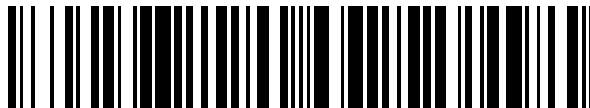


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 924**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.11.2014 PCT/EP2014/075141**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.07.2015 WO15106858**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2014 E 14799822 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 3094740**

54 Título: **Unidad de análisis para realizar una reacción en cadena de la polimerasa anidada, dispositivo de análisis, procedimiento para hacer funcionar una unidad de análisis de este tipo y procedimiento para producir una unidad de análisis de este tipo**

30 Prioridad:

14.01.2014 DE 102014200509

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

12.05.2020

73 Titular/es:

**ROBERT BOSCH GMBH (100.0%)
Postfach 30 02 20
70442 Stuttgart, DE**

72 Inventor/es:

HOFFMANN, JOCHEN

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 759 924 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

Unidad de análisis para realizar una reacción en cadena de la polimerasa anidada, dispositivo de análisis, procedimiento para hacer funcionar una unidad de análisis de este tipo y procedimiento para producir una unidad de análisis de este tipo

5 **Estado de la técnica**

El planteamiento presentado en el presente documento se refiere a una unidad de análisis para realizar una reacción en cadena de la polimerasa anidada, a un dispositivo de análisis para hacer funcionar una unidad de análisis de este tipo, a un procedimiento para hacer funcionar una unidad de análisis de este tipo y a un procedimiento para producir una unidad de análisis de este tipo.

10 En una reacción en cadena de la polimerasa anidada, también denominada PCR anidada (PCR denomina PCR = *Polymerase Chain Reaction* = en inglés reacción en cadena de la polimerasa), se realizan dos reacciones en cadena de la polimerasa sucesivamente. A este respecto, un producto de PCR de una primera reacción en cadena de la polimerasa puede distribuirse a varias cámaras de reacción nuevas y mezclarse con en cada caso diferentes cebadores de PCR. Dado que los nuevos parejas de cebadores se unen más dentro en un fragmento de ADN generado, en una
15 segunda reacción en cadena de la polimerasa se produce un producto de PCR más corto que en la primera reacción en cadena de la polimerasa. Por consiguiente, en la segunda reacción en cadena de la polimerasa se amplifican solo moléculas de ADN de la primera reacción en cadena de la polimerasa, que contienen estos segundos sitios de unión a cebador. De este modo no se amplifican adicionalmente productos de PCR no específicos de la primera reacción. Además, con este procedimiento pueden detectarse específicamente diferentes secuencias diana.

20 En el caso de una detección de ácido nucleico convencional puede realizarse una primera reacción en cadena de la polimerasa en un ciclador de PCR y distribuirse un producto de PCR de la primera reacción en cadena de la polimerasa manualmente a cámaras de reacción para una segunda reacción en cadena de la polimerasa.

En el caso de una detección de ácido nucleico por medio de un sistema de laboratorio en un chip, también denominado LOC, puede amplificarse un material de muestra que debe estudiarse en primer lugar por medio de una reacción en
25 cadena de la polimerasa y a continuación analizarse en una micromatriz.

Descripción de la invención

Ante este trasfondo, con el planteamiento presentado en el presente documento se presentan una unidad de análisis para realizar una reacción en cadena de la polimerasa anidada, un dispositivo de análisis para hacer funcionar una
30 unidad de análisis de este tipo, un procedimiento para hacer funcionar una unidad de análisis de este tipo así como finalmente un procedimiento para producir una unidad de análisis de este tipo según las reivindicaciones principales. Configuraciones ventajosas se obtienen de las respectivas reivindicaciones dependientes y de la siguiente descripción.

El presente planteamiento crea una unidad de análisis para realizar una reacción en cadena de la polimerasa anidada, presentando la unidad de análisis las siguientes características:

35 al menos una cámara de preparación para realizar una primera reacción en cadena de la polimerasa, para obtener un producto de reacción; y

al menos una estructura de evaluación para realizar una segunda reacción en cadena de la polimerasa usando el producto de reacción, estando acoplada o pudiendo acoplarse de manera fluidica la estructura de evaluación con la cámara de preparación y comprendiendo la estructura de evaluación al menos dos cámaras segmentadas, que están conectadas en paralelo de manera fluidica.

40 Por una cámara de preparación puede entenderse una cavidad configurada en la unidad de análisis para alojar un fluido que debe prepararse. Por ejemplo, la cámara de preparación puede presentar al menos dos cámaras parciales acopladas o que pueden acoplarse de manera fluidica para realizar diferentes etapas de reacción de la primera reacción en cadena de la polimerasa. A este respecto, las cámaras parciales pueden, por ejemplo, estar conectadas en serie de manera fluidica. Por un fluido que debe prepararse puede entenderse un fluido con un material bioquímico tal como, por
45 ejemplo, ácidos nucleicos. Fragmentos parciales predeterminados del material bioquímico pueden multiplicarse por medio de la primera reacción en cadena de la polimerasa, por ejemplo, mediante la adición de un reactivo correspondiente, para obtener un producto de reacción o fluido necesario para una evaluación posterior. Por una estructura de evaluación (que también puede denominarse cámara de evaluación) puede entenderse una cavidad adicional configurada en la unidad de análisis para alojar el producto de reacción o fluido (necesario). Por una cámara segmentada puede entenderse una zona parcial de la estructura de evaluación, en la que puede tener lugar la segunda
50 reacción en cadena de la polimerasa o al menos una etapa parcial de la segunda reacción en cadena de la polimerasa. Por una evaluación puede entenderse un reconocimiento de una presencia de un material predeterminado y/o un reconocimiento de una cantidad y/o de una calidad del material predeterminado.

55 El presente planteamiento se basa en el conocimiento de que es posible realizar una reacción en cadena de la polimerasa anidada sobre un chip microfluidico. A este respecto, el chip puede comprender al menos dos espacios de

reacción conectados entre sí de manera fluidica, que posibilitan una separación espacial de diferentes reacciones en cadena de la polimerasa ejecutadas una detrás de otra. A este respecto, un espacio de reacción previsto para una evaluación puede presentar al menos dos cámaras segmentadas, con lo que pueden realizarse al mismo tiempo diferentes detecciones de fragmentos predeterminadas de un material bioquímico.

5 Un chip de este tipo ofrece la ventaja de que un producto de reacción o fluido que debe analizarse puede llevarse sin intervención manual de un espacio de reacción al otro. De este modo pueden, por ejemplo, evitarse contaminaciones de ADN o errores de pipeteo y ahorrarse costes de personal para mano de obra de laboratorio especializada. Mediante una disposición compacta de los espacios de reacción sobre el chip pueden conseguirse, en comparación con las soluciones convencionales, un tiempo de proceso más corto así como una gestión de proceso simplificada. Además, un chip de este tipo puede producirse de manera muy rentable en grandes números de piezas.

10 Según una forma de realización del presente planteamiento, las cámaras segmentadas pueden presentar en cada caso al menos un reactivo para realizar la segunda reacción en cadena de la polimerasa. Por un reactivo puede entenderse, por ejemplo, un material de cebador y/o de sonda, que en contacto con un fragmento parcial predeterminado de un material bioquímico provoca una reacción en cadena de la polimerasa para multiplicar y/o identificar el fragmento parcial. De este modo pueden realizarse según el tipo del reactivo usado diferentes análisis bioquímicos de manera muy fiable y flexible.

15 A este respecto, las cámaras segmentadas pueden presentar en cada caso una cantidad distinta del reactivo y/o en cada caso al menos un reactivo distinto. Esto ofrece la ventaja de que pueden realizarse al mismo tiempo una pluralidad de detecciones bioquímicas diferentes, con lo que puede acortarse claramente un tiempo de proceso. Dado que cada reacción de detección tiene lugar en una cámara propia, pueden reducirse las imprecisiones durante una evaluación de las reacciones de detección.

20 Según una forma de realización adicional del presente planteamiento, una parte de la cámara de preparación y una parte adicional de la cámara de preparación pueden estar configuradas para llevarse en cada caso hasta una temperatura distinta. Alternativa o adicionalmente, una parte de la estructura de evaluación y una parte adicional de la estructura de evaluación pueden estar configuradas para llevarse en cada caso hasta una temperatura distinta. Alternativa o adicionalmente, una zona de la cámara de preparación y una zona de la estructura de evaluación pueden estar configurada para llevarse en cada caso hasta una temperatura distinta. De este modo pueden proporcionarse con alta flexibilidad las temperaturas necesarias para realizar etapas de reacción individuales de la primera y de la segunda reacción en cadena de la polimerasa, lo que posibilita un gran número de detecciones bioquímicas diferentes en la unidad de análisis.

25 Además, la estructura de evaluación comprende al menos dos cámaras segmentadas adicionales. A este respecto, en cada caso una de las cámaras segmentadas adicionales está conectada en serie de manera fluidica con en cada caso una de las cámaras segmentadas. Esto ofrece la ventaja de que determinadas reacciones parciales de la segunda reacción en cadena de la polimerasa de manera separada espacial y químicamente entre sí. Por ejemplo, a este respeto puede desplazarse en vaivén un volumen de reacción entre las cámaras segmentadas y las cámaras segmentadas adicionales, para realizar una reacción en cadena de la polimerasa de dos etapas.

30 Por lo demás, las cámaras segmentadas y las cámaras segmentadas adicionales pueden estar configuradas para llevarse en cada caso hasta una temperatura distinta. De este modo pueden implementarse ahorrando espacio dos zonas de temperatura diferentes para realizar una segunda reacción en cadena de la polimerasa de dos etapas.

35 Según una forma de realización adicional del presente planteamiento, una pluralidad de cámaras segmentadas pueden estar dispuestas al menos parcialmente en forma anular alrededor de la cámara de preparación. Mediante una disposición de este tipo de las cámaras segmentadas, la unidad de análisis puede realizarse de manera especialmente compacta.

40 Además, la cámara de preparación y la estructura de evaluación pueden ser componentes de una estructura de canal para controlar una corriente de fluido en la unidad de análisis. En particular, a este respecto la estructura de canal puede presentar al menos una válvula. La válvula puede estar configurada en particular para desacoplar de manera fluidica la cámara de preparación y la estructura de evaluación. Por una estructura de canal puede entenderse una disposición de canales conectados con la estructura de preparación y/o de evaluación en la unidad de análisis. Además, la estructura de canal puede posibilitar una conexión fluidica con un entorno exterior de la unidad de análisis. En el caso de una válvula puede tratarse, por ejemplo, de una membrana estanca a los fluidos desviables. Por medio de la estructura de canal puede conducirse una cantidad predeterminada del fluido a través de zonas de reacción individuales de la estructura de preparación y/o de evaluación, para realizar la reacción en cadena de la polimerasa anidada.

45 Según una forma de realización adicional del presente planteamiento, la unidad de análisis puede presentar al menos una cámara de bombeo para bombear un fluido que debe prepararse a la cámara de preparación y/o del fluido desde la cámara de preparación. Por una cámara de bombeo puede entenderse una cavidad de la unidad de análisis, que está acoplada o puede acoplarse de manera fluidica con la cámara de preparación. Por ejemplo, la cámara de bombeo puede estar configurada para solicitarse con una presión predeterminada. De este modo puede garantizarse un llenado y/o vaciado controlado de la cámara de preparación.

El presente planteamiento crea además un dispositivo de análisis para hacer funcionar una unidad de análisis según una de las formas de realización descritas anteriormente. A este respecto, el dispositivo de análisis presenta las siguientes características:

5 un elemento de retención para colocar y/o retener la unidad de análisis durante el funcionamiento de la unidad de análisis;

una unidad de atemperado para atemperar un fluido en la unidad de análisis retenida por el elemento de retención, estando configurada en particular la unidad de atemperado, para llevar al mismo tiempo diferentes secciones de la unidad de análisis en cada caso hasta una temperatura distinta; y

10 una unidad de evaluación para evaluar la segunda reacción en cadena de la polimerasa usando el fluido y/o al menos un producto de la segunda reacción en cadena de la polimerasa usando el fluido.

Por un elemento de retención puede entenderse, por ejemplo, también una superficie de apoyo, sobre la que está colocada la unidad de análisis durante el funcionamiento del dispositivo de análisis. Por una unidad de atemperado puede entenderse una unidad, que calienta o enfría al menos una sección parcial de la unidad de análisis. Por una unidad de evaluación puede entenderse una unidad, que registra una variación de estado de un volumen de reacción durante la segunda reacción en cadena de la polimerasa, por ejemplo, mediante el análisis óptico de una radiación electromagnética convertida o emitida por el volumen de reacción. Una forma de realización de este tipo del presente planteamiento ofrece la ventaja de un análisis muy compacto de un material bioquímico con una unidad de análisis económica y fácil de proporcionar.

Además, el presente planteamiento crea un procedimiento para hacer funcionar una unidad de análisis según una de las formas de realización descritas anteriormente, comprendiendo el procedimiento las siguientes etapas:

proporcionar la unidad de análisis;

cargar la cámara de preparación de la unidad de análisis con un fluido que debe prepararse y/o con un reactivo para realizar una primera reacción en cadena de la polimerasa en la cámara de preparación;

25 llevar un producto de la primera reacción en cadena de la polimerasa a la estructura de evaluación de la unidad de análisis; y

evaluar una segunda reacción en cadena de la polimerasa usando el producto de la primera reacción en cadena de la polimerasa en la estructura de evaluación y/o al menos un producto de la segunda reacción en cadena de la polimerasa usando el producto de la primera reacción en cadena de la polimerasa.

30 Finalmente, el presente planteamiento crea un procedimiento para producir una unidad de análisis según una de las formas de realización descritas anteriormente, comprendiendo el procedimiento las siguientes etapas:

proporcionar al menos un elemento de tapa y un elemento de base, presentando el elemento de tapa al menos dos entalladuras de tapa y el elemento de base al menos dos entalladuras de base; y

35 formar un conjunto de capas con al menos una cámara de preparación para realizar una primera reacción en cadena de la polimerasa, para obtener un producto de reacción, y al menos una estructura de evaluación para realizar una segunda reacción en cadena de la polimerasa usando el producto de reacción, teniendo lugar la formación mediante la disposición de las entalladuras de tapa de manera opuesta a las entalladuras de base, estando acoplada o pudiendo acoplarse de manera fluidica la estructura de evaluación con la cámara de preparación y comprendiendo la estructura de evaluación al menos dos cámaras segmentadas, que están conectadas en paralelo de manera fluidica.

40 Por un elemento de tapa y/o un elemento de base puede entenderse, por ejemplo, un componente, que está fabricado a partir de un plástico, en particular de un polímero. Por una entalladura puede entenderse, por ejemplo, una depresión en el elemento de tapa o el elemento de base. Por un conjunto de capas puede entenderse una combinación de capas conectadas entre sí.

45 El planteamiento presentado en este caso crea además una unidad de control o un aparato de control, que está configurado para realizar o implementar las etapas de una variante de un procedimiento presentado en el presente documento en dispositivos correspondientes. También mediante esta variante de realización de la invención en forma de un aparato de control puede alcanzarse de manera rápida y eficiente el objetivo en el que se basa la invención.

50 Por una unidad de control o un aparato de control puede entenderse en el presente documento un aparato eléctrico, que procesa señales de sensor y en función de ello emite señales de control y/o de datos. La unidad de control y/o el aparato de control puede presentar una interfaz, que puede estar configurada a nivel de hardware y/o software. En el caso de una configuración a nivel de hardware pueden las interfaces, por ejemplo, formar parte de un denominado sistema ASIC, que contiene las más diversas funciones del aparato de control. Sin embargo, también es posible que las interfaces sean circuitos integrados propios o estén compuestos al menos parcialmente por elementos constructivos discretos. En el caso de una configuración a nivel de software, las interfaces pueden ser módulos de software que, por ejemplo, están presentes en un microcontrolador además de otros módulos de software.

También resulta ventajoso un producto de programa informático o programa informático con código de programa, que puede estar almacenado en un medio de almacenamiento o soporte legible por máquina, tal como un memoria con semiconductores, un memoria de discos fijos o una memoria óptica, y se usa para realizar y/o controlar las etapas del procedimiento según una de las formas de realización descritas anteriormente, en particular cuando el producto de programa se ejecuta en un ordenador o un dispositivo.

El planteamiento presentado en el presente documento se explicará a continuación más detalladamente a modo de ejemplo mediante los dibujos adjuntos. Muestran:

- la figura 1 una representación esquemática de una unidad de análisis según un ejemplo de realización de la presente divulgación;
- 10 la figura 2 una representación esquemática de una reacción en cadena de la polimerasa anidada según un ejemplo de realización de la presente divulgación;
- la figura 3 una representación en planta de una unidad de análisis según un ejemplo de realización de la presente divulgación;
- 15 la figura 4 una representación en planta de una unidad de análisis según un ejemplo de realización de la presente divulgación;
- la figura 5 una representación en planta de una unidad de análisis según un ejemplo de realización de la presente divulgación;
- la figura 6 una representación en planta de una unidad de análisis según un ejemplo de realización de la presente divulgación;
- 20 la figura 7 una representación en sección transversal de un dispositivo de análisis para hacer funcionar una unidad de análisis según un ejemplo de realización de la presente divulgación;
- la figura 8 un diagrama de flujo de un ejemplo de realización de un procedimiento para hacer funcionar una unidad de análisis; y
- 25 la figura 9 un diagrama de flujo de un ejemplo de realización de un procedimiento para producir una unidad de análisis.

En la siguiente descripción de ejemplos de realización favorables de la presente divulgación se usan números de referencia iguales o similares para los elementos representados en las diferentes figuras y que actúan de manera similar, prescindiéndose de una descripción repetida de estos elementos.

La figura 1 muestra una representación en planta de una unidad 100 de análisis según un ejemplo de realización de la presente divulgación. La unidad 100 de análisis comprende una cámara 105 de preparación así como una estructura 110 de evaluación, que están conectadas entre sí de manera fluidica. La estructura 110 de evaluación comprende además dos cámaras 115 segmentadas, que están conectadas en paralelo de manera fluidica.

La cámara 105 de preparación está configurada para alojar un fluido con un material de partida bioquímico. A este respecto, la cámara 105 de preparación sirve como zona de reacción para realizar una primera reacción en cadena de la polimerasa, mediante la que se multiplican los fragmentos parciales predeterminados del material de partida, para obtener un fluido preparado para una evaluación posterior. Las cámaras 115 segmentadas están configuradas para alojar en cada caso una cantidad predeterminada del fluido preparado. A este respecto, las cámaras 115 segmentadas sirven como zonas de reacción separadas espacialmente entre sí para realizar una segunda reacción en cadena de la polimerasa, mediante la que se multiplican y/o identifican las zonas parciales predeterminadas de las secciones parciales.

Un aspecto importante del planteamiento descrito en el presente documento es la divulgación de un sistema microfluidico compuesto entre otros por canales, válvulas y cavidades en una determinada disposición. Por ejemplo, en primer lugar se introduce una disolución de muestra que debe estudiarse en una cámara 105 y se amplifica previamente por medio de una primera reacción en cadena de la polimerasa. A continuación de esto se forman alícuotas de esta disolución de muestra en varias cámaras 115, es decir se distribuyen, y se mezclan con diferentes parejas de cebadores. Así, en una segunda reacción en cadena de la polimerasa pueden detectarse en cada cámara 115 una o varias secuencias de ADN diferentes. De este modo se obtienen las siguientes ventajas.

Los requisitos en cuanto a un diseño bioquímico de una PCR de multiplexación pueden reducirse claramente, dado que la reacción de detección para cada secuencia de ADN individual se realiza en una única cámara de detección. Es decir, no tienen que encontrarse primero condiciones de reacción de PCR para la detección de varias secuencias de ADN en una única cámara de reacción.

Mediante la amplificación de una región de ADN más larga que comprende varias secuencias diana en la primera reacción en cadena de la polimerasa puede generarse suficiente material para reacciones de detección individuales en

el marco de la segunda reacción en cadena de la polimerasa. Si, por ejemplo, un material de muestra que debe estudiarse, que solo contiene pocas moléculas diana, se distribuye directamente a varias cámaras de reacción, puede existir el peligro de que cámaras individuales contengan demasiado poco material de partida genético para una reacción de detección.

- 5 Son posibles dos variantes de lectura posible: lectura en tiempo real durante la segunda reacción en cadena de la polimerasa o lectura de punto final tras la segunda reacción en cadena de la polimerasa.

Las estructuras descritas posibilitan una integración e implementación de muchos ensayos de PCR o biocontenidos. Hay claramente más ensayos, en los que se detectan moléculas de ADN directamente a través de una PCR monoplex a cuádruplex, que en una combinación de PCR de multiplexación y análisis de micromatriz posterior.

- 10 Además no se necesita una micromatriz de ADN para la detección de diferentes moléculas de ADN. De este modo disminuyen también los requisitos de una unidad de detección óptica.

La figura 2 muestra una representación esquemática de una reacción 200 en cadena de la polimerasa anidada según un ejemplo de realización de la presente divulgación. En una primera reacción en cadena de la polimerasa se acumula un primer par 202 de cebadores en un fragmento 205 parcial predeterminado de un material 207 de partida bioquímico, para obtener un primer producto 210 de PCR como copia del fragmento 205 parcial. En una segunda reacción en cadena de la polimerasa se acumula un segundo par 215 de cebadores en una zona 217 parcial predeterminada del primer producto 210 de PCR, para obtener un segundo producto 220 de PCR como copia de la zona 217 parcial. Por consiguiente, el segundo producto 220 de PCR es más corto que el primer producto 202 de PCR y contiene solo aquellos compuestos bioquímicos, que se encuentran entre sitios de unión de cebadores del segundo par 215 de cebadores. A este respecto, los productos 210 y 220 de PCR deben contener también los dos pares de cebadores (es decir ser más largos) y no solo la zona en cada caso interna.

La figura 3 muestra una representación en planta de una unidad 100 de análisis según un ejemplo de realización de la presente divulgación. La cámara 105 de preparación está realizada con una primera cámara 300 parcial, una segunda cámara 305 parcial y una tercera cámara 310 parcial. Las cámaras 300, 305, 310 parciales están conectadas en serie de manera fluidica a través de dos canales 315, estando dispuesta la segunda cámara 305 parcial entre la primera cámara 300 parcial y la tercera cámara 310 parcial. La estructura 110 de evaluación está realizada a modo de ejemplo con seis cámaras 115 segmentadas, que están conectadas en paralelo de manera fluidica. Las cámaras 115 segmentadas y las cámaras 300, 305, 310 parciales están dispuestas en cada caso a lo largo de un eje común, discurrendo un eje de las cámaras 115 segmentadas transversalmente a un eje de las cámaras 300, 305, 310 parciales, de modo que se obtiene una disposición en forma de T.

La primera cámara 300 parcial está realizada con un canal 320 de introducción para introducir un fluido en la primera cámara 300 parcial. La tercera cámara 310 parcial está configurada con un canal 325 de evacuación para evacuar el fluido de la tercera cámara 310 parcial. Adicionalmente, la tercera cámara 310 parcial está acoplada de manera fluidica a través de canales 330 de conexión con las cámaras 115 segmentadas. Los canales 330 de conexión confluyen en un canal 332 de conexión común, que está dispuesto de manera adyacente a la tercera cámara 310 parcial. Las cámaras 115 segmentadas están acopladas a través de canales 335 de salida de manera fluidica con un entorno exterior de la unidad 100 de análisis. Los canales 335 de salida confluyen en un canal 337 de salida común, que está configurado, por ejemplo, en una zona dirigida al entorno exterior de la unidad 100 de análisis. A este respecto, el canal 320 de introducción, los canales 315, el canal 332 de conexión común y el canal 337 de salida común discurren, por ejemplo, a lo largo de un eje común.

En el canal 320 de introducción y el canal 325 de evacuación está configurada en cada caso una válvula 340 de cámara de preparación, en los canales 330 de conexión y los canales 335 de salida en cada caso una válvula 342 de estructura de evaluación, para controlar una corriente de fluido en la unidad 100 de análisis.

La primera cámara 300 parcial está dispuesta en una primera zona 345 de temperatura, la segunda cámara 305 parcial en una segunda zona 350 de temperatura y la tercera cámara 310 parcial en una tercera zona 355 de temperatura de la unidad 100 de análisis. Las zonas 345, 350, 355 de temperatura están configuradas para llevarse en cada caso hasta una temperatura constante predeterminada distinta. Las cámaras 115 segmentadas están dispuestas en una zona 360 de temperatura variable de la unidad 100 de análisis, cuya temperatura puede variarse entre valores predeterminados.

Según este ejemplo de realización, además de las zonas 345, 350, 355 de temperatura, como zonas atemperadas de manera constante está previsto un elemento de atemperado regulable, tal como, por ejemplo, un elemento Peltier para una zona 360, que alterna entre las temperaturas necesarias para una reacción en cadena de la polimerasa.

Las cámaras 300, 305, 310 parciales están configuradas para realizar una primera reacción en cadena de la polimerasa de tres etapas. A este respecto se lleva un fluido de muestra de la primera zona 345 de temperatura a través de la segunda zona 350 de temperatura a la tercera zona 355 de temperatura. Las cámaras 115 segmentadas están configuradas para realizar una segunda reacción en cadena de la polimerasa de dos etapas. Para ello se conduce el fluido de muestra tras la primera reacción en cadena de la polimerasa desde las cámaras 300, 305, 310 parciales a las cámaras 115 segmentadas y se lleva de manera alternante hasta diferentes temperaturas predeterminadas.

La figura 4 muestra una representación en planta de una unidad 100 de análisis según un ejemplo de realización de la presente divulgación. A diferencia de la figura 3, la unidad 100 de análisis mostrada en la figura 4 está implementada con siete cámaras 115 segmentadas. Las siete cámaras 115 segmentadas están conectadas en cada caso en paralelo de manera fluidica con una cámara 400 segmentada adicional a través de un canal 505 de conexión de segmentos. Los canales 335 de salida están acoplados de manera fluidica con las cámaras 400 segmentadas adicionales.

Las cámaras 115 segmentadas están dispuestas en una primera zona 510 de temperatura y las cámaras 400 segmentadas adicionales en una segunda zona 515 de temperatura de la unidad 100 de análisis, estando configuradas las zonas 510, 515 de temperatura para llevarse en cada caso hasta una temperatura constante distinta.

Según un ejemplo de realización de la presente divulgación, los volúmenes de reacción para la segunda reacción en cadena de la polimerasa se desplazan en vaivén entre dos cámaras 115, 400 que se encuentran en diferentes zonas de temperatura. Esta forma de realización ofrece la ventaja de que no se necesita ningún elemento Peltier, pero en su lugar dos zonas 510, 515 de temperatura adicionales además de las zonas 345, 350, 355 de temperatura para la primera reacción en cadena de la polimerasa.

La figura 5 muestra una representación en planta de una unidad 100 de análisis según un ejemplo de realización de la presente divulgación. A diferencia de la figura 4, la unidad 100 de análisis en la figura 5 presenta en cada caso ocho cámaras 115 segmentadas y ocho cámaras 400 segmentadas adicionales. A este respecto, las cámaras 115 segmentadas están dispuestas en la segunda zona 350 de temperatura y las cámaras 400 segmentadas adicionales en la tercera zona 355 de temperatura. Las cámaras 115 segmentadas y las cámaras 400 segmentadas adicionales están dispuestas a ambos lados del canal 315 en cada caso en grupos de cuatro, estando conectadas de manera fluidica las cámaras 115 segmentadas a través de los canales 330 de conexión con la segunda cámara 305 parcial. Además, a ambos lados del canal 315 en cada caso confluyen cuatro de los ocho canales 335 de salida en un canal común, para posibilitar una conexión fluidica con el entorno exterior de la unidad 100 de análisis.

Según un ejemplo de realización de la presente divulgación, en una primera reacción en cadena de la polimerasa de tres etapas tiene lugar una acumulación de los cebadores en la cámara 300, una extensión en la cámara 305 y una desnaturalización en la cámara 310. Las cámaras 115, 400 para la segunda reacción en cadena de la polimerasa se encuentran en cada caso en las zonas 350, 355 de temperatura, para realizar una reacción en cadena de la polimerasa de dos etapas. Un diseño de cebadores se selecciona de tal manera que los cebadores de la segunda reacción en cadena de la polimerasa se unen a la temperatura de extensión de 72°C. Esto tiene en primer lugar la ventaja de que puede realizarse una segunda reacción en cadena de la polimerasa de dos etapas. De este modo pueden alcanzarse un mayor ahorro de tiempo y una mayor especificidad. En segundo lugar, los cebadores de la primera reacción en cadena de la polimerasa están configurados para no unirse ya a esta temperatura. Por tanto, solo puede transcurrir la segunda reacción en cadena de la polimerasa deseada. En tercer lugar se necesitan tres zonas 345, 350, 355 de temperatura. La figura 6 muestra una representación en planta de una unidad 100 de análisis según un ejemplo de realización de la presente divulgación. La unidad 100 de análisis mostrada en la figura 5 presenta a modo de ejemplo diez cámaras 115 segmentadas, que están dispuestas en forma de círculo alrededor de la cámara 105 de preparación. A este respecto, en cada caso están dispuestas cinco cámaras 115 segmentadas en forma de semicírculo en lados opuestos entre sí de la cámara 105 de preparación. A diferencia de las figuras descritas anteriormente, los canales 335 de salida en la figura 6 no confluyen en un canal de salida común, sino que están dispuestos como canales individuales en forma de rayos alrededor de la cámara 105 de preparación. Las cámaras 115 segmentadas y la cámara 105 de preparación están dispuestas en una zona 615 de temperatura común, cuya temperatura puede variar entre los valores necesarios para realizar la primera y la segunda reacción en cadena de la polimerasa.

La cámara 105 de preparación está acoplada de manera fluidica a través de un canal 600 de bombeo con una cámara 605 de bombeo para bombear el fluido a la cámara 105 de preparación. En el canal 600 de bombeo está configurada una válvula 310 de bombeo, para conducir un fluido de manera controlada desde la cámara 605 de bombeo a la cámara 105 de preparación y/o desde la cámara 105 de preparación a la cámara 605 de bombeo. En la cámara 605 de bombeo, el canal 320 de introducción está conectado además con la válvula 340 de cámara de preparación.

El volumen de reacción para la primera reacción en cadena de la polimerasa se transporta con la cámara 605 de bombeo a la cámara 105 de reacción, también denominada cámara 105 de preparación. Esta disposición tiene la ventaja de que se minimiza un consumo de espacio y solo se necesita un único elemento de atemperado, por ejemplo, un elemento Peltier.

La figura 7 muestra una representación en sección transversal de un dispositivo 700 de análisis para hacer funcionar una unidad 100 de análisis según un ejemplo de realización de la presente divulgación. El dispositivo 700 de análisis está configurado para realizar una PCR anidada en un sistema de múltiples capas polimérico. Un sistema de laboratorio en un chip de este tipo posibilita la realización de reacciones en cadena de la polimerasa conectadas unas detrás de otras y con ello una detección específica y paralela de múltiples secuencias de ADN.

El dispositivo 700 de análisis comprende una unidad 705 de atemperado, que está colocada a modo de ejemplo sobre un lado superior de la unidad 100 de análisis. Sobre un lado inferior opuesto al lado superior de la unidad 100 de análisis está prevista una unidad 710 de evaluación para evaluar la segunda reacción en cadena de la polimerasa y/o al menos un producto de la segunda reacción en cadena de la polimerasa. La disposición de unidad 705 de atemperado y

unidad 710 de evaluación también puede estar invertida. La unidad 100 de análisis está dispuesta además en un elemento 715 de retención, que está configurado para fijar la unidad 100 de análisis en el dispositivo 700 de análisis entre la unidad 705 de atemperado y la unidad 710 de evaluación. El elemento 715 de retención presenta, por ejemplo, una estructura similar a un marco, en la que puede introducirse la unidad 100 de análisis o colocarse dentro de la misma.

El elemento 710 de atemperado comprende, por ejemplo, varias unidades parciales, que están configuradas para llevar diferentes zonas de temperatura dispuestas de manera adyacente entre sí de la unidad 100 de análisis al mismo tiempo hasta temperaturas diferentes.

La energía térmica se introduce, por ejemplo, mediante el uso de dedos de calentamiento o láminas de calentamiento transparentes en zonas definidas de un chip microfluídico, también denominado unidad 100 de análisis. Las láminas de calentamiento transparentes tienen la ventaja de que pueden leerse señales de fluorescencia de las cámaras 115 de reacción durante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR en tiempo real). Los elementos de calentamiento de temperatura constante están colocados en un lado o en ambos lados en el chip. Si se usan elementos Peltier, entonces estos se colocan, por ejemplo, desde un lado en el chip. Desde otro lado el chip puede leerse entonces en tiempo real.

La figura 8 muestra un diagrama de flujo de un ejemplo de realización de un procedimiento 800 para hacer funcionar una unidad de análisis. El procedimiento 800 comprende una etapa 805 de proporcionar la unidad de análisis. En una etapa 810 adicional se carga la cámara de preparación de la unidad de análisis con un fluido que debe prepararse y/o con un reactivo para realizar una primera reacción en cadena de la polimerasa en la cámara de preparación. A continuación tiene lugar una etapa 815 de llevar un producto de la primera reacción en cadena de la polimerasa a la estructura de evaluación de la unidad de análisis. Finalmente tiene lugar una etapa 820 de evaluación de una segunda reacción en cadena de la polimerasa en la estructura de evaluación y/o al menos de un producto de la segunda reacción en cadena de la polimerasa.

Según un ejemplo de realización mostrado en la figura 3 de la presente divulgación, un sistema fluídico está compuesto por un canal microfluídico como canal 320 de introducción, a través del que se llenan las cámaras 300, 305, 310, 115 en primer lugar con un líquido biológicamente inactivo para el desplazamiento del aire y la humectación de las cámaras. A continuación se vacían las cámaras 300, 305, 310, 115 mediante la desviación de una membrana que se encuentra en un lado superior de las cámaras 300, 305, 310, 115. Las válvulas 340, 342 se cierran. Ahora se abren las válvulas 340 y se cargan las tres cámaras 300, 305, 310 de PCR, también denominadas cámaras 300, 305, 310 parciales, con un mezcla de reacción de PCR, que contiene todos los componentes de reacción para una primera reacción en cadena de la polimerasa. Dos de las tres cámaras 300, 305, 310 se vacían de nuevo y se cierran las válvulas 340. Mediante el desplazamiento cíclico de un volumen de reacción entre las cámaras 300, 305, 310 se realiza una reacción en cadena de la polimerasa de tres etapas. A este respecto, las cámaras 300, 305, 310 se encuentran a las temperaturas necesarias para una reacción en cadena de la polimerasa de dese 50°C hasta 65°C (temperatura de acumulación), 72°C (temperatura de extensión) y 95°C (temperatura de fusión). Tras la primera reacción en cadena de la polimerasa se pasa el volumen de reacción a la cámara 310; la válvula 342 dirigida hacia la cámara 310 se abre. Las membranas introducidas a presión en las cámaras 115 se elevan al mismo tiempo, con lo que se succiona el volumen de reacción a las cámaras (formación de alícuotas). La válvula 342 dirigida hacia la cámara 310 se cierra de nuevo. En las cámaras 115 están almacenados previamente en cada caso diferentes cebadores y sondas, que se absorben por el volumen de reacción introducido. De este modo se producen en cada una de las cámaras 115 individuales condiciones de reacción para una detección de diferentes secuencias de ADN en la segunda reacción en cadena de la polimerasa.

Los cebares y las sondas para la segunda reacción en cadena de la polimerasa pueden estar directamente almacenados previamente en las cámaras 115, 400. Para ello pueden emplearse todos los procedimientos conocidos por el estado de la técnica, tal como, por ejemplo, lipofilización, uso de DNAs estable o gelificación.

En el caso de una PCR anidada, los cebadores de la primera reacción en cadena de la polimerasa deberían ser inactivos en la segunda reacción en cadena de la polimerasa. Por un lado, los cebadores de la primera reacción en cadena de la polimerasa pueden contener uracilo en lugar de timina. Si antes de la segunda reacción en cadena de la polimerasa se realiza una reacción enzimática con la enzima uracilo glicosilasa, también denominada digestión UNG, entonces se inactivan exclusivamente los cebadores que contienen uracilo. Por otro lado, las temperaturas de fusión pueden estar seleccionadas de tal manera que los cebadores de la primera reacción en cadena de la polimerasa presenten una temperatura de fusión menor que los cebadores de la segunda reacción en cadena de la polimerasa.

En la segunda reacción en cadena de la polimerasa pueden detectarse por cámara de reacción n varias secuencias de ADN m, normalmente de una a cuatro, mediante el uso de sondas marcadas de diferente manera. De este modo aumenta el número de secuencias de ADN que pueden detectarse en el factor de n por m.

La figura 9 muestra un diagrama de flujo de un ejemplo de realización de un procedimiento 900 para producir una unidad de análisis. El procedimiento 900 comprende una etapa 905 de proporcionar al menos un elemento de tapa y un elemento de base. A este respecto, el elemento de tapa presenta al menos dos entalladuras de tapa y el elemento de base al menos dos entalladuras de base. Además, el procedimiento comprende una etapa 905 de formar un conjunto de capas con al menos una cámara de preparación para realizar una primera reacción en cadena de la polimerasa, para un producto de reacción, y al menos una para realizar una segunda reacción en cadena de la polimerasa usando el

producto de reacción. A este respecto, la formación tiene lugar mediante la disposición de las entalladuras de tapa de manera opuesta a las entalladuras de base, estando acoplada o pudiendo acoplarse de manera fluidica la estructura de evaluación con la cámara de preparación y comprendiendo la estructura de evaluación al menos dos cámaras segmentadas, que están conectadas en paralelo de manera fluidica.

- 5 Las estructuras necesarias representadas a modo de ejemplo en los sustratos poliméricos se generan, por ejemplo, mediante fresado, moldeo por inyección, estampación en caliente o estructuración láser.

Como materiales para un sustrato polimérico son adecuados termoplásticos, tales como, por ejemplo, policarbonato (PC), polipropileno (PP), polietileno (PE), poli(metacrilato de metilo) (PMMA), polímero de olefina cíclica (COP) o copolímero de olefina cíclica (COC)

- 10 Como materiales para una membrana polimérica son adecuados, por ejemplo, elastómero, elastómero termoplástico tal como uretano termoplástico (TPU) o estireno termoplástico (TPS), termoplastos, láminas de adhesión en caliente o láminas de sellado para placas de microtitulación.

Un grosor del sustrato polimérico asciende a, por ejemplo, de 0,5 mm a 5 mm.

Un diámetro de un canal en los sustratos poliméricos asciende a por ejemplo, de 10 µm a 3 mm.

- 15 Un grosor de la membrana polimérica asciende a, por ejemplo, de 5 µm a 500 µm.

Un volumen de cavidades en los sustratos poliméricos asciende a, por ejemplo, de 1 mm³ a 1000 mm³.

- 20 En una evolución de proceso a modo de ejemplo se fija un intervalo de parámetros de la primera reacción en cadena de la polimerasa de la siguiente manera: de 1 a 20 ciclos térmicos, ciclos de temperatura con de 93°C a 96°C para la desnaturalización, con 72°C para la extensión y con de 54°C a 65°C para la unión a cebadores. También es posible omitir las etapas hasta la temperatura de extensión, para realizar una reacción en cadena de la polimerasa de dos etapas.

- 25 Un intervalo de parámetros de la segunda reacción en cadena de la polimerasa se fija, por ejemplo, de la siguiente manera: de 20 a 60 ciclos térmicos, ciclos de temperatura con de 93°C a 96°C para la desnaturalización, con 72°C para la extensión y con de 54°C a 65°C para la unión a cebadores. También en este caso es posible omitir las etapas hasta la temperatura de extensión, para realizar una reacción en cadena de la polimerasa de dos etapas.

La primera reacción en cadena de la polimerasa comprende, por ejemplo, de 1 a 10 reacciones. La segunda reacción en cadena de la polimerasa comprende, por ejemplo, de 1 a 50 reacciones.

- 30 Los ejemplos de realización descritos y mostrados en las figuras se seleccionan solo a modo de ejemplo. Diferentes ejemplos de realización pueden combinarse entre sí completamente o con respecto a características individuales. También puede completarse un ejemplo de realización mediante características de un ejemplo de realización adicional.

Además, las etapas de procedimiento presentadas en el presente documento pueden repetirse así como ejecutarse en una sucesión distinta a la descrita.

- 35 Si un ejemplo de realización comprende un enlace "y/o" entre una primera característica y una segunda característica, entonces estos debe interpretarse como que el ejemplo de realización según una forma de realización presenta tanto la primera característica como la segunda característica y según una forma de realización adicional o bien solo la primera característica o bien solo la segunda característica.

REIVINDICACIONES

1. Unidad (100) de análisis para realizar una reacción (200) en cadena de la polimerasa anidada, presentando la unidad (100) de análisis las siguientes características:
- 5 al menos una cámara (105) de preparación para realizar una primera reacción en cadena de la polimerasa, para obtener un producto de reacción; y
- al menos una estructura (110) de evaluación para realizar una segunda reacción en cadena de la polimerasa usando el producto de reacción, estando acoplada o pudiendo acoplarse de manera fluidica la estructura (110) de evaluación con la cámara (105) de preparación y comprendiendo la estructura (110) de evaluación al menos dos cámaras (115) segmentadas, que están conectadas en paralelo de manera fluidica,
- 10 estando realizada la cámara (105) de preparación con una primera cámara (300) parcial, una segunda cámara (305) parcial y una tercera cámara (310) parcial, estando dispuesta la primera cámara (300) parcial en una primera zona (345) de temperatura, la segunda cámara (305) parcial en una segunda zona (350) de temperatura y la tercera cámara (310) parcial en una tercera zona (355) de temperatura de la unidad (100) de análisis para la realización de una primera reacción en cadena de la polimerasa de tres etapas,
- 15 estando conectadas las al menos dos cámaras (115) segmentadas en cada caso con una cámara (400) segmentada adicional de manera fluidica para una segunda reacción en cadena de la polimerasa de dos etapas, estando conectadas de manera fluidica las cámaras (115) segmentadas con la segunda cámara (305) parcial y estando dispuestas las cámaras (115) segmentadas en la segunda zona (350) de temperatura y las cámaras (400) segmentadas adicionales en la tercera zona (355) de temperatura.
- 20 2. Unidad (100) de análisis según la reivindicación 1, caracterizada porque las cámaras (115) segmentadas presentan en cada caso al menos un reactivo para realizar la segunda reacción en cadena de la polimerasa.
3. Unidad (100) de análisis según la reivindicación 2, caracterizada porque las cámaras (115) segmentadas presentan en cada caso una cantidad distinta del reactivo y/o en cada caso al menos un reactivo distinto.
4. Unidad (100) de análisis según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque una parte de la cámara (105) de preparación y una parte adicional de la cámara (105) de preparación están configuradas para llevarse en cada caso hasta una temperatura distinta, y/o una parte de la estructura (110) de evaluación y una parte adicional de la estructura (110) de evaluación están configuradas para llevarse en cada caso hasta una temperatura distinta, y/o una zona de la cámara (105) de preparación y una zona de la estructura (110) de evaluación están configuradas para llevarse en cada caso hasta una temperatura distinta.
- 25 5. Unidad (100) de análisis según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque la estructura (110) de evaluación comprende al menos dos cámaras (400) segmentadas adicionales, estando conectada en cada caso una de las cámaras (400) segmentadas adicionales en serie de manera fluidica con en cada caso una de las cámaras (115) segmentadas.
- 30 6. Unidad (100) de análisis según la reivindicación 5, caracterizada porque las cámaras (115) segmentadas y las cámaras (400) segmentadas adicionales están configuradas para llevarse en cada caso hasta una temperatura distinta.
7. Unidad (100) de análisis según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque la cámara (105) de preparación y la estructura (110) de evaluación son componentes de una estructura de canal para controlar una corriente de fluido en la unidad (100) de análisis, presentando en particular la estructura de canal al menos una válvula (340, 342), estando configurada en particular la válvula (342) para desacoplar de manera fluidica la cámara (105) de preparación y la estructura (110) de evaluación.
- 40 8. Unidad (100) de análisis según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por al menos una cámara de bombeo (605) para bombear un fluido que debe prepararse a la cámara (105) de preparación y/o el producto de reacción fuera de la cámara (105) de preparación.
9. Procedimiento (800) para hacer funcionar una unidad (100) de análisis según una de las reivindicaciones 1 a 8, comprendiendo el procedimiento (800) las siguientes etapas:
- 45 proporcionar (805) la unidad (100) de análisis;
- cargar (810) la cámara (105) de preparación de la unidad (100) de análisis con un fluido que debe prepararse y/o con un reactivo para realizar una primera reacción en cadena de la polimerasa de tres etapas en la cámara (105) de preparación que comprende la primera cámara (300) parcial, la segunda cámara (305) parcial y la tercera cámara (310) parcial;
- 50 llevar (815) un producto de la primera reacción en cadena de la polimerasa a la estructura (110) de evaluación de la unidad (100) de análisis; y

- 5 evaluar (820) una segunda reacción en cadena de la polimerasa de dos etapas realizada en las cámaras (115) segmentadas y las cámaras segmentadas adicionales conectadas de manera fluidica con las mismas usando el producto de la primera reacción en cadena de la polimerasa en la estructura (110) de evaluación y/o al menos un producto de la segunda reacción en cadena de la polimerasa usando el producto de la primera reacción en cadena de la polimerasa.
10. Procedimiento (900) para producir una unidad (100) de análisis según una de las reivindicaciones 1 a 8, comprendiendo el procedimiento (900) las siguientes etapas:
- proporcionar (905) al menos un elemento de tapa y un elemento de base, presentando el elemento de tapa al menos dos entalladuras de tapa y el elemento de base al menos dos entalladuras de base; y
- 10 formar (910) un conjunto de capas con al menos una cámara (105) de preparación para realizar una primera reacción en cadena de la polimerasa de tres etapas, para obtener un producto de reacción, estando realizada la cámara (105) de preparación con una primera cámara (300) parcial en una primera zona (345) de temperatura, una segunda cámara (305) parcial en una segunda zona (350) de temperatura y una tercera cámara (310) parcial en una tercera zona (355) de temperatura, y al menos una estructura (110) de evaluación para realizar una segunda reacción en cadena de la polimerasa de dos etapas usando el producto de reacción, teniendo lugar la formación (910) mediante la disposición de las entalladuras de tapa de manera opuesta a las entalladuras de base, estando acoplada o pudiendo acoplarse de manera fluidica la estructura (110) de evaluación con la cámara (105) de preparación y comprendiendo la estructura (110) de evaluación al menos dos cámaras (115) segmentadas, que se conectan en paralelo de manera fluidica y en cada caso se conectan de manera fluidica con una cámara (400) segmentada adicional y disponiéndose las cámaras (115) segmentadas en la segunda zona (350) de temperatura y las cámaras (400) segmentadas adicionales en la tercera zona (355) de temperatura.
- 15
- 20
11. Unidad de control, que está configurada para realizar, implementar y/o controlar todas las etapas de un procedimiento según la reivindicación 9.
- 25
12. Programa informático, que está configurado para realizar, implementar y/o controlar todas las etapas de un procedimiento según la reivindicación 9.
13. Medio de almacenamiento legible por ordenador con un programa informático almacenado en el mismo según la reivindicación 12.

Fig. 1

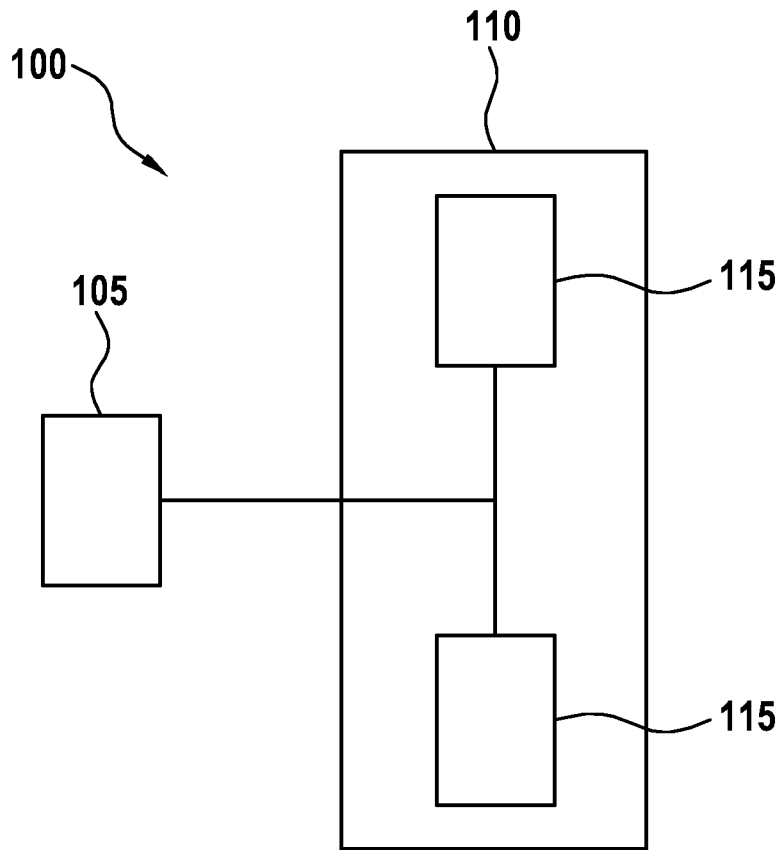
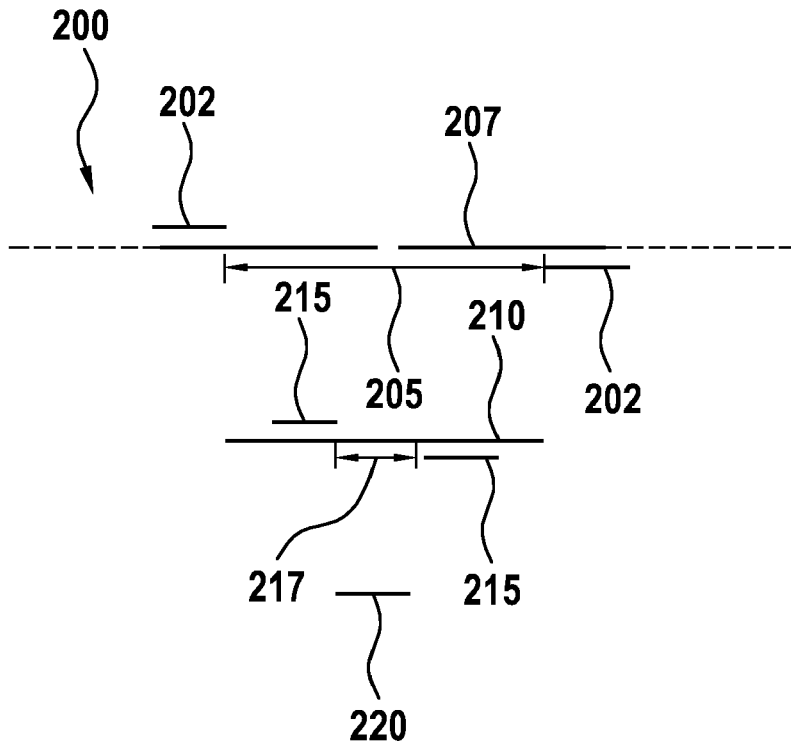


Fig. 2



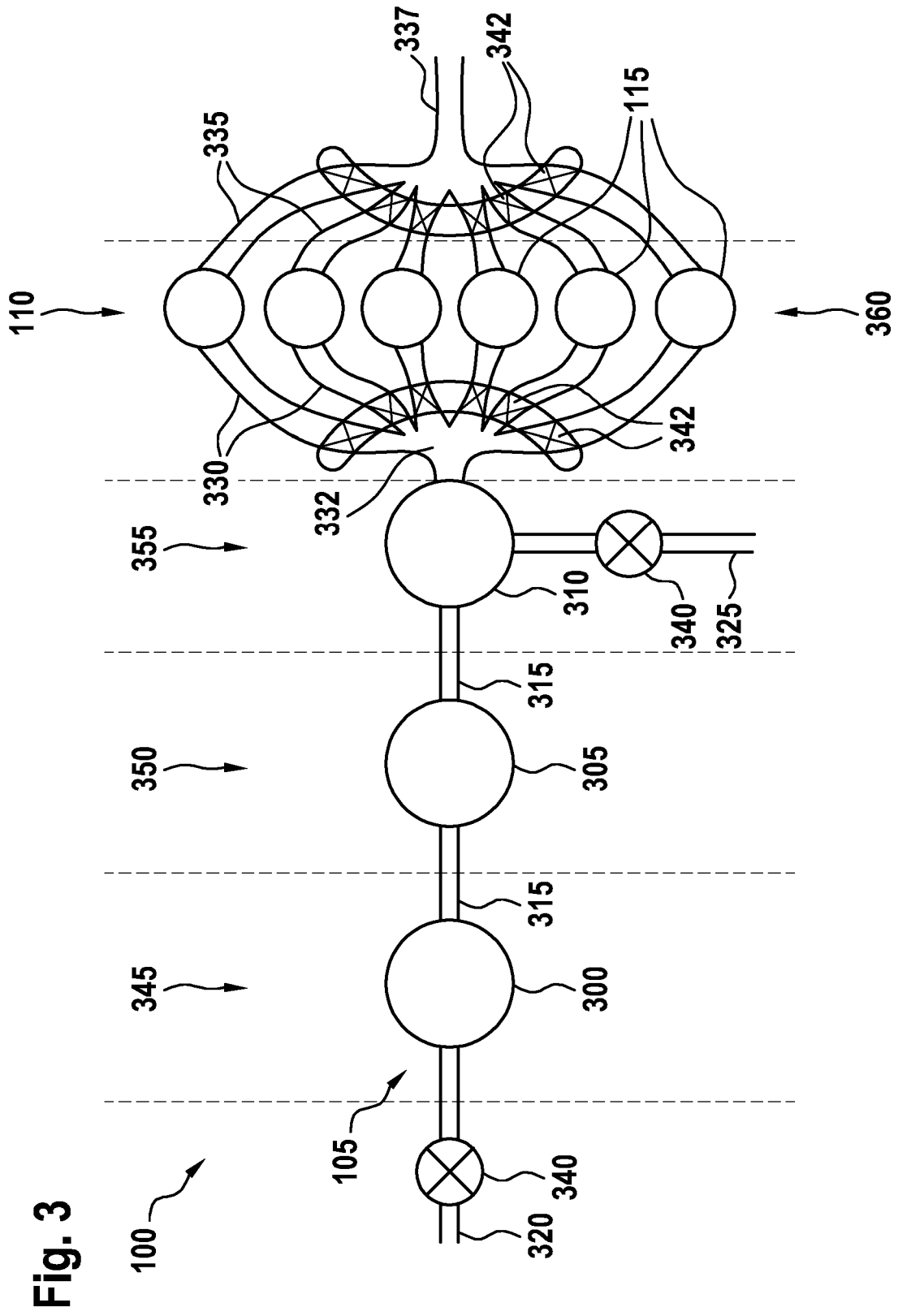


Fig. 6

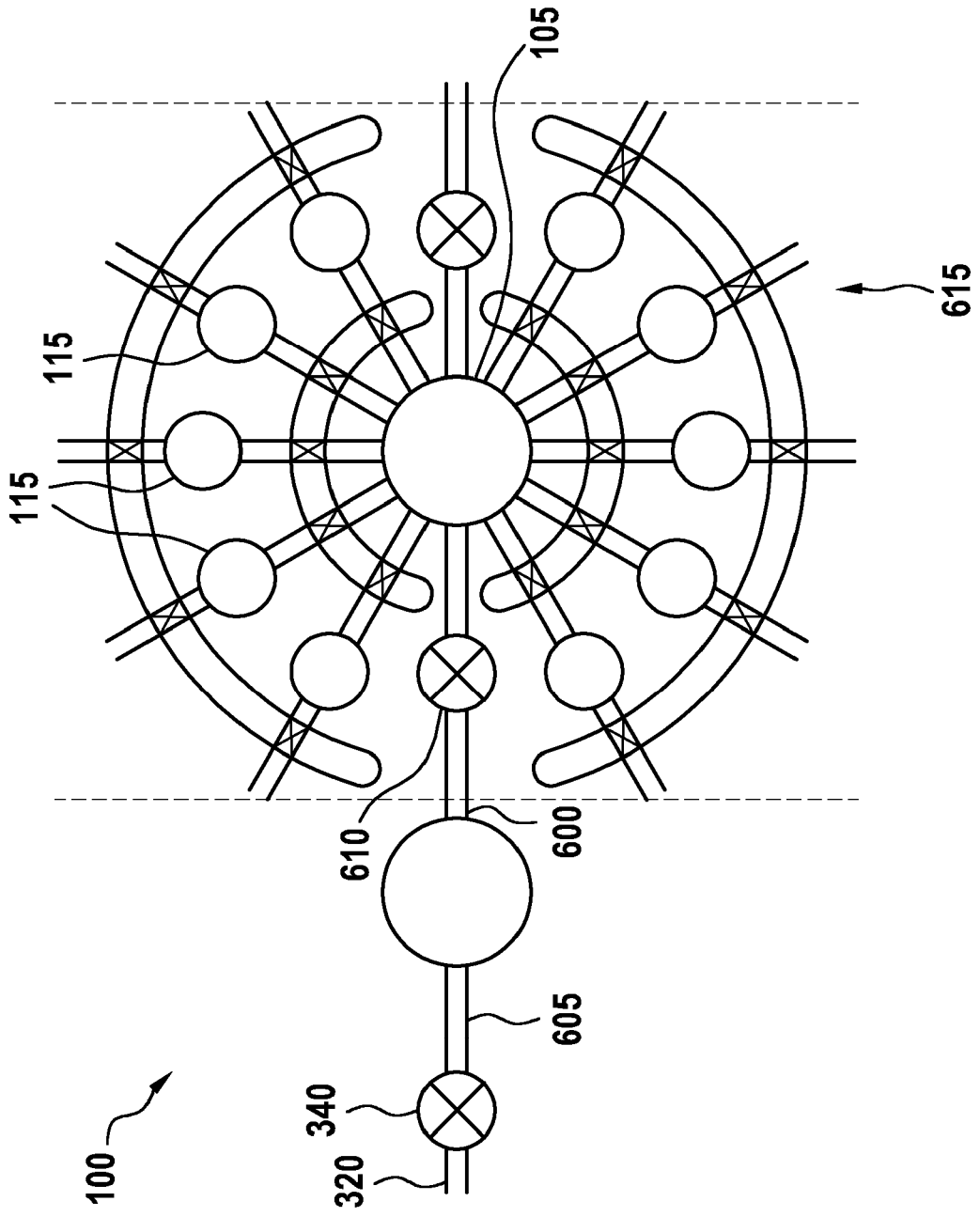


Fig. 7

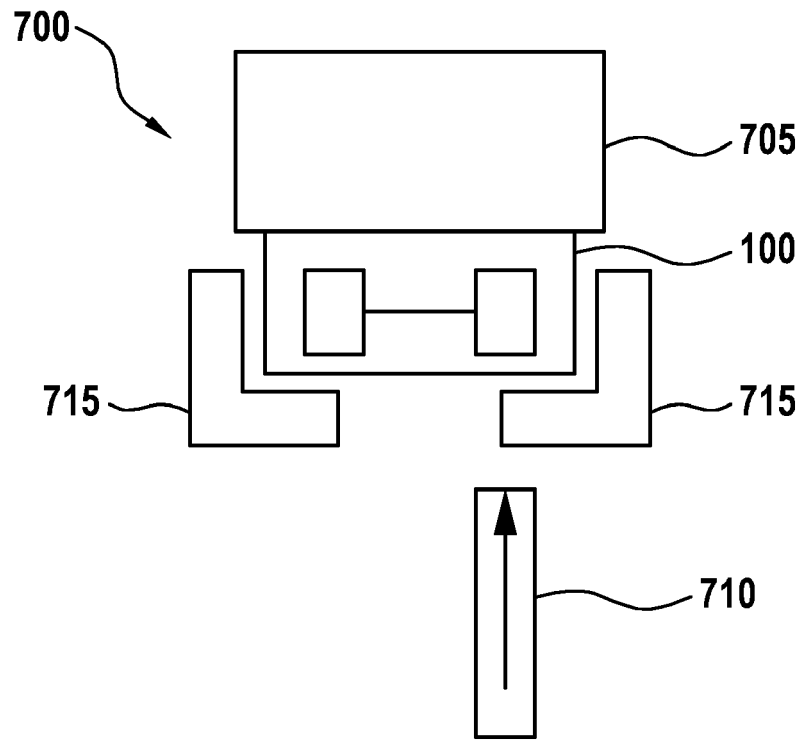


Fig. 8

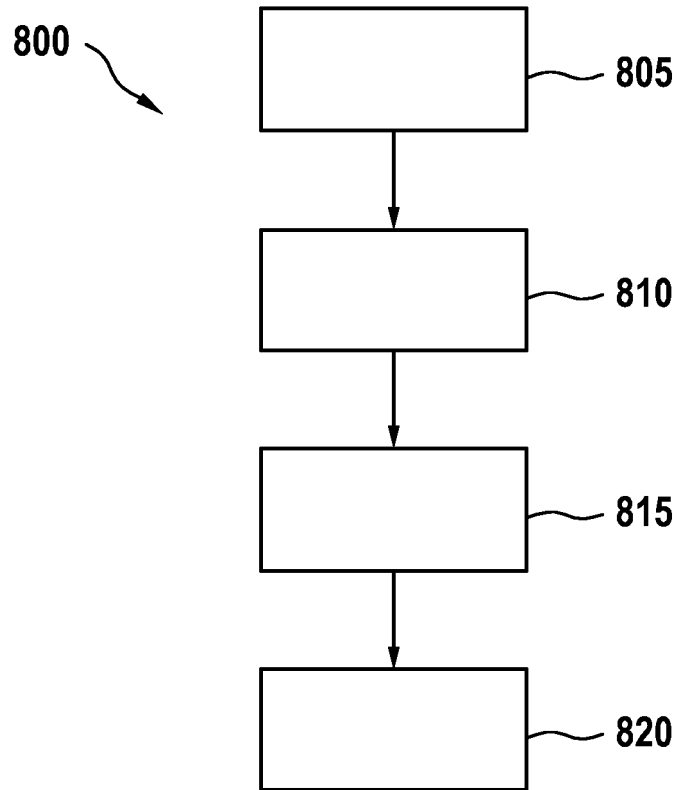


Fig. 9

