

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 614**

51 Int. Cl.:

<b>C12M 1/34</b>	(2006.01)
<b>C12M 1/38</b>	(2006.01)
<b>C12M 3/04</b>	(2006.01)
<b>B01L 3/00</b>	(2006.01)
<b>G01N 33/58</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.06.2011 PCT/EP2011/059053**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2012 WO12004062**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2011 E 11726088 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 2591086**

54 Título: **Procedimiento para la hibridación activa en chips de ADN con función desnaturalizadora**

30 Prioridad:  
**06.07.2010 DE 102010030962**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.06.2019**

73 Titular/es:  
**ROBERT BOSCH GMBH (100.0%)  
Postfach 30 02 20  
70442 Stuttgart, DE**

72 Inventor/es:  
**STUMBER, MICHAEL;  
DAUB, MARTINA y  
RUPP, JOCHEN**

74 Agente/Representante:  
**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 717 614 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Procedimiento para la hibridación activa en chips de ADN con función desnaturalizadora

**Estado de la técnica**

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la hibridación activa con una función de desnaturalización separada.

10 Los chips de ADN son conocidos como sistemas de examen biomolecular modernos. De este modo, estos permiten el análisis paralelo de varios miles de pruebas individuales en una pequeña cantidad de materiales de muestra biológicos. Correspondientemente, se han establecido diferentes formas de chips de ADN que se dividen según el tipo de sus interacciones. A estos pertenecen, por un lado, chips de ADN con base de ácido nucleico que, por ejemplo, sirven para comprobar DNA, mRNA o rRNA de determinados genes de organismos. Para ello se imprimen cDNA, oligonucleótidos o fragmentos de productos PCR, que son complementarios al mRNA, en materiales de soporte (*spotted microarrays*, chips de ADN de dos canales). En los "chips de ADN-oligonucleótidos" se aplican oligonucleótidos sintéticos, por ejemplo, sobre soporte de vidrio. Los oligonucleótidos que funcionan como sondas generan sobre los soportes una densidad de información lo más grande posible en el espacio más reducido, de manera similar a un chip informático, de modo que los chips de ADN se denominan también "chips genéticos" o "biochips".

15 Como formas de realización alternativas se conocen chips de proteína que, por ejemplo, comprueban interacciones antígeno-anticuerpo, encima-sustrato, receptor-proteína u otras interacciones proteína-proteína. También pueden comprobarse y cuantificarse enlaces de ácidos nucleicos con proteínas.

20 En el uso de chips de ADN en la microbiología, las biomoléculas de una muestra, por regla general preparada y previamente tratada, se ponen en el chip de ADN, donde en puntos individuales (*spots*) se producen reacciones de enlace específicas, que entonces proporcionan información sobre la presencia de determinadas moléculas como, por ejemplo, fragmentos de ADN, en la muestra. Es requisito para esta reacción de enlace la presencia de DNA o RNA como moléculas de cadena sencilla, de modo que es imprescindible una etapa de desnaturalización anterior.

25 En el marco de la progresiva automatización generalizada, hay una pluralidad de planteamientos para realizar el mayor número posible de etapas individuales del análisis dentro de una unidad de dispositivo para ahorrar tiempo y costes. En este sentido, se emplean, entre otras cosas, microbombas con las que se transportan los volúmenes de muestra extremadamente pequeños dentro de las unidades de dispositivo, véase al respecto, por ejemplo, el documento US 2004/0141856A1.

30 El verdadero procedimiento de enlace o la hibridación con las sondas del chip de ADN puede durar a su vez varias horas, pues el movimiento de las partículas sigue el movimiento molecular browniano y, por tanto, solo tiene lugar de forma lenta. Además, de esta forma solo una parte de las moléculas diana presentes en la muestra alcanza la correspondiente estructura receptora, es decir, las sondas.

35 Por el documento US 2004/0009525 A1 se conoce un chip de ADN para la detección de genes mediante el uso de sustratos de muestra de ácido nucleico.

Por el folleto de patente US 5,587,128 y el folleto de patente US 6,660,517 B1, que procede del primero por división, se conocen dispositivos para la amplificación de poliglútidios seleccionados previamente.

Por el documento US 2004/0141856 A1 se conoce un dispositivo con un microrreactor y una microbomba para la realización de procesos PCR térmicos.

40 Por el documento EP 1 652 912 A1 se conoce también un microrreactor para el examen de material biológico.

**Divulgación de la invención**

45 Es objetivo de la invención proporcionar un procedimiento que comprenda la desnaturalización de las biomoléculas, por ejemplo, la fusión de los ácidos nucleicos presentes como moléculas de doble cadena en moléculas de cadena sencilla, así como el enlace de las biomoléculas desnaturalizadas con las sondas del chip de ADN y acelere la verdadera hibridación sin que afecte negativamente a la sensibilidad de los análisis.

Por lo tanto, es objeto de la presente invención un procedimiento para la hibridación activa en al menos una sonda de un chip de ADN, que comprenda las siguientes etapas:

a) preparar un líquido de muestra con componentes reactivos,

50 b) introducir el líquido de muestra en una ruta de bomba con al menos una unidad de bomba, al menos una unidad de desnaturalización controlada por temperatura y al menos una zona de reacción controlada por temperatura con al menos un chip de ADN, separada físicamente de la unidad de desnaturalización,

c) bombear el líquido de muestra,

d) desnaturalización de los componentes reactivos del líquido de muestra en la unidad de desnaturalización e

e) hibridación de los componentes desnaturalizados en al menos una sonda del chip de ADN en la zona de reacción.

5 La hibridación tiene lugar en el chip de ADN, en general, mediante movimiento de difusión de las biomoléculas en el líquido de muestra. Este movimiento de difusión puede favorecerse mediante sacudida o vibración del líquido de muestra. Para ello se conocen diferentes sistemas como, por ejemplo, el *Maui@Mixer* de *BioMicro Systems Inc.* El procedimiento según la invención ofrece, en cambio, la decisiva ventaja de que el proceso de difusión se favorece mediante movimientos de bombeo del líquido de muestra. Mediante el bombeo, puede generarse un flujo uniforme y controlado del líquido de muestra que permite que sobre las sondas se mantenga siempre una cantidad suficiente de partículas ligantes. Se contrarresta, por lo tanto, un empobrecimiento de partículas ligantes, que siempre se produce en procesos controlados por difusión. La zona de reacción con el chip de ADN puede recibir directamente el flujo del líquido de muestra o estar dispuesta dentro de una cámara de reacción. En cualquier caso, debe garantizarse un flujo uniforme y controlado sobre la o las sondas del chip de ADN. La zona de reacción puede estar equipada además con varios chips de ADN en los que estén dispuestas en cada caso una o varias sondas.

10 Según la invención, la ruta de bomba está dispuesta como circuito, lo que favorece adicionalmente el flujo uniforme y controlado del líquido de muestra sobre las sondas del chip de ADN. La velocidad de bombeo está diseñada de tal manera, que la muestra fluye a pocos mm/min en la zona de reacción. Esto favorece la reacción de hibridación, en otro caso, limitada por difusión. Por ejemplo, la reacción de hibridación con ácidos nucleicos transcurre aproximadamente a 54°C.

15 Otros efectos positivos resultan de que la unidad de desnaturalización está separada físicamente de la zona de reacción, de modo que puede efectuarse en primer lugar una desnaturalización de las moléculas de cadena sencilla. En el caso de ácidos nucleicos, el líquido de muestra es llevado a la fusión de las moléculas de doble cadena en moléculas de cadena sencilla en un rango elevado de temperatura (por ejemplo, 94°C). La presencia de los ácidos nucleicos presentes en la muestra como moléculas de cadena sencilla es un requisito para el subsiguiente enlace con las sondas del chip de ADN (hibridación) en la zona de reacción dispuesta a continuación. La velocidad, así como la sensibilidad de las reacciones de enlace con los puntos del chip de ADN mejoran mediante el aumento de las moléculas de cadena sencilla disponibles. Este es el caso particularmente cuando la ruta de bomba está construida de manera circular y los ácidos nucleicos, que se presentan de nuevo o todavía como moléculas de cadena doble, se alimentan cíclicamente a una nueva desnaturalización y subsiguiente hibridación. Por lo tanto, las moléculas aún no ligadas pueden enlazarse en una siguiente ronda con las sondas del chip de ADN.

20 En cualquier caso, mediante el presente procedimiento, se desplaza el equilibrio de enlace de las biomoléculas y se aumenta la sensibilidad del análisis, de modo que también se posibilita la comprobación de pocas biomoléculas en un volumen de muestra.

25 La separación física de la unidad de desnaturalización de la zona de reacción hace posible el ajuste de condiciones optimizadas para las correspondientes reacciones. En este sentido, en particular el ajuste de una temperatura óptima para las correspondientes biomoléculas tiene una importancia crucial. Por ejemplo, para la desnaturalización de ácidos nucleicos se eligen rangos de temperatura de al menos 90°C, preferiblemente de 94 a 98°C. Para la reacción de hibridación de ácidos nucleicos se mantiene la temperatura en la zona de reacción, por ejemplo, a 54°C. Es importante en cualquier caso el control de temperatura independiente en la unidad de desnaturalización y en la zona de reacción.

30 En otra forma de realización, entre la desnaturalización de las biomoléculas en la unidad de desnaturalización y la hibridación en la zona de reacción, está prevista una etapa de enfriamiento, de modo que se pueda asegurar que las biomoléculas desnaturalizadas entran con una temperatura óptima en la zona de reacción. El enfriamiento puede realizarse con ayuda de un recorrido de enfriamiento correspondientemente diseñado.

35 Para la regulación de la temperatura de la desnaturalización y/o unidad de hibridación pueden emplearse diferentes métodos (por ejemplo, calentador de resistencia, calentador de infrarrojos, ventilador de aire caliente y/o elementos Peltier). Puesto que la hibridación en la zona de reacción discurre, en general, a temperaturas más bajas, debe asegurarse que el volumen de muestra procedente de la ruta de bomba posea la temperatura objetivo deseada cuando desemboque en la zona de reacción. La zona de reacción dispone, por tanto, de un control de temperatura fiable y, dado el caso, puede temperarse igual que la unidad de desnaturalización.

40 Puesto que la reacción de hibridación discurre, en general, a temperaturas más bajas que la reacción de desnaturalización, es importante un enfriamiento de la muestra a una determinada temperatura de hibridación. En un primer rango de temperatura, las biomoléculas se desnaturalizan y se separan o se funden. Con un segundo rango

de temperatura, más bajo en comparación con el primer rango de temperatura, se garantiza la hibridación con las sondas del chip de ADN y se supervisa por medio de un control de temperatura optimizado.

5 Junto a una estructura como sistema de multicomponentes, el procedimiento puede realizarse de una forma particularmente ventajosa como sistema *lab on a chip* que, por ejemplo, se forman a partir de determinados polímeros como sustrato portador. A este respecto, la implementación de la función de bombeo puede efectuarse mediante diferentes bombas. Para una aplicación en el presente procedimiento, son apropiadas, sobre todo, microbombas integradas en el chip, por ejemplo, microbombas de membrana o microbombas peristálticas. Como bombas que funcionan de forma externa pueden emplearse, por ejemplo, bombas de jeringa o bombas peristálticas. Se describen bombas de este tipo, por ejemplo, en el documento DE 10 2008 002 336 A1 y pertenecen al estado de la técnica.

En otra forma de realización la unidad de desnaturalización y la unidad de bombeo están conformadas como una unidad estructural. A este respecto, se realiza el control de temperatura mediante una bomba calefactable.

15 Alternativamente a esto, se presenta la unidad de desnaturalización como canal meándrico, que se puede calentar a la temperatura necesaria para la desnaturalización. En una estructura tal es particularmente ventajoso el mezclado de la muestra dentro del circuito. Mediante la homogeneidad mejorada, asociada a ello, de la muestra, mejora también la verdadera reacción de hibridación. El canal meándrico presenta, preferiblemente, una microestructura, de modo que también este componente puede realizarse en un sistema *lab on a chip*.

20 En otra forma de realización, la zona de reacción está conectada con una segunda ruta de bomba, por medio de la cual pueden alimentarse a la zona de reacción líquidos de reacción y/o líquidos de lavado necesarios para la hibridación. En una forma de realización particular, la ruta de bomba adicional dispone de válvulas para la separación de la unidad de desnaturalización de la unidad de hibridación. De manera alternativa, pueden alimentarse al procedimiento las sustancias necesarias para la reacción también a través de la ruta de bomba central. Sin embargo, en cualquier caso, está previsto al menos un correspondiente suministro o entrada y una correspondiente salida, por medio de los cuales pueden alimentarse o evacuarse tanto el líquido de muestra como líquidos de reacción y/o líquidos de lavado.

25 La detección del chip de ADN, en otra forma de realización, puede seguir directamente a la fase de hibridación, de modo que la hibridación y la detección del chip de ADN pueden desarrollarse en una unidad y, dado el caso, ser unidas estructuralmente. Sin embargo, es particularmente ventajoso un sistema *lab on a chip*.

### Dibujos

30 Otras ventajas y configuraciones ventajosas del procedimiento según la invención se ilustran por medio de las figuras y se explican en la siguiente descripción. Debe tenerse en cuenta a este respecto que las figuras solo tienen carácter descriptivo y no han sido pensadas para restringir la invención en ninguna forma. En las figuras se emplean los siguientes números de referencia:

1: Unidad de bomba

35 2: Conexión fluidica

3: Unidad de desnaturalización

4: Zona de reacción

5: Chip de ADN

6: Entrada

40 7: Salida

8: Sustrato de soporte

Las figuras 1 y 2 ilustran el procedimiento según la invención. En particular, ambas figuras muestran:

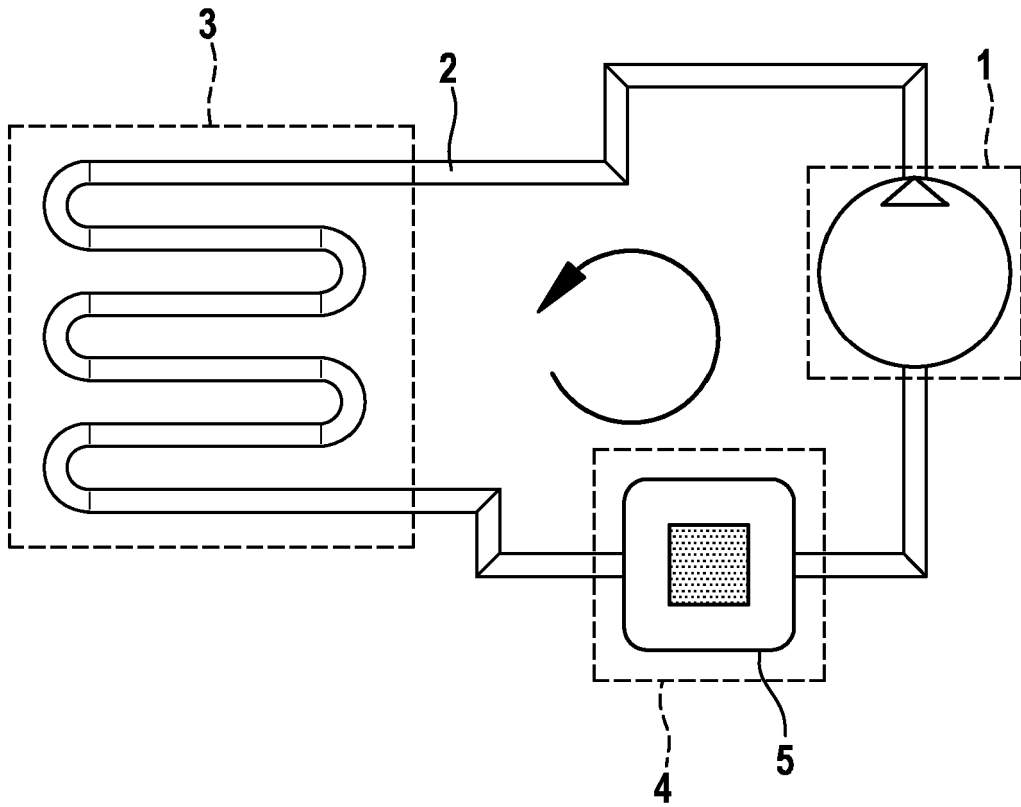
45 la figura.1 (Fig. 1), representación esquemática de un dispositivo para la realización del procedimiento, que comprende una ruta de bomba dispuesta como circuito con una unidad de desnaturalización como canal meándrico y una zona de reacción que comprende un chip de ADN.

Fig.1 (Fig. 2) representación esquemática de un dispositivo para la realización del procedimiento, en el que se representa la estructura como sistema *lab on a chip*, comprendiendo la ruta de bomba dispuesta como circuito una unidad de bomba, una unidad de desnaturalización y una zona de reacción.

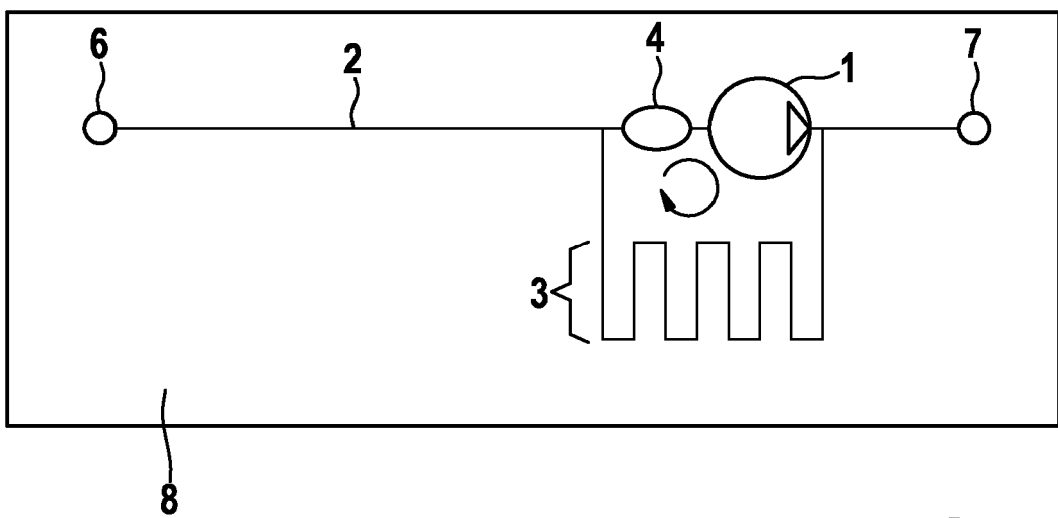
- La figura 1 muestra una posible estructura para la implementación del procedimiento según la invención. La zona 4 de reacción, junto con el chip 5 de ADN contenido en ella está conectada mediante conexiones fluídicas 2 con una ruta de bomba, en la que el líquido de muestra se bombea en círculo con ayuda de una unidad de bomba 1, señalado mediante una flecha que indica la dirección del líquido en el centro de la figura. Como unidad de desnaturalización 3 se emplea un canal meándrico. En este caso, el líquido de muestra se calienta a un rango de temperatura óptimo para correspondientes las biomoléculas, de modo que se efectúe su desnaturalización. Seguidamente, tiene lugar en un segundo rango de temperatura la verdadera reacción de hibridación con las sondas del chip 5 de ADN en la zona 4 de reacción. En la unidad de bomba 1, el líquido de muestra, dado el caso, puede ajustarse a un tercer rango de temperatura.
- 5
- 10 La figura 2 muestra una representación esquemática de un dispositivo para la realización del procedimiento según la invención como sistema *lab on a chip*. El sistema comprende un sustrato 8 portador sobre el que están dispuestos una entrada 6 y una salida 7 para el líquido de muestra, así como los reactivos necesarios y líquidos de lavado. Mediante conexiones fluídicas 2, se introduce la muestra en la ruta de bomba con la unidad de bomba 1. La unidad de desnaturalización 3 está configurada como canal meándrico a microescala. A la unidad de desnaturalización sigue la zona 4 de reacción con el verdadero chip 5 de ADN para la hibridación de las biomoléculas desnaturalizadas. También en un sistema *lab on a chip* la unidad de bomba 1, la unidad de desnaturalización 3 y la zona 4 de reacción son sometidas a un correspondiente control de temperatura y/o regulación de temperatura.
- 15

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la hibridación activa con al menos una sonda de un chip (5) de ADN que comprende las siguientes etapas:
- a. preparar un líquido de muestra con componentes reactivos
  - 5 b. Introducir el líquido de muestra en una ruta de bomba con al menos una unidad de bomba (1), al menos una unidad de desnaturalización (3) controlada por temperatura y al menos una zona de reacción (4) controlada por temperatura separada físicamente de la unidad de desnaturalización (3) con al menos un chip (5) de ADN,
  - c. bombear el líquido de muestra,
  - d. desnaturalizar los componentes reactivos del líquido de muestra en la unidad de desnaturalización (3) e
  - 10 e. hibridación de los componentes desnaturalizados con al menos una sonda del chip (5) de ADN en la zona (4) de reacción,
- caracterizado por que la ruta de bomba está dispuesta como circuito.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que la unidad de bomba (1) y la unidad de desnaturalización (3) forman una unidad estructural.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que, entre la desnaturalización en la unidad de desnaturalización (3) y la hibridación en la zona (4) de reacción, se efectúa una etapa de enfriamiento.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que a la hibridación de los componentes desnaturalizados en la etapa d le sigue una detección del chip (5) de ADN.
- 20 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que la unidad de bomba (1) comprende una microbomba, preferiblemente una microbomba de membrana o una microbomba peristáltica.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por que la unidad de bomba (1) está dispuesta de forma integrada o en *off chip* dentro de la ruta de bomba.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que mediante el bombeo en la etapa c. se genera un flujo uniforme y controlado del líquido de muestra.
- 25 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que la unidad de desnaturalización (3) comprende un canal meándrico (10).
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que la unidad de desnaturalización (3) comprende al menos una unidad para la regulación de la temperatura.
- 30 10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que la zona (4) de reacción está conectada con una segunda ruta de bomba, por medio de la cual se alimentan a la zona (4) de reacción líquidos de reacción y/o líquidos de lavado necesarios para la hibridación.
11. Dispositivo para la realización de un procedimiento para hibridación activa según una de las reivindicaciones anteriores.



**Fig. 1**



**Fig. 2**