producir una señal de salida como resultado de la interferencia óptica. El sensor óptico puede estar incluido en una disposición ordenada de sensores ópticos.

45 El detector óptico detecta la salida óptica del sensor. En diversas realizaciones, el detector óptico comprende un transductor que convierte una entrada óptica en una salida eléctrica. Esta salida eléctrica puede ser procesada por componentes electrónicos de procesamiento para analizar la salida del sensor. El detector óptico puede comprender un detector de fotodiodos. Se pueden emplear otros tipos de detectores. El componente óptico de recogida en una trayectoria óptica entre el sensor y el detector puede facilitar la recogida de la salida óptica del sensor y dirigir esta salida al detector. Componentes ópticos adicionales tales como espejos, divisores de haz u otros componentes también pueden incluirse en la trayectoria óptica desde el sensor hasta el detector.
 50

55 En diversas realizaciones, el sensor óptico está dispuesto en un chip mientras que la fuente de luz y/o el detector óptico están separados del chip. La fuente de luz y el detector óptico pueden, por ejemplo, ser parte de un aparato que comprende un componente óptico de espacio libre que interroga a los sensores ópticos en el chip, como se explicará con más detalle a continuación.

En diversas realizaciones, una solución tal como una solución de muestra de ADN fluye más allá del sensor óptico.

El detector detecta la modulación en una señal óptica del sensor óptico cuando se detecta un complejo formado entre el ácido nucleico y el DMA.

Los resonadores de anillo ofrecen sensores ópticos altamente sensibles que pueden prepararse para detectar un complejo formado entre el ácido nucleico y el DMA. El funcionamiento de un resonador de anillo puede comprender cualquier configuración adecuada. En general, el sensor óptico comprende una guía de ondas de entrada/salida que tiene una entrada y una salida y un resonador de anillo dispuesto cerca de una parte de la guía de ondas de entrada/salida que está dispuesta entre la entrada y la salida. La proximidad facilita el acoplamiento óptico entre la guía de ondas de entrada/salida y el resonador de anillo, que también es una guía de ondas. En este ejemplo, la guía de ondas de entrada/salida es lineal y el resonador de anillo es circular, de modo que la luz que se propaga en la guía de ondas de entrada/salida desde la entrada a la salida se acopla al resonador de anillo y circula en él. También son posibles otras formas para la guía de ondas de entrada/salida y el resonador de anillo.

En diversas realizaciones, la luz inyectada en la entrada de la guía de ondas incluye un intervalo de longitudes de onda, por ejemplo, desde una fuente de luz de banda estrecha que tiene un pico de banda estrecha que se barre con el tiempo (o desde una fuente de luz de banda ancha tal como un diodo superluminiscente). De manera similar, un espectro de salida asume la forma de una salida de guía de ondas. Una parte de este espectro de salida puede expandirse en una gráfica de intensidad frente a longitud de onda en la distribución espectral en la longitud de onda de resonancia del resonador de anillo.

Otras configuraciones son posibles, por ejemplo, otras capas pueden añadirse (o eliminarse) o modelarse de manera diferente. Una parte del sustrato puede tener una guía de ondas lineal y un resonador de anillo formado sobre ella puede ser parte de un chip óptico integrado más grande.

Como es bien sabido, la luz se propaga dentro de las guías de onda a través de la reflexión interna total. La guía de ondas admite modos que producen un patrón de intensidad que varía espacialmente a través de la guía de ondas. Una parte del campo eléctrico y de la energía óptica conocida como la "cola" evanescente se encuentra fuera de los límites de la guía de ondas. Un objeto ubicado cerca de la guía de ondas, por ejemplo, dentro de esta longitud de campo evanescente, afecta a la guía de ondas. En particular, los objetos dentro de esta proximidad cercana a la guía de ondas afectan al índice de refracción de la guía de ondas. El índice de refracción, n , puede ser diferente cuando un objeto de este tipo se adhiere estrechamente a la guía de ondas o no. En diversas realizaciones, por ejemplo, la presencia de un objeto aumenta el índice de refracción de la guía de ondas. De esta manera, el sensor óptico puede verse perturbado por la presencia de un objeto en las inmediaciones de la estructura de la guía de ondas, permitiendo de este modo la detección. En diversas realizaciones, el tamaño de la partícula es aproximadamente la longitud del campo evanescente para mejorar la interacción entre ellos.

En el caso del resonador de anillo, un aumento en el índice de refracción, n , aumenta la longitud de la trayectoria óptica recorrida por la luz que circula alrededor del anillo. Las longitudes de onda más largas pueden resonar en el resonador y, por lo tanto, la frecuencia de resonancia se desplaza a una frecuencia más baja. Por lo tanto, el desplazamiento en las longitudes de onda resonantes del resonador se puede monitorizar para determinar si un objeto se ha ubicado cerca del sensor óptico (por ejemplo, el resonador de anillo y/o una región de la guía de ondas lineal más cercana al resonador de anillo). Un acontecimiento de unión, con lo que un complejo formado entre el ácido nucleico y el DMA, se puede detectar de este modo obteniendo la salida espectral a partir de la salida de la guía de ondas e identificando las bajadas de intensidad (o picos de atenuación) en ella y el desplazamiento de estas caídas de intensidad.

En diversas realizaciones, la guía de ondas y/o el resonador de anillo comprenden silicio. En algunas realizaciones, la superficie de la guía de ondas puede estar pasivada de forma nativa con dióxido de silicio. Como resultado, la química del siloxano estándar puede ser un método eficaz para introducir diversos restos reactivos en la guía de ondas, que a continuación se usan para fijar de manera covalente el complejo a través de una serie de reacciones de bioconjugado estándar.

Además, la guía de ondas lineal, el resonador de anillo y/o los componentes ópticos en chip adicionales pueden fabricarse fácilmente en obleas de silicio sobre aislante (SOI) relativamente baratas que usan métodos de fabricación de semiconductores bien establecidos, que son extremadamente escalables, rentables y altamente reproducibles. Además, estos dispositivos pueden fabricarse fácilmente y las complicaciones debidas a la vibración se reducen en comparación con las cavidades "independientes". En una realización ejemplar, las obleas SOI de 8" pueden contener, cada una, aproximadamente 40.000 resonadores de anillo direccionables individualmente. Una ventaja de usar tecnología basada en silicio es que diversas realizaciones pueden operar en la ventana de transparencia de Si de aproximadamente $1,55 \mu\text{m}$, una longitud de onda de telecomunicaciones óptica común, lo que significa que los láseres y detectores están disponibles en el mercado comercial como componentes listos para funcionar.

En diversas realizaciones el sistema comprende un resonador de microanillo de silicio para el análisis sin marcadores y el aislamiento de ácido nucleico, tal como el ADN metilado del ADN genómico de muestras de cáncer en un dispositivo en fase sólida. El análisis de metilación del ADN es de gran importancia para la investigación del cáncer y las clínicas, ya que permite un diagnóstico temprano del cáncer antes del punto de metástasis. Para

analizar la metilación del ADN, el factor más importante para la detección de la metilación del ADN es el aislamiento y el análisis del ADN metilado a partir del ADN genómico completo usando métodos de alta sensibilidad y especificidad. Los informes recientes sugieren que se pueden usar resonadores de microanillo basados en silicio altamente sensibles para detectar biomoléculas (por ejemplo, proteínas, ADN metilado, ácidos nucleicos) monitorizando un desplazamiento en la longitud de onda resonante.

En diversas realizaciones, la luz puede dirigirse a una entrada de la primera guía de ondas de entrada/salida y, dependiendo del estado del primer resonador de anillo y la longitud de onda de la luz, puede dirigirse a una salida de la primera guía de ondas, o puede dirigirse hacia una segunda guía de ondas. Por ejemplo, para las longitudes de onda resonantes del primer resonador de anillo, la luz se puede acoplar a la segunda guía de ondas en lugar de salir desde la primera guía de ondas en la salida. La luz acoplada a la segunda guía de ondas desde el primer resonador de anillo puede dirigirse a una salida de la segunda guía de ondas o hacia la tercera guía de ondas, dependiendo del estado del tercer resonador de anillo. Por ejemplo, para las longitudes de onda resonantes del tercer resonador de anillo, la luz puede acoplarse a la tercera guía de ondas y luego emitirse en una ubicación de salida. En el caso en el que la fuente de luz que dirige la luz hacia la primera guía de ondas de entrada/salida comprende una fuente de luz de banda ancha, tal como un diodo superluminiscente que genera un espectro de banda ancha, la luz mencionada anteriormente puede ser un componente de longitud de onda del espectro más amplio.

Se pueden usar otras configuraciones. Se puede usar un láser sintonizable u otra fuente de luz sintonizable como fuente de entrada y la longitud de onda de la salida del láser sintonizable puede ser barrida. Como alternativa, se puede usar una fuente de luz de banda ancha tal como un diodo superluminiscente.

Se pueden añadir más resonadores de anillo. Adicionalmente, los resonadores de anillo pueden posicionarse de forma diferente entre sí y con respecto a la guía de ondas de entrada/salida.

Diversas realizaciones de resonadores de anillo y posiblemente otras geometrías hacen circular repetidamente la luz alrededor de, por ejemplo, su perímetro, aumentando drásticamente la longitud de la trayectoria óptica. Además, la interferencia entre los fotones que circulan en la estructura y los que atraviesan la guía de ondas adyacente crea una cavidad resonante de un ancho de línea espectral extraordinariamente estrecho que da como resultado un dispositivo de alto Q. Las longitudes de onda de resonancia resultantes son bastante sensibles a los cambios en el índice de refracción local. Como se describe en el presente documento, esta sensibilidad permite que los sensores detecten masas pequeñas.

Por lo tanto, el concepto propuesto podría ser muy útil para el análisis de metilación del ADN en la investigación del cáncer y las aplicaciones clínicas.

Ejemplos

Chips del resonador de microanillo de silicio, oblea SOI de 200 nm con una capa de silicio superior de 220 nm de espesor y capas de óxido enterradas de 2 μm de espesor por litografía UV profunda de 248 nm se adquirieron comercialmente, a continuación las guías de onda y las rejillas se modelaron sobre ellos grabadas en la capa de óxido enterrada mediante un proceso de grabado por ion reactivo (RIE), seguido por el depósito de 1,5 μm de PECVD SiO₂ como capa de revestimiento superior. Un conjunto de microanillos consistía en cuatro anillos que estaban conectados a una guía de ondas de entrada común (a través) y cada anillo tenía una guía de ondas de salida dedicada (caída). Tres de los cuatro anillos se usaron como anillos sensores donde las ventanas se abrieron sobre un anillo sensor individual seleccionado mediante la combinación de grabado seco y húmedo. Uno de los anillos se usó como un sensor de referencia para monitorizar la deriva inducida por la temperatura. Los anillos son anillos de estilo de pista de carreras con un radio de 5 μm , la longitud de acoplamiento varió entre 2 y 2,042 μm para evitar la superposición espectral de resonancias. Las señales de salida de los tres anillos se recogieron a través de un acoplador de rejilla vertical a una sonda de fibra óptica monomodal. El espectro de pérdida de inserción (IL) se midió con el sistema de prueba de componente pasivo DWDM IQS-12004B de EXFO.

En primer lugar, se usó DMA (adipimidato de dimetilo) como agente químico para capturar el ADN metilado en un resonador de microanillo de silicio, que se monitorizará y analizará la unión del ADN metilado en tiempo real. El DMA se ha descrito como un nuevo agente antiadherente mediante el uso de reactivos de reticulación bifuncionales, que se sabe que enlazan de manera covalente los grupos amino libres en los polipéptidos. Después de capturar el ADN metilado con el DMA, el ADN metilado se eluye con bicarbonato de sodio (pH 10,6). A continuación, se realiza una PCR específica para la metilación después de la modificación con bisulfito para verificar la eficiencia del aislamiento del ADN metilado (figura 1, punto negro y redondo). El protocolo fue modificado a partir de los descritos anteriormente. En resumen (figura 2, #1), el dispositivo se trató primero con plasma de oxígeno. A continuación se sumergió en una solución al 2% de 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES) en una mezcla de etanol/H₂O (95%/5%, v/v) durante 2 horas y luego se enjuagó con etanol y agua desionizada. A continuación se secó bajo una corriente de nitrógeno y se calentó a 120°C durante 15 minutos para endurecer los chips.

El ADN genómico se extrajo de líneas celulares de cáncer (T24 y MCF7) usando proteinasa K y el kit QIAamp DNA Mini Kit (Hilden, Alemania). La línea celular T24, una línea epitelial derivada de células transicionales de vejiga urinaria humana, y la línea celular MCF7, una línea epitelial derivada de células de la glándula mamaria humana, se

usaron para la extracción de ADN genómico. Las líneas celulares de cáncer se adquirieron de la ATCC (Colección Estadounidense de Cultivos Tipo, Manassas, VA).

Los chips sensores se incubaron a continuación con una mezcla de 1 μg del ADN genómico y DMA (10 mg/ml) en PBS durante 30 minutos. El desplazamiento de longitud de onda se recogió cada 5 minutos hasta 30 minutos después de la hibridación. Después de la unión, el exceso de diana de ADN se enjuagó de la superficie lavando el chip dos veces durante 10 minutos cada vez con tampón PBS y se midió. Finalmente, el ADN metilado permaneció en la superficie y luego el ADN metilado se eluyó con bicarbonato de sodio (pH 10,6).

Como alternativa, para la comparación, la proteína MBD se usó para capturar el ADN metilado en fase sólida (figura 2, #2), no en fase de solución. En resumen, la superficie del sensor se funcionalizó primero con APTES, como se ha descrito anteriormente. El chip sensor se incubó luego con 1 mg/ml de NHS-biotina en agua desionizada durante 1 hora y se enjuagó con agua desionizada. El ensayo de unión entre biotina y estreptavidina se realizó aplicando una solución de estreptavidina en PBS (190 pM-950 nM). Los chips sensores se incubaron luego con una mezcla de 1 μg del ADN genómico y la mezcla de proteínas Biotina-MBD en PBS durante 30 minutos. El desplazamiento de longitud de onda se recogió cada 5 minutos hasta 30 minutos después de la hibridación. Después de la unión, el exceso de diana de ADN se enjuagó de la superficie lavando el chip dos veces durante 10 minutos cada vez con tampón PBS y se midió. Finalmente, el ADN metilado permaneció en la superficie y luego el ADN metilado se eluyó con bicarbonato de sodio (pH 10,6). Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

La figura 3 muestra resultados experimentales para el método. El ADN genómico extraído de líneas celulares de cáncer tales como T24 (vejiga) y MCF7 (mama) se usó para el aislamiento del ADN metilado usando el dispositivo en fase sólida (figura 4B). El desplazamiento de longitud de onda se observó mucho cuando se añadió la muestra y la mezcla del ADN metilado y DMA formó un complejo sobre la superficie de la fase sólida funcionalizada (figura 3A). A continuación, el desplazamiento se redujo parcialmente lavando con PBS debido a la eliminación del exceso de ADN.

El ADN aislado se unió a la superficie por enlace covalente después del lavado. Finalmente, el ADN se recogió mediante bicarbonato de sodio para el análisis de ADN. El ADN eluido del ADN genómico extraído con T24 se usó para el análisis genético y epigenético a través de PCR convencional y específica de metilación (MS)-PCR. Con el fin de verificar la eficacia del método, se realizó una PCR específica de metilación para la detección de la metilación del ADN del gen RAR β usando el ADN metilado aislado. Los resultados mostraron que la banda de PCR es más intensa en el método (#1) que en el método convencional (figura 3B).

En resumen, se describen nuevos métodos para el aislamiento y el análisis del ADN metilado en un dispositivo en fase sólida, incluidos los resonadores de microanillo de silicio. El DMA es un agente químico para capturar el ADN metilado con alta especificidad en dispositivos en fase sólida. Los métodos pueden proporcionar no solo una alta eficiencia del aislamiento del ADN metilado, sino también la monitorización del análisis del ADN metilado en forma libre y en tiempo real. El método podría ser muy útil para el análisis de metilación del ADN en la investigación del cáncer y aplicaciones clínicas.

Para dilucidar el efecto de DMA como un reactivo de extracción basado en fase sólida, se realizó una amplificación de ADN basada en PCR usando el ADN purificado o extraído a través del método de DMA. Todos los cebadores usados para la PCR convencional, MS-PCR y PCR en tiempo real de los genes (RAR β , HRAS y Actina) son conocidos en la técnica. La PCR convencional y la MS-PCR se realizaron para verificar la eficiencia de la técnica propuesta para el análisis genético y epigenético. Para la conversión de bisulfito del ADN antes de la operación de MS-PCR, se usaron 50 μl de ADN purificado mediante la técnica propuesta o 1 μg del ADN genómico extraído de la línea celular T24 (ATCC), una línea celular epitelial derivada de células transicionales de vejiga urinaria humana, y el kit de modificación de ADN CpGenome (Millipore, Billerica, MA). La línea celular de cáncer de vejiga humana T24 se mantuvo en placas de cultivo de plástico con medio Eagle modificado por Dulbecco con alto contenido de glucosa (DMEM, Life Technology) suplementado con un 10 % de suero fetal de ternera (FCS) en una incubadora húmeda a 37 °C con un 5 % de CO₂ ambiental. Se cultivaron las líneas celulares de cáncer y luego se extrajo el ADN genómico usando un tampón AL con proteinasa K de un kit QIAmp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania). En resumen, para el análisis genético del gen HRAS, se amplificaron 2 μl del ADN eluido de cada muestra, tal como el complejo, DMA solo, y el ADN solo en un volumen total de 25 μl que contenía 1 \times tampón de PCR (Qiagen, Hilden, Alemania), MgCl₂ 2,5 mM, trifosfato de desoxinucleótido 0,25 mM, 25 pmol de cada cebador (para el gen HRAS) y 1 unidad de ADN polimerasa Taq (Qiagen, Hilden, Alemania) a 95 °C durante 15 minutos; 35 ciclos de 95 °C durante 30 s, 60 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s; y una etapa de alargamiento final a 72 °C durante 7 minutos. Para el análisis epigenético del gen RAR β , se amplificaron 2 μl de ADN modificado con bisulfito convencional (sin etapa de purificación) o el método de DMA propuesto en un volumen total de 25 μl que contenía 1 \times tampón de PCR (Qiagen, Hilden, Alemania), MgCl₂ 2,5 mM, trifosfato de desoxinucleótido 0,25 mM, 25 pmol de cada cebador (para el gen RAR β) y 1 unidad de ADN polimerasa Taq (Qiagen, Hilden, Alemania) a 95 °C durante 15 minutos; 45 ciclos de 95 °C durante 30 s, 59 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s; y una etapa de alargamiento final a 72 °C durante 7 minutos. Los amplicones de PCR se visualizaron por electroforesis en gel, que se usó para separar los productos de PCR en un gel de agarosa al 2% que contenía bromuro de etidio (EtBr) (Sigma-Aldrich). El gel se visualizó utilizando un sistema Doc Doc (Bio-Rad). La intensidad de la banda fue calculada por Image J (Instituto Nacional de Salud, EE.

UU.). La determinación de la concentración de ADN y la pureza se realizó mediante espectrofotómetro UV. Se realizó una PCR en tiempo real para verificar la eficiencia de los 3 métodos de extracción diferentes.

El modelo diana para RT-PCR se obtuvo a partir de ADN genómico humano extraído de muestras de sangre completa o de orina. Para la PCR en tiempo real, el siguiente procedimiento se modifica a partir del protocolo suministrado con LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics). En resumen, se amplificaron 5 μ l de ADN en un volumen total de 20 μ l, que contenía 4 μ l de la mezcla maestra LightCycler FastStart DNA, 25 pmol de cada cebador y 2 μ l de modelo de ADN. Un ciclo inicial de preincubación de 95 °C durante 10 minutos fue seguido por 45 ciclos a 95 °C durante 10 s, y 60 °C durante 30 s (para los genes HRAS y Actina); y mediante una etapa de enfriamiento a 40 °C durante 30 s. Los productos amplificados con señales SYBR Green se llevaron a cabo en un LightCycler 2.0.

La técnica de DMA en chips microfluídicos se comparó con 2 métodos de extracción de ADN diferentes (QIAmp DNA mini kit en fase de solución y un reactivo caotrópico (etanol) en un microprocesador) para validar la eficiencia del reactivo DMA en SPE de ADN de muestras de sangre completa y orina humanas en microchips (figura 4A). En primer lugar, se usaron 2 μ l de sangre completa (con 8 μ l de PBS) o 10 μ l de orina (sin ajuste de pH) para la extracción de ADN en chips microfluídicos. Para obtener el ADN extraído, se siguió el proceso que consiste en cinco etapas: (1) filtrar y separar las células según su tamaño, (2) lisar las células, (3) unir el ADN con un reactivo caotrópico o DMA, (4) lavar y purificar el ADN, y (5) eluir el ADN con agua destilada o con tampón de elución. Después de la elución del ADN extraído, se midió la pureza del ADN extraído mediante las 3 técnicas diferentes, determinando la relación de las densidades ópticas de las muestras a 260 nm (ADN) y 280 nm (proteína). La calidad del ADN de la técnica de DMA tanto en sangre como en orina fue la pureza inducida estadísticamente significativa para la muestra ($p < 0,001$) en comparación con la obtenida del método caotrópico basado en etanol. De hecho, dado que el medio de la orina es relativamente limpio y contiene pocas proteínas en comparación con la sangre, se esperaba que la efectividad de la SPE basada en DMA en la calidad del ADN extraído de la muestra de sangre respecto a otros métodos fuera más pronunciada que la de la muestra de orina. En contraste con lo esperado, el ADN altamente purificado mediante la técnica propuesta se obtuvo tanto de la sangre completa como de las muestras de orina. Se supone que esto se debe a que el DMA se une estrechamente con las moléculas de ADN extraídas de las muestras de fluidos durante la etapa de lavado para eliminar otras moléculas tales como restos celulares, proteínas, etc., en comparación con el método caotrópico. A continuación, el ensayo de amplificación se realizó con el ADN extraído utilizando RT-PCR. Los genes HRAS y Actina se utilizaron como dianas genéticas y se amplificaron en todas las muestras de ADN extraídas mediante el uso de las 3 técnicas diferentes. Se demostró que la cantidad y la calidad del ADN extraído con la técnica basada en DMA fueron mayores que la obtenida por los otros métodos. Para PCR en tiempo real, (RT)-PCR, se usaron 2 μ l de extracto de ADN de los grupos de muestras de ADN total sin ninguna cuantificación para imitar la situación real del sistema de análisis micro total en el que es más probable que el ADN extraído del dispositivo se use directamente como modelo diana sin ninguna cuantificación para el análisis genético en entornos clínicos. Por lo tanto, la señal de fluorescencia SYBR en uso del kit QIAmp DNA mini kit (ADN extraído de 200 μ l de sangre completa u orina) parece estar saturada a un valor de Ct (umbral de ciclo) anterior a otros. Se observó que los biomarcadores de ADN (HRAS, actina) para el análisis genético se amplificaron con buena calidad y cantidad usando la técnica basada en DMA. Por lo tanto, la técnica de DMA propuesta en este estudio puede ser útil para la extracción de ADN en fase sólida con alta calidad de un pequeño volumen de fluidos corporales humanos en un sistema de microchips.

40 Diseño y fabricación de dispositivos microfluídicos de silicio

Para ensayar el método basado en DMA en un entorno de microchip, se usaron dispositivos microfluídicos de extracción de ADN basados en silicio. La estructura y fabricación de los dispositivos microfluídicos de extracción de ADN son conocidas. El chip microfluídico de silicio comprende tres componentes, que incluyen (1) parte de prefiltración para la separación de células; (2) micromezclador que consiste en un mezclador espiral de dos etapas para la lisis celular; y (3) un microcanal con forma de meandro para el método basado en DMA para la maximización del área superficial de SiO₂, que se estima en más de 60 mm². Los chips microfluídicos se fabricaron usando un proceso de grabado por iones reactivos (RIE) en la parte frontal del sustrato de silicio superpuesto con SiO₂ térmico de 2 μ m de espesor como una capa de enmascaramiento dura. Para formar las interconexiones fluidas, se aplicó un proceso de grabado húmedo con hidróxido de potasio (KOH) en la parte posterior del sustrato de silicio sobrepuesto con una capa de enmascaramiento compuesta de nitruro de silicio (Si₃N₄) depositada por depósito químico en fase de vapor a baja presión (LPCVD) sobre una capa térmica de SiO₂. Con la capa de película fina de SiO₂ restante en la superficie del microcanal, se realizó un proceso de unión anódica con un sustrato de vidrio Pyrex para tapan el canal abierto. El tamaño total de cada dispositivo microfluídico fabricado es de 16 mm × 12 mm × 1,2 mm.

El flujo de proceso del dispositivo microfluídico para la extracción de ADN de fluidos corporales humanos (sangre completa u orina) con un pequeño volumen de muestra incluye las siguientes etapas que se modificaron a partir del protocolo indicado anteriormente 24-35. Los chips microfluídicos están envasados en una carcasa de policarbonato, que incluye juntas tóricas con orificios perforados para la interconexión fluidica de las bombas de jeringa externas a la parte inferior del microchip de silicio. Todas las muestras y reactivos se envían secuencialmente al microchip en el siguiente orden Entrada I - separación: inyectando las muestras en el microfiltro para separar las células por tamaño; Entrada II - secreción: inyectando el tampón AL con proteinasa K para usar como un tampón de lisis en el micromezclador; Entrada III: lavado y elución - inyectando los tampones de lavado (ya sea EtOH o DMA y PBS) para

purificar la muestra; y Salida IV - eluyendo el ácido nucleico de la superficie sólida de silicio. Cuando se usa un método caotrópico (etanol), se inyectó sangre completa con 8 μl de tampón PBS u orina (10 μl) con una bomba de jeringa (KD Scientific, MA) en la entrada I a un caudal de 1,67 $\mu\text{l min}^{-1}$ durante 10 minutos. A continuación, se inyectaron tampones de lisis en la entrada II a un caudal de 3 $\mu\text{l min}^{-1}$ durante 10 minutos, con un aumento en el caudal de la entrada I a 3 $\mu\text{l min}^{-1}$ durante 10 minutos con tampón PBS mediante bombas de jeringa. Se añadió etanol a la entrada III a un caudal de 10 $\mu\text{l min}^{-1}$ durante 10 minutos durante la reacción de lisis. A continuación, el etanol solo se usó secuencialmente para lavar a través del chip a 12,5 $\mu\text{l min}^{-1}$ durante 5 minutos. Finalmente, el ADN extraído se eluyó con agua pura a 12,5 $\mu\text{l min}^{-1}$ durante 10 minutos.

Quando se usó el método de DMA propuesto, la parte del microcanal (entrada III) se recubrió primero con APTES durante 2 h con una bomba de jeringa, y la superficie se lavó con etanol durante 20 minutos. A continuación, la superficie se secó con nitrógeno gaseoso para preparar la reacción. La sangre completa (2 μl) con 8 μl de tampón PBS o la orina (10 μl) se inyectó con una bomba de jeringa en la Entrada I a un caudal de 1,67 $\mu\text{l min}^{-1}$ durante 10 minutos. A continuación se inyectaron tampones de lisis en la entrada II a un caudal de 3 $\mu\text{l min}^{-1}$ durante 10 minutos, y el caudal de la Entrada I se incrementó a 3 $\mu\text{l min}^{-1}$ durante 10 minutos con tampón PBS mediante bombas de jeringa. La solución de DMA (25 mg ml⁻¹) se añadió a la entrada III a un caudal de 10 $\mu\text{l min}^{-1}$ durante 10 minutos durante la reacción de lisis. A continuación, el tampón PBS se hizo pasar secuencialmente a través del chip, a 12,5 $\mu\text{l min}^{-1}$ durante 10 minutos, para deshacerse de moléculas unidas no específicas e inhibidores de la PCR. Finalmente, el ADN extraído se eluyó con tampón de elución a 12,5 $\mu\text{l min}^{-1}$ durante 10 minutos. Además, se usaron 200 μl de sangre completa u orina para la extracción de ADN genómico como material de referencia usando un kit QIAmp DNA mini kit (Hilden, Alemania). Todo el ADN extraído se usó para el análisis genético mediante RT-PCR.

Por "que comprende" se entiende que incluye, pero no se limita a, lo que sigue a las palabras "que comprende". Por lo tanto, el uso del término "que comprende" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden o no estar presentes.

Por "consistente en" se entiende que incluye, y se limita a, lo que sigue a la frase "consistente en". Por lo tanto, la frase "consistente en" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, y que no puede haber otros elementos presentes.

Las invenciones descritas ilustrativamente en el presente documento pueden ponerse en práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, no desvelados específicamente en el presente documento. Así, por ejemplo, los términos "que comprende", "que incluye", "que contiene", etc., se leerán de forma extensiva y sin limitación. Además, los términos y expresiones empleados en el presente documento se han usado como términos de descripción y no de limitación, y no hay intención de usar dichos términos y expresiones para excluir cualquier equivalente de las características mostradas y descritas o partes de los mismos, pero es reconocido que diversas modificaciones son posibles dentro del alcance de la invención reivindicada. Por lo tanto, debe entenderse que aunque la presente invención se ha desvelado específicamente mediante realizaciones preferidas y las características opcionales, los expertos en la materia pueden recurrir a la modificación y la variación de las invenciones realizadas en la presente memoria desveladas en el presente documento, y que dichas modificaciones y variaciones son considerado dentro del alcance de esta invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Por "aproximadamente" en relación con un valor numérico dado, tal como para la temperatura y el período de tiempo, se pretende incluir valores numéricos dentro del 10% del valor especificado.

La invención se ha descrito ampliamente y genéricamente en el presente documento. Cada una de las especies más estrechas y las agrupaciones sub-genéricas que forman parte de la divulgación genérica también forman parte de la invención. Esto incluye la descripción genérica de la invención con una condición o limitación negativa que elimina cualquier objeto del género, independientemente de si el material extirpado se menciona específicamente en el presente documento.

Otras realizaciones están dentro de las siguientes reivindicaciones y ejemplos no limitantes. Además, cuando las características o aspectos de la invención se describen en términos de grupos de Markush, los expertos en la materia reconocerán que la invención también se describe en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo de Markush.

REIVINDICACIONES

1. Un método para el aislamiento y/o el análisis de moléculas de ácido nucleico en un dispositivo en fase sólida que comprende
- 5 (i) incubar una muestra de ácido nucleico con adipimidato de dimetilo (DMA) en condiciones que permiten la formación de un complejo del ácido nucleico con el DMA;
- (ii) poner en contacto el complejo de (i) con una superficie aminada del dispositivo en fase sólida; y
- (iii) aislar el complejo del ácido nucleico con el DMA a partir de la superficie usando una solución de elución a pH elevado y/o analizar el ácido nucleico del complejo.
- 10
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la solución de elución a pH elevado es una solución de elución que tiene un pH > 10.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la muestra de ácido nucleico se extrae con una
- 15 proteasa.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la proteasa es proteinasa K.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el ácido nucleico comprende
- 20 ADN metilado.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el dispositivo en fase sólida es un resonador de anillo.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende además
- (i) determinar una intensidad luminosa de salida medida mediante un detector de un sistema de detección óptico; y
- (ii) determinar un cambio en un índice de refracción efectivo de un resonador del sistema de detección óptico, durante la incubación.
- 30
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que:
- (1) el complejo se modifica en residuos de citosina no metilados;
- (2) el complejo o el complejo modificado es amplificado; y/o (3) el complejo o el complejo modificado es detectado.
- 35
9. Un sistema para aislar una molécula de ácido nucleico de interés en una muestra de ácido nucleico que comprende:
- (i) un compuesto de adipimidato de dimetilo (DMA) para unirse directamente a la molécula de ácido nucleico para formar un complejo entre la molécula de ácido nucleico y el compuesto de DMA;
- 40 (ii) una superficie sólida aminada para la interacción de la molécula de ácido nucleico y el compuesto de DMA para formar el complejo sobre ellas; y
- (iii) una solución de elución a pH elevado,

en el que:

5 (A) la superficie sólida se encuentra en un resonador de anillo que es un sensor de detección óptico, en el que dicho sensor de detección tiene una lectura alterada cuando dicha molécula de ácido nucleico está unida a dicho DMA, de modo que dicho sensor está configurado para detectar el complejo formado entre la molécula de ácido nucleico y el compuesto de DMA; y/o

(B) el sistema no contiene un intermedio proteico reticulado de DMA para unirse a la molécula de ácido nucleico.

10. El sistema de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la solución de elución a pH elevado es una solución de elución que tiene un pH > 10.

10

11. El sistema de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en el que el sistema comprende además una proteasa.

12. El sistema de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la proteasa es proteinasa K.

15 13. El sistema de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el sensor de detección óptico está configurado para resonar a una longitud de onda resonante.

20 14. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 9-13, en el que dicho resonador tiene una longitud de onda resonante que se desplaza cuando dicha molécula de ácido nucleico está unida a dicho DMA, formando dicho complejo.

Figura 1

Flujo de trabajo

Técnica anterior frente a invención

- 1-2) Métodos comerciales
- 3-4) Métodos de la invención

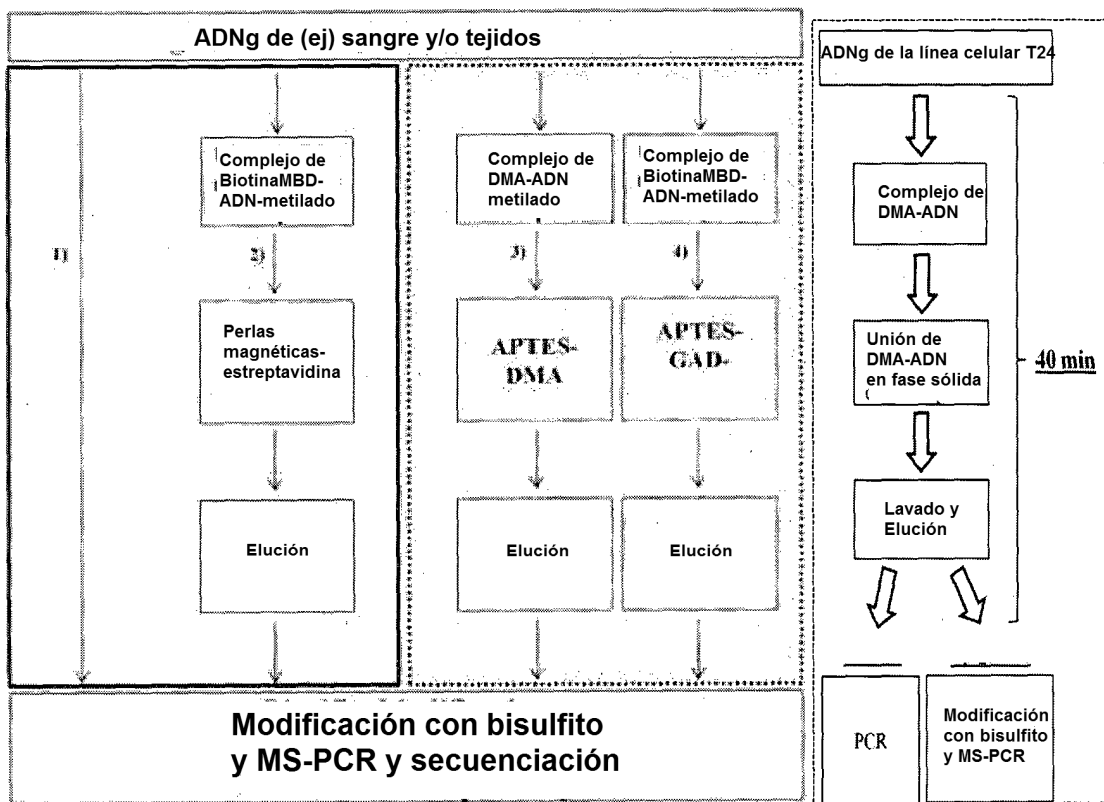
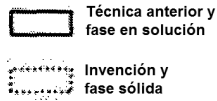
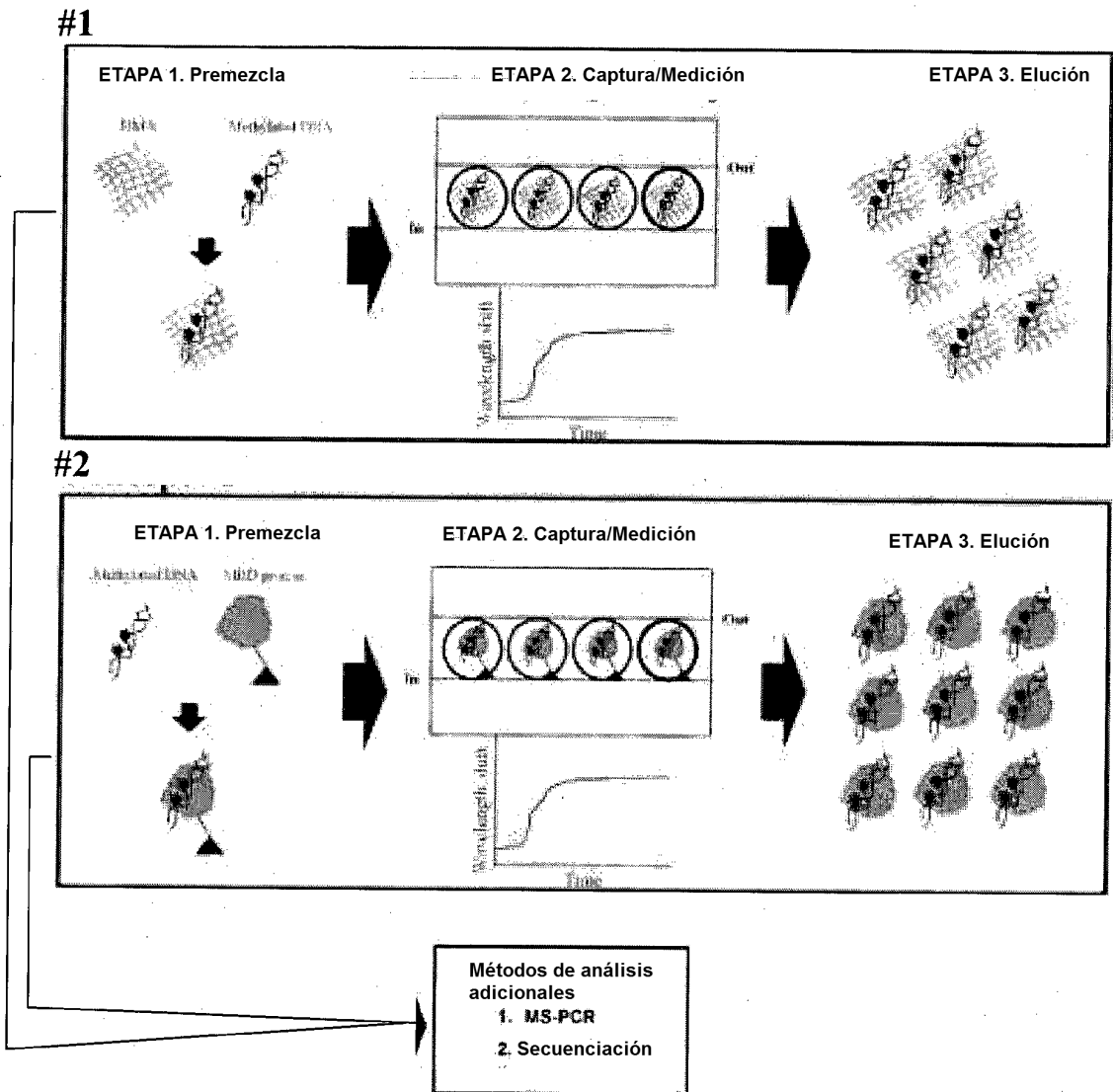
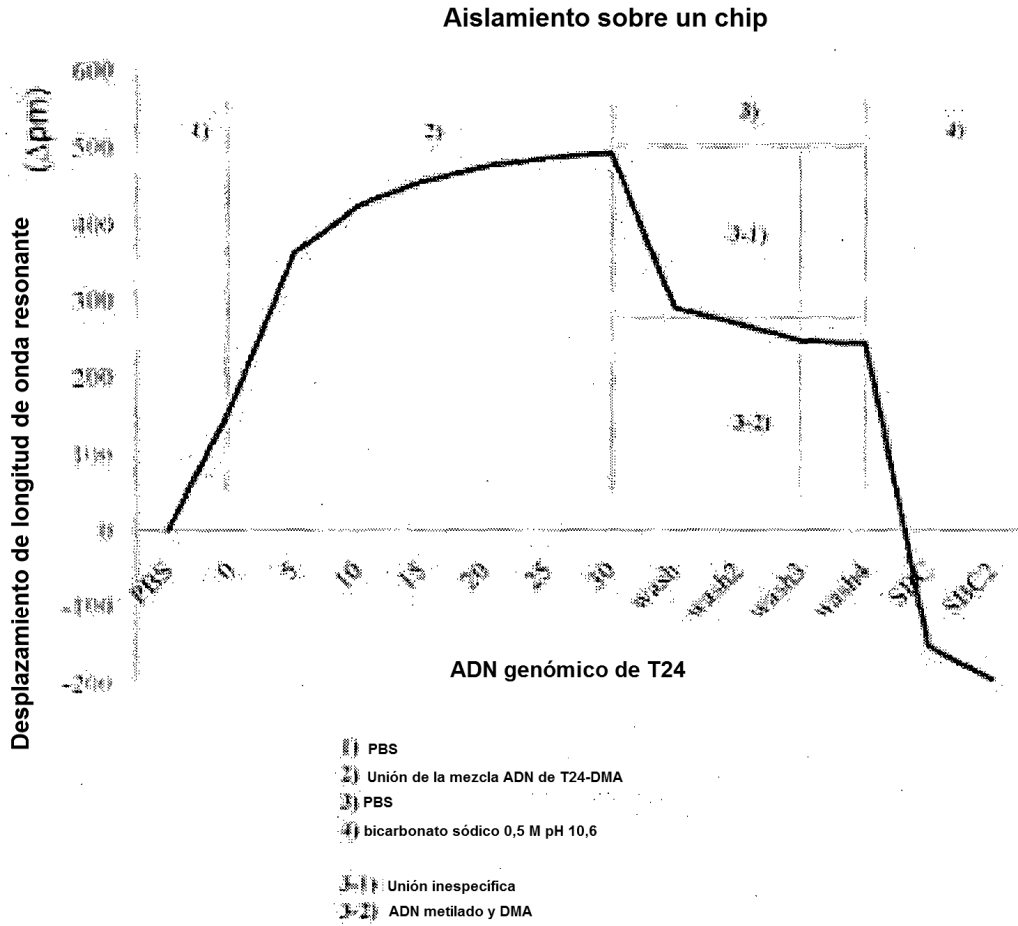


Figura 2



A

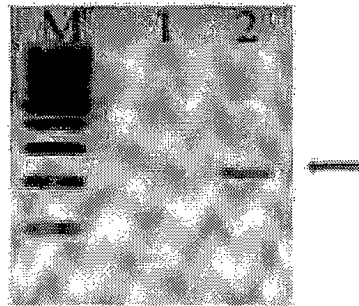
Figura 3



B

Confirmación mediante PCR

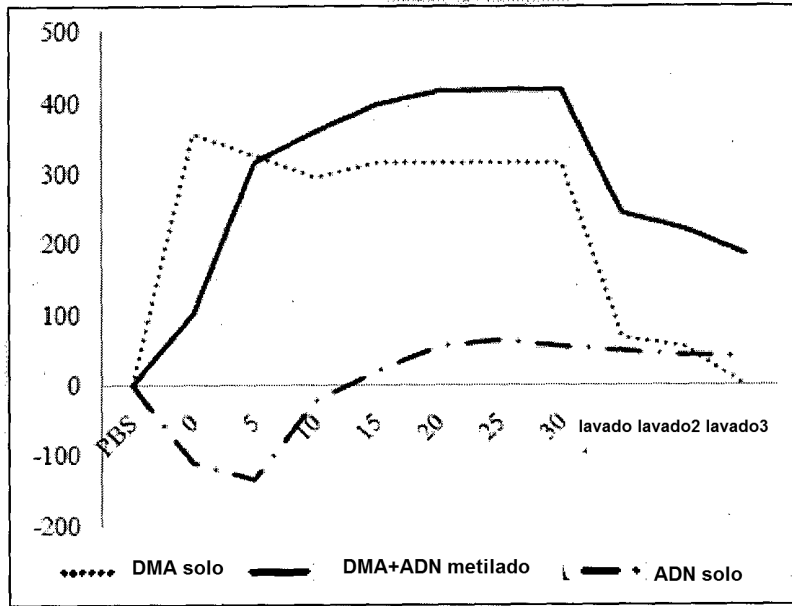
gen RARb



- 1) ADNg de T24
- 2) ADNg de T24 con sistema de chip

Figura 4

A



B

