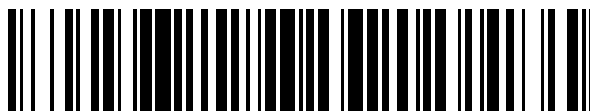


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 799 422**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6816 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2012 PCT/US2012/028721**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2012 WO12122564**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2012 E 12754295 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2020 EP 2683822**

54 Título: **Dispositivos y métodos de diagnóstico y preparación de muestras**

30 Prioridad:

10.03.2011 US 201161451528 P

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

17.12.2020

73 Titular/es:

**GENERAL ATOMICS (100.0%)
3550 General Atomics Court
San Diego, California 92121, US**

72 Inventor/es:

**KELLEY, SHANA;
BORTOLIN, SUSAN;
ORTON, REGINALD, JAMES, MCKENZIE y
WIECHULA, STEFAN, CHRISTOPHER**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 799 422 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

Dispositivos y métodos de diagnóstico y preparación de muestras

Campo de la invención

5 El campo de la invención son las composiciones y métodos relacionados con la preparación y análisis de ácido nucleico, especialmente en que se refieren a dispositivos y métodos de diagnóstico inmediato.

Antecedentes

10 La caracterización de los analitos presentes en muestras biológicas es una parte integral tanto de la investigación biológica como de la práctica médica. La preparación de las muestras es un primer paso habitual en este proceso, y varía considerablemente en lo que se refiere a la complejidad dependiendo de la naturaleza del analito y la propia muestra biológica. Para la determinación de la concentración de un fármaco terapéutico en plasma, la preparación de la muestra puede ser tan simple como esperar a que se forme un coágulo y transferir una porción de la fracción líquida a un analizador. Otros analitos, tales como ácidos nucleicos, pueden secuestrarse normalmente dentro de las células o virus de los que necesitan liberarse antes de la caracterización. Además, una vez liberados a menudo resulta deseable procesar tales moléculas adicionalmente con el fin de simplificar el análisis.

15 Se conocen numerosos métodos para liberar las moléculas de analito de las células, incluidas estrategias mecánicas (tales como sonicación, aplicación de fuerzas de cizallamiento, aplicación de calor y agitación en presencia de partículas) y métodos químicos (tales como el uso de calor (para producir un efecto químico), surfactantes, caótopos y enzimas). Algunos de estos se han adaptado para su uso en un cartucho de plataformas de microfluidos tales como las representadas por dispositivos de análisis inmediato y en la consulta de un único uso y, cada vez más, como componentes de sistemas complejos donde la contaminación es un problema. Por ejemplo, el documento US5874046A divulga la alteración celular mediante el uso de ultrasonidos y la aplicación de fuerzas de cizallamiento, entre otros métodos. De manera similar, el documento GB2416030B divulga dispositivos integrados que utilizan la digestión enzimática o mecánica para lisar las células y liberar su contenido para el análisis. El documento US6664104B2 divulga dispositivos que lisar células mediante diversos medios que incluyen la alteración mecánica, la aplicación de ultrasonidos y la adición de caótopos a la muestra. El documento WO2011/119711A1 divulga un cartucho de ensayo que utiliza temperaturas y presiones elevadas como tratamiento de una muestra para liberar analitos de tales compartimentos biológicos. Desafortunadamente, los métodos mecánicos para alterar células pueden incrementar significativamente la complejidad de un dispositivo integrado y la instrumentación auxiliar. De manera similar, la adición de reactivos químicos, tales como caótopos o enzimas, a una muestra no solo requiere un medio para medir la cantidad correcta de reactivo, sino que puede requerir la retirada de tales reactivos en un punto posterior del proceso para que no compliquen el análisis. Esto es particularmente cierto para métodos analíticos sensibles tales como PCR o electroquímica.

35 Aunque a menudo se utiliza para introducir material genético exógeno en las células, se ha mostrado que la electroporación es un medio eficaz para liberar ácidos nucleicos de las células. Se ha divulgado la liberación de ácidos nucleicos de células de alga (Bahiet *et al.*, *J. R. Soc. Interface*, 8:601-608 (2011)) concentrando inicialmente las células en la superficie de un electrodo y aplicando una corriente de frecuencia elevada (600 kHz). Desafortunadamente, tales condiciones pueden conllevar la producción de un calor considerable, que puede ser difícil de disipar en un dispositivo de microfluidos sin el uso de complejos intercambiadores de calor u otros dispositivos de transferencia térmica. El documento US2010/0112667A1 divulga el uso de un dispositivo con una configuración de electrodos compleja que coloca números aislantes pequeños colocados entre un par de electrodos con el fin de lisar las células; esta configuración genera gradientes de corriente de campo elevada dentro de los pequeños huecos entre los aislantes y reduce la demanda de energía. Estas condiciones también pueden provocar otros efectos indeseables tales como burbujas, agentes más reactivos o inhibidores, o rotura de las estructuras de soporte.

45 También se ha descrito la lisis de células eucarióticas mediante la generación de productos de hidrólisis dentro de un dispositivo de microfluidos utilizando electrodos (Di Carlo *et al.*, *Lab Chip*, 5:171-178 (2005)), donde se observó que era necesaria la generación local de iones hidróxido en concentraciones relativamente elevada (estimadas en aproximadamente 20 mM) para una lisis rápida. Estos investigadores no mencionan la recuperación o caracterización de los analitos de la célula lisada. Lee *et al.* (*Lab Chip*, 10:626-633 (2010)) describen un dispositivo similar que incorpora un diafragma polimérico de intercambio iónico para generar concentraciones elevadas de hidróxido con el fin de lisar de manera eficaz las células bacterianas. Los autores fueron capaces de realizar PCR en analitos de ADN liberados en este proceso pero señalaron que esta estrategia general no fue adecuada para utilizarla con técnicas de detección que utilizan ARN y PCR.

55 En conjunto, los métodos actuales para liberar analitos de las células, virus y otros compartimentos biológicos son difíciles de implementar en un dispositivo de análisis inmediato o con microfluidos independiente. El tamaño relativamente pequeño de tales dispositivos conlleva restricciones de volumen que complican las operaciones tales como la manipulación de fluidos relacionada con la adición de reactivos y captura y liberación en fase sólida de analitos con el fin de retirar tales reactivos antes del análisis. Su dimensión reducida también limita las opciones para aplicar

fuerzas físicas (tales como ultrasonidos y fuerzas de cizallamiento) utilizando un equipo convencional y proporcionan una capacidad térmica relativamente pequeña para controlar la temperatura. Aunque se han utilizado métodos que utilizan electrodos tales como la generación electroquímica de especies reactivas, su utilidad con ciertos analitos, especialmente ARN, no está clara. Ninguna de estas estrategias proporciona una fragmentación controlada del analito, que supone una ventaja en muchos métodos analíticos directos, además de una lisis del compartimento biológico.

La parte anterior muestra que existe una necesidad no cubierta de un método y dispositivo que no solo proporcione una lisis del compartimento biológico y fragmentación de los analitos liberados de esta manera fiables, rápidas y controlables con facilidad, sino que también tenga unos requisitos del equipo físico que se puedan adaptar con facilidad a los dispositivos a pequeña escala. Un dispositivo y método de este tipo se pueden incorporar a un dispositivo de análisis inmediato o "nanolaboratorio" microfluído donde la lisis celular controlada y la fragmentación de analitos resultan útiles.

Compendio de la invención

Se utilizó un potencial eléctrico modulado a un conjunto de electrodos para liberar ácidos nucleicos, y especialmente ARN, de una muestra biológica, con el objetivo de proporcionar una estrategia simple y fiable de análisis genético que sea susceptible de miniaturización y uso en varios dispositivos de análisis inmediato y de uso en la consulta. Sorprendentemente, se observó que el control de varios aspectos del potencial eléctrico modulado permitió tanto la liberación de ácidos nucleicos de muestras biológicas como la fragmentación controlada de los ácidos nucleicos liberados (normalmente ARN). La fragmentación observada se logra rápidamente con voltajes bajos y convenientemente reduce el tiempo requerido para el análisis así como también la generación de calor, reduce las burbujas y se reducen los subproductos químicos no deseados. Además, tales sistemas y métodos son especialmente deseables cuando el análisis posterior es un análisis de hibridación de ARN electroquímico directo.

En una realización de la materia de la invención, se coloca una muestra biológica o una porción de esta en una zona de extracción que incluye un par o múltiples pares de electrodos. Se aplica una diferencia de potencial modulado a los electrodos, que induce la liberación de ácidos nucleicos, y especialmente ARN, de la muestra biológica y a la solución. Los ácidos nucleicos liberados se fragmentan mientras están en la zona de extracción, siendo la longitud promedio de los ácidos nucleicos fragmentados igual o inferior a aproximadamente un 75% (más preferentemente, igual o inferior a aproximadamente un 50%, y de la manera más preferente igual o inferior a aproximadamente un 25%) de la longitud de los ácidos nucleicos liberados antes de la fragmentación. El método puede tener un paso adicional de ajuste de la diferencia de potencial modulado, el tiempo de permanencia de la muestra biológica en la zona de extracción, o ambos con el fin de ajustar la longitud promedio de los fragmentos de ácido nucleico. La diferencia de potencial modulado se puede ajustar de diversas maneras, que incluyen sin carácter limitante la magnitud del voltaje aplicado a los electrodos, la duración de un pulso de voltaje aplicado a los electrodos y la frecuencia a la cual se aplica el pulso de voltaje a los electrodos, o una combinación de estos. En otras realizaciones, la longitud promedio de los fragmentos de ácido nucleico puede ser de aproximadamente 200 bases de longitud o menos. En otras realizaciones más, la diferencia de potencial modulado se controla para producir fragmentos de ácido nucleico que tienen un tiempo requerido para la hibridación a una sonda de fase sólida reducido respecto al tiempo requerido para que los ácidos nucleicos se hibriden antes de la fragmentación. En tales realizaciones el tiempo requerido para la hibridación de los fragmentos de ácido nucleico se puede reducir a al menos la mitad del tiempo requerido para los ácidos nucleicos antes de la fragmentación. Los reactivos se pueden introducir en la zona de extracción para mejorar la eficacia de estos procesos, tales reactivos potenciadores pueden incluir iones metálicos, compuestos que promueven la formación de radicales libres, caótrópos y detergentes iónicos y no iónicos.

Otra realización de la materia de la invención es un dispositivo para preparar ácidos nucleicos, especialmente ARN, a partir de una muestra biológica. Un dispositivo de este tipo puede incluir un depósito de fluido, una zona de recepción de la muestra y una zona de extracción. Estos se pueden disponer de manera que la zona de recepción de la muestra esté entre el depósito de fluido y la zona de extracción y esté en comunicación fluida con cada uno de ellos, para proporcionar de esta manera una ruta para los fluidos desde el depósito de fluido, a través de la zona de recepción de la muestra y al interior de la zona de extracción. En una realización de este tipo, el depósito de fluido puede tener opcionalmente una pared deformable con una superficie externa, que puede ser accesible, y la zona de extracción puede incluir un par o múltiples pares de electrodos. Los electrodos de la zona de extracción se pueden configurar para que efectúen la liberación de ácidos nucleicos desde la muestra biológica y para que fragmenten los ácidos nucleicos liberados. En algunas realizaciones, el depósito de fluido puede incluir un tampón de extracción que favorece la preparación de ácidos nucleicos a partir de la muestra biológica. En algunas realizaciones, la presión aplicada a la pared deformable del depósito de fluido desplaza o deforma la pared deformable hacia el interior del depósito de fluido, y reduce su volumen. En una realización de este tipo, la presión aplicada al depósito de fluido provoca que el fluido almacenado dentro fluya al interior de la zona de recepción de la muestra. Se puede aplicar una presión de este tipo a la superficie externa de la pared deformable, y esta puede ser aplicada por un dispositivo o a mano por el usuario. Las muestras biológicas a menudo se suministran en forma de un dispositivo colector, por ejemplo, un frotis. La zona de recepción de la muestra se puede configurar para recibir y retener una muestra de este tipo y al menos una porción del dispositivo de recogida auxiliar.

En otra realización de la materia de la invención, se analiza una muestra biológica utilizando un dispositivo con una zona de extracción que incluye un par o múltiples pares de electrodos y está en comunicación fluida con una zona de análisis que incluye un electrodo de detección y un electrodo de referencia. Una porción de la muestra biológica se introduce en la zona de extracción, donde la carga o corriente se aplica a los electrodos en esta utilizando un protocolo que es eficaz para liberar ácidos nucleicos, especialmente ARN, desde la muestra biológica y fragmentar los ácidos nucleicos liberados para producir ácidos nucleicos fragmentados. Estos fragmentos pueden tener una longitud promedio de aproximadamente 200 bases o menos. Los ácidos nucleicos fragmentados se mueven a la zona de análisis, donde se ha aplicado un segundo flujo de carga o corriente al electrodo de detección y el electrodo de referencia. A continuación, se mide un tercer flujo de carga o corriente entre el electrodo de detección y el electrodo de referencia para cuantificar, determinar la presencia de, o caracterizar de otra manera un ácido nucleico en la muestra biológica. En algunas realizaciones, el método incluye el uso de un electrodo de detección que incluye un sistema indicador que responde a la hibridación del ácido nucleico. El electrodo de detección puede incluir una molécula sonda que es al menos parcialmente complementaria a un ácido nucleico fragmentado. En algunas realizaciones, el electrodo de detección puede estar nanoestructurado, de modo que la nanoestructura tenga púas, sea irregular o fractal. El tiempo de hibridación depende en parte del tamaño de los fragmentos de ácido nucleico; por lo tanto, resulta ventajoso controlar el tamaño de estos fragmentos. Con este objetivo, en algunas realizaciones, el primer flujo de carga o corriente se puede ajustar o modular para optimizar o ajustar la longitud de los fragmentos de ácido nucleico producido en la zona de extracción. Tales ajustes pueden incluir la magnitud del voltaje aplicado al par de electrodos, la duración de un pulso de voltaje aplicado al par de electrodos, la frecuencia a la que se aplica un pulso de voltaje al par de electrodos, la duración del tiempo de tratamiento o una combinación de estos. En otras realizaciones, el tamaño de los fragmentos de ácido nucleico se puede optimizar o ajustar controlando el tiempo de permanencia de la muestra biológica dentro de la zona de extracción. En otras realizaciones más, tanto el primer flujo de carga o corriente al par de electrodos y el tiempo de permanencia de la muestra biológica dentro de la zona de extracción se ajustan para optimizar o ajustar el tamaño de los fragmentos de ácido nucleico.

Por lo tanto, la materia de la presente invención posibilita el procesamiento de una muestra biológica para liberar y proporcionar ácidos nucleicos, y especialmente ARN, en una forma adecuada para el análisis directo. La materia de la invención presentada en la presente también proporciona métodos y dispositivos para fragmentar estos ácidos nucleicos de una manera controlada con el fin de reducir convenientemente el tiempo requerido para un análisis posterior. Estos métodos y dispositivos son especialmente adecuados para la incorporación a dispositivos de análisis inmediato y dispositivos de microfluidos.

Diversos objetos, características, aspectos y ventajas de la presente invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención.

Descripción breve de los dibujos

La Figura 1 representa esquemáticamente una realización de una zona de extracción de la materia de la invención. Se expone un par de electrodos separados por aislantes dentro de un espacio de reacción, que efectúa tanto la lisis celular que libera los ácidos nucleicos como la fragmentación controlada de los ácidos nucleicos liberados de esta manera.

La Figura 2 representa esquemáticamente otra realización de una zona de extracción de la materia de la invención. Un par de electrodos en un sustrato común está dentro de un espacio de reacción definido por un conjunto de paredes aislantes efectúa tanto la lisis celular que libera los ácidos nucleicos como la fragmentación controlada de los ácidos nucleicos liberados de esta manera.

La Figura 3 representa esquemáticamente otra realización de la zona de extracción de la materia de la invención. Un par de electrodos está dentro de un canal aislado que actúa como espacio de reacción. El par de electrodos efectúa tanto la lisis celular que libera los ácidos nucleicos como la fragmentación controlada de los ácidos nucleicos liberados de esta manera.

La Figura 4 representa esquemáticamente otra realización de una zona de extracción de la materia de la invención. Una matriz de electrodos está dentro de un canal aislado que actúa como un espacio de reacción. La matriz de electrodos efectúa tanto la lisis celular que libera los ácidos nucleicos como la fragmentación controlada de los ácidos nucleicos liberados de esta manera.

La Figura 5 representa esquemáticamente otra realización de una zona de extracción de la materia de la invención. Un par de electrodos está integrado en una matriz aislante. Un miembro del par es cilíndrico. El electrodo restante está dentro de la luz del electrodo cilíndrico, que también define un espacio de reacción dentro del cual el par de electrodos efectúa tanto la lisis celular que libera los ácidos nucleicos como la fragmentación controlada de los ácidos nucleicos liberados de esta manera.

La Figura 6 representa esquemáticamente otra realización de una zona de extracción de la materia de la invención. Los electrodos individuales de un par de electrodos están unidos a sustratos aislantes que se montan en paralelo, definiendo el espacio intermedio un espacio de reacción dentro del cual el par de electrodos efectúa tanto la lisis

celular que libera los ácidos nucleicos como la fragmentación controlada de los ácidos nucleicos liberados de esta manera. Los electrodos incluyen características que se proyectan en el espacio de reacción.

5 La Figura 7 representa esquemáticamente otra realización de una zona de extracción de la materia de la invención. Los electrodos individuales de un par de electrodos se unen a sustratos aislantes que se montan en paralelo, definiendo el espacio intermedio un espacio de reacción dentro del cual el par de electrodos efectúa tanto la lisis celular que libera los ácidos nucleicos como la fragmentación controlada de los ácidos nucleicos liberados de esta manera.

10 La Figura 8 representa esquemáticamente otra realización de una zona de extracción de la materia de la invención. Un conjunto de electrodos porosos forma dos paredes de un espacio de reacción, que está definido adicionalmente por un par de paredes aislantes. Dentro del espacio de reacción el par de electrodos efectúa tanto la lisis celular que libera los ácidos nucleicos como la fragmentación controlada de los ácidos nucleicos liberados de esta manera.

15 La Figura 9 representa esquemáticamente una realización de un dispositivo de la materia de la invención. Se proporcionan un depósito de reactivo, un área de recepción de la muestra y una zona de extracción en un único sustrato. El área de recepción de la muestra se configura para recibir la porción colectora de un colector de la muestra, está entre el depósito de reactivo y la zona de extracción, y está en comunicación fluida con ambos.

20 La Figura 10 representa esquemáticamente una realización de un dispositivo de la materia de la invención. Se proporcionan un depósito de reactivo, un área de recepción de la muestra, una zona de extracción y una zona de análisis en un único sustrato. El área de recepción de la muestra está configurada para recibir la porción colectora de un colector de la muestra, está entre el depósito de reactivo y la zona de extracción, y está en comunicación fluida con ambos. Un canal fluido dirige los materiales de la zona de extracción a la zona de análisis.

25 La Figura 11 representa esquemáticamente una realización de un dispositivo de la materia de la invención. Se proporcionan un depósito de reactivo, un área de recepción de la muestra y una zona de extracción en un sustrato. El área de recepción de la muestra se configura para recibir la porción colectora de un colector de la muestra, está entre el depósito de reactivo y la zona de extracción, y está en comunicación fluida con ambos. Un canal fluido conduce desde la zona de extracción. Se proporciona una zona de análisis con un canal complementario fluido en un segundo sustrato.

30 La Figura 12 representa esquemáticamente una realización del dispositivo de la materia de la invención. Se proporcionan un depósito de reactivo, un área de recepción de la muestra, una zona de extracción y una pluralidad de zonas de análisis en un único sustrato. El área de recepción de la muestra se configura para recibir la porción colectora del colector de la muestra, está entre el depósito de reactivo y la zona de extracción, y está en comunicación fluida con ambos. Un canal fluido ramificado dirige y distribuye el material de la zona de extracción a las zonas de análisis.

35 La Figura 13 representa una realización del dispositivo de la materia de la invención. Se proporcionan múltiples depósitos de reactivo, un área de recepción de la muestra configurada para acoplarse con un colector de la muestra, una zona de extracción, una zona de análisis y una zona de recogida de desechos en un único sustrato. El dispositivo se muestra acoplado a un frotis con la muestra.

40 La Figura 14 ilustra los resultados del método divulgado. La Figura 14A muestra un gel de agarosa teñido. Los carriles 1, 2 y 3 contienen patrones del tamaño; el carril 5 contiene la muestra biológica antes del tratamiento; los carriles 6 a 10 presentan muestras que representan diferentes puntos temporales durante el tratamiento. La Figura 14B muestra una exposición más prolongada del gel de la Figura 14A. La Figura 14C proporciona un resumen de las condiciones experimentales.

La Figura 15 es un gráfico que representa el efecto del tamaño del fragmento del ácido nucleico en el tiempo requerido para el análisis.

Descripción detallada

45 Los inventores han descubierto que una diferencia de potencial modulado aplicada a un par de electrodos, o aplicada independientemente a una serie de pares, se puede utilizar tanto para liberar ácidos nucleicos, y especialmente ARN, de una muestra biológica a una solución como para fragmentar los ácidos nucleicos liberados de una manera controlada. Es necesaria la liberación de ácidos nucleicos de compartimentos biológicos tales como células, virus, esporas, etc., en una solución libre antes de la caracterización mediante la mayoría de los métodos de detección actuales, especialmente aquellos que dependen de la hibridación para identificar secuencias de bases específicas.

50 Muchos de estos métodos analíticos directos también se benefician de la fragmentación del ácido nucleico nativo, y especialmente ARN, ya que esto incrementa la tasa de difusión y acelera la cinética de la hibridación específica de la secuencia. La materia de la invención fomenta ambas de estas funciones en una única área de preparación y un único paso de procesamiento, minimiza las pérdidas de material y simplifica enormemente, y reduce el tiempo requerido para, tanto el flujo de trabajo como el diseño de los dispositivos que lo incorporan. A diferencia de los medios químicos

55 y enzimáticos para liberar y fragmentar los ácidos nucleicos, la diferencia del potencial aplicado se controla con

facilidad. Además, la materia de la invención es compatible con los métodos de caracterización de ácidos nucleicos conocidos, por ejemplo, detección electroquímica, que, por lo tanto, se pueden integrar fácilmente en el mismo proceso o dispositivo. Aunque la materia de la invención se puede realizar en varios dispositivos, su simplicidad y mínimos requisitos del equipo físico hacen que sea especialmente adecuada para su uso en dispositivos de análisis inmediato o dispositivos con microfluidos compactos, lo que permite convenientemente la realización de una compleja caracterización genética *in situ* en el campo o en la consulta del médico.

Tal como se utiliza en la presente, el término "lisis" se refiere al proceso de alterar la integridad de un compartimento biológico tal como una célula eucariótica, hongo, bacteria, virus o espora en una medida tal que los componentes internos, y especialmente el ARN, se expongan al entorno externo y puedan entrar en él. Los ejemplos de lisis incluyen la formación de aperturas permanentes o temporales en una membrana celular y la alteración completa de la membrana celular, ambas de las cuales permiten la liberación del contenido celular a la solución circundante.

Tal como se utiliza en la presente, el término "analito" se refiere a una molécula de interés que un usuario desea caracterizar, cuantificar o verificar su presencia. Los ejemplos de analitos de ácido nucleico, y especialmente analitos de ácido ribonucleico, incluyen ARN mensajero (ARNm), ARN ribosómico (ARNr), microARN (miARN), ARN no codificante, ARN interferente pequeño (ARNip) y ARN de transferencia (ARNt). Otros analitos incluyen ADN, proteínas, carbohidratos y lípidos. Otros ejemplos adicionales de analitos incluyen metabolitos de bajo peso molecular tales como aminoácidos, nucleótidos y esteroides.

Tal como se utiliza en la presente, la expresión "compartimento biológico" se refiere a una estructura discreta que contiene y segrega moléculas biológicas de interés del medio circundante, que es normalmente un medio líquido. Los ejemplos de compartimentos biológicos incluyen, sin carácter limitante, células eucarióticas, células fúngicas, células bacterianas, esporas, polen, orgánulos, liposomas y virus.

En una realización de la materia de la invención, la lisis se lleva a cabo por aplicación de una diferencia de potencial a un par de electrodos que están en contacto eléctrico con un volumen de fluido que contiene una muestra biológica que puede contener analitos dentro de una célula eucariótica, hongos, bacterias, virus, esporas, polen u otro compartimento biológico. La aplicación de una diferencia de potencial modulado a estos electrodos, denominados en lo sucesivo electrodos de lisis, da como resultado la lisis de los compartimentos biológicos y la liberación posterior del analito en la solución circundante. La diferencia de potencial se puede modular de varias maneras con el fin de inducir la lisis de los compartimentos biológicos de una muestra. En algunas realizaciones, se puede aplicar un voltaje comprendido entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 3000 V a los electrodos utilizados para la lisis. En una realización preferida, el voltaje aplicado a los electrodos de lisis es de aproximadamente 40 V. Este voltaje puede ser constante o se puede aplicar en pulsos. La duración de tales pulsos de voltaje puede ser de hasta 60 segundos. En una realización preferida, la duración de un pulso de voltaje es de aproximadamente 10 milisegundos. El tiempo entre tales pulsos de voltaje puede ser de hasta 360 segundos. En una realización preferida, el tiempo entre pulsos de voltaje es de aproximadamente 1 segundo. Un pulso de voltaje también puede tener una forma de onda característica, y se puede aplicar a los electrodos de lisis como una forma de onda repetida. Las formas de onda de voltaje incluyen, sin carácter limitante, ondas triangulares, ondas cuadradas, ondas sinusoides, ondas de disminución exponencial, formas de onda de sierra y formas de onda de sierra inversa. En una realización preferida, el pulso de voltaje se aplica a los electrodos de lisis como una onda cuadrada. Se desconoce el mecanismo para la lisis de esta manera. Sin querer ceñirse a ninguna teoría o hipótesis particular, el inventor contempló que la lisis es un resultado de procesos electrolíticos (por ejemplo, generación de hidróxido y otras especies reactivas) posiblemente de manera concertada con electroporación. Sin embargo, el uso de una frecuencia relativamente baja, potenciales de voltaje bajos y eficacia en la presencia de especies tamponantes indica que otros mecanismos pueden ser responsables.

En algunas realizaciones de la materia de la invención, la lisis es selectiva, efectúa la liberación de los analitos de un subconjunto de células u otros compartimentos biológicos presentes dentro de la muestra biológica. Por ejemplo, en una realización de este tipo, se pueden seleccionar las condiciones para lisar y liberar el analito de las células epiteliales presentes en un frotis de la mejilla, pero no células bacterianas que también puedan estar presentes en la muestra. Se puede lograr la lisis selectiva controlando el voltaje que se aplica a los electrodos de lisis, que puede estar comprendido entre aproximadamente 0,5 V y aproximadamente 3000 V. En otras realizaciones, se puede controlar la duración del pulso de voltaje que se aplica a los electrodos de lisis para conseguir una lisis eficaz; en tales realizaciones, la duración del pulso de voltaje (es decir, la "amplitud del pulso") puede estar comprendida entre aproximadamente 1 milisegundo y aproximadamente 60 segundos. En otra realización, se puede implementar una lisis selectiva controlando la frecuencia en la que se aplica el voltaje a los electrodos de lisis; en tales realizaciones, esta frecuencia puede estar comprendida entre aproximadamente 0,01 Hz y aproximadamente 1000 Hz. En otra realización más, se puede aplicar un potencial AC de alta frecuencia, que puede estar comprendido entre aproximadamente 0,1 Hz y aproximadamente 1000 Hz, a los electrodos de lisis con el fin de efectuar una lisis selectiva. En otra realización más, se puede controlar la duración del tratamiento de lisis con el fin de lisar de manera selectiva ciertas células u otros tipos de compartimentos biológicos. En una realización de este tipo, la duración del tratamiento de lisis puede estar comprendida entre aproximadamente 1 milisegundo y aproximadamente 5 minutos. En una realización preferida, se controlan dos o más del voltaje aplicado, amplitud del pulso, frecuencia del voltaje, potencial AC de alta frecuencia y duración del tratamiento con el fin de realizar una lisis selectiva.

En algunas realizaciones de la materia de la invención, la lisis selectiva se realiza sin que sea necesario modular el potencial aplicado a los electrodos de lisis. En tales realizaciones, la lisis selectiva se puede lograr mediante la adición de una sonda potenciadora de la lisis o sensibilizador que se asocia con un tipo de compartimento biológico seleccionado. Como alternativa, se puede utilizar una sonda de inhibición o disminución de la lisis o desensibilizador que se asocia con tipos de compartimentos biológicos seleccionados para efectuar una selección negativa. En otras realizaciones, los compartimentos biológicos seleccionados se pueden segregar antes de la lisis, por ejemplo, mediante movimiento electroforético o dielectroforético, captura magnética utilizando partículas magnéticas e imanes de captura, mecanismos de captura con anticuerpos, filtración mecánica selectiva para el tamaño y mecanismos de separación basados en el flujo. En otras realizaciones más, la modulación del potencial aplicado a los electrodos de lisis se puede utilizar combinado con el uso de una o más de una sonda potenciadora de la lisis, una sonda de inhibición o disminución de la lisis, o un método de segregación con el fin de proporcionar una lisis selectiva.

La eficacia de la lisis de compartimentos biológicos se puede mejorar mediante la adición de reactivos potenciadores a la muestra. El reactivo potenciador puede ser, sin carácter limitante, un ion metálico incluidos iones de hierro, rutenio, zinc, manganeso y/o cobre. Estos iones metálicos se pueden utilizar combinados con agentes quelantes (por ejemplo, EDTA). En algunas realizaciones, el reactivo potenciador es un compuesto que promueve la formación de radicales libres. Los ejemplos de tales compuestos incluyen, sin carácter limitante, agentes quelantes (por ejemplo, EDTA), peróxido de hidrógeno, peróxidos orgánicos y oxígeno disuelto. En otra realización, el reactivo potenciador es una sal caotrópica. En otra realización más, el agente potenciador es un surfactante, incluidos detergentes no iónicos y detergentes iónicos. En algunas realizaciones, se pueden utilizar combinados dos o más reactivos potenciadores.

Una vez que se efectúa la lisis, se pueden liberar una diversidad de analitos al medio circundante para un análisis posterior. En una realización preferida, el analito es un ácido nucleico. Los ejemplos de ácidos nucleicos incluyen ADN, y especialmente ARN (por ejemplo, ARNr, ARNm, ARNt, microARN, ARN no codificante, etc.). Otros analitos intracelulares, tales como proteínas (que incluyen, sin carácter limitante, enzimas, proteínas estructurales, proteínas reguladoras, receptores de la superficie celular e inmunoglobulinas) se pueden liberar de esta manera. Se manera similar, se pueden liberar para su análisis analitos intracelulares de bajo peso molecular (por ejemplo, nucleótidos, hormonas, moléculas de señalización, aminoácidos, sales, lípidos y esteroides).

Sorprendentemente, se observó que, en algunas realizaciones de la materia de la invención, las moléculas de analito que se liberan desde los compartimentos biológicos están escindidas o fragmentadas. Por ejemplo, el ARN de una célula lisada mediante la aplicación de un potencial modulado a un par de electrodos de lisis puede tener una longitud promedio de más de 2000 bases justo después de la lisis, pero que es escindido rápidamente en fragmentos de una longitud reducida en las condiciones líticas. El tamaño promedio de tales fragmentos puede ser de hasta aproximadamente un 75% del tamaño o longitud del analito no fragmentado. En otras realizaciones, el tamaño promedio de tales fragmentos puede ser de hasta un 60%, hasta un 50%, hasta un 40%, hasta un 30% o hasta un 20% del tamaño o longitud del analito no fragmentado. Por lo tanto, en una realización preferida, el analito es un ácido nucleico (y más típicamente ARN) donde una proporción elevada del ácido nucleico fragmentado tiene una longitud de aproximadamente ≤ 500 bases, más preferentemente ≤ 300 bases y de la manera más preferente ≤ 200 bases (por ejemplo, entre 20 y 100 bases o entre 50 y 150 bases). Esta fragmentación puede reducir convenientemente el tiempo requerido para detectar o caracterizar de otra manera el analito liberado. Por ejemplo, la fragmentación de una molécula de analito puede reducir el peso molecular e incrementar la velocidad de difusión, y potenciar de esta manera las colisiones moleculares y velocidades de reacción. En otro ejemplo, la fragmentación de un ácido nucleico puede reducir el grado de la estructura secundaria, para potenciar de esta manera la tasa de hibridación con una molécula sonda complementaria. El mecanismo para esta fragmentación no está claro. Se cree que es el resultado de un proceso electrolítico (por ejemplo, la generación de hidróxido, radicales libres y otras especies reactivas), sin embargo, su eficacia cuando se utilizan potenciales de relativamente baja frecuencia y bajo potencial y en presencia de especies tamponantes indica que otros mecanismos pueden ser responsables.

Por lo tanto, y visto desde otra perspectiva, la fragmentación se ajusta preferentemente de manera que cualesquiera tiempos de hibridación posteriores se reduzcan (en comparación con los tiempos de hibridación para ácidos nucleicos no fragmentados en condiciones por lo demás idénticas) en al menos un 25%, más preferentemente al menos un 50%, aún más preferentemente al menos un 65% y de la manera más preferente al menos un 80%. Por ejemplo, el ARN se puede liberar de una célula y fragmentarse de manera que el tiempo requerido para la hibridación y el tiempo de hibridación del análisis electroquímico se reduzcan en al menos un 25%, más preferentemente al menos un 50%, aún más preferentemente al menos un 65% y de la manera más preferente al menos un 80%.

En algunas realizaciones de la materia de la invención, la fragmentación del analito se puede controlar mediante la aplicación de una diferencia de potencial modulado a los electrodos de lisis. La diferencia de potencial se puede modular de diversas maneras. En algunas realizaciones se puede aplicar un voltaje comprendido entre aproximadamente 0,5 V y aproximadamente 3000 V a los electrodos de lisis. En una realización preferida, el voltaje aplicado a los electrodos de lisis es de aproximadamente 100 V o de aproximadamente 200 V desde pico de voltaje a pico de voltaje. Este voltaje puede cambiar o se puede aplicar en pulsos. La duración de tales pulsos de voltaje puede ser de hasta 60 segundos. En una realización preferida la duración de un pulso de voltaje es de aproximadamente 10 milisegundos. El tiempo entre tales pulsos de voltaje puede ser de hasta 360 segundos. En una realización preferida,

el tiempo entre pulsos de voltaje es de aproximadamente 1 segundo. Un pulso de voltaje también puede tener una forma de onda característica, y se puede aplicar a los electrodos de lisis como una forma de onda repetida. Las formas de onda de voltaje incluyen, sin carácter limitante, ondas triangulares, ondas cuadradas, ondas sinusoides, ondas de disminución exponencial, formas de onda de sierra y formas de onda de sierra inversa. En una realización preferida, el pulso de voltaje se aplica a los electrodos de lisis como una onda cuadrada. En otra realización más, se puede controlar la duración del tratamiento de lisis/fragmentación con el fin de controlar la fragmentación del analito. En una realización de este tipo, la duración del tratamiento de lisis/fragmentación puede estar comprendido entre aproximadamente 1 milisegundo y aproximadamente 5 minutos. Donde el tiempo de tratamiento es el tiempo que el fluido está en contacto con los electrodos. En un dispositivo de flujo continuo, el tiempo total de lisis para una muestra dada puede ser superior a los tiempos de tratamiento indicados. En algunas realizaciones de la materia de la invención, el potencial aplicado a los electrodos de lisis para la lisis de los compartimentos biológicos y para la fragmentación de los analitos se modula de la misma manera, de modo que la lisis y la fragmentación ocurran dentro del mismo marco temporal. En otras realizaciones, el potencial aplicado a los electrodos de lisis se modula inicialmente para optimizar la lisis, y a continuación, se modula posteriormente para optimizar la fragmentación del analito. En otra realización más, los voltajes modulados que son óptimos para la lisis del biocompartimento y para la fragmentación del analito se pueden alternar.

En algunas realizaciones de la materia de la invención, los electrodos de lisis comprenden un primer electrodo y un segundo electrodo separados por una distancia que puede estar comprendida entre 1 nanómetro y 2 milímetros. Este espacio puede contener un material aislante de modo que ubique adicionalmente la diferencia de potencial aplicado a los electrodos. Los electrodos de lisis se pueden construir de diversos materiales que sean adecuados para las necesidades del fabricante o aplicación. Los materiales adecuados incluyen carbono y metales tales como oro, plata, platino, paladio, cobre, níquel, aluminio, rutenio y aleaciones de estos. Los materiales adecuados para los electrodos de lisis también pueden incluir polímeros conductores que incluyen, sin carácter limitante, *trans*-poliacetileno dopado con yodo, poli(dioctil-bitiofeno), polianilina, polímeros y fluoropolímeros impregnados de metales, polímeros y fluoropolímeros impregnados de carbono y mezclas de estos. En algunas realizaciones, los electrodos de lisis pueden estar constituidos, en parte o en su totalidad, por una combinación de estos materiales.

Los electrodos de lisis pueden tener diversas geometrías y disposiciones. En algunas realizaciones, los electrodos de lisis se montan en, o forman parte de, una superficie interior de una cámara o canal utilizado para la lisis (una "zona de lisis"). En la **Figura 1** se muestra una realización, donde un electrodo de lisis (110) está separado de un segundo electrodo de lisis (120) por un aislante (130). El espacio entre los electrodos (140) está ocupado, al menos en parte, por una muestra biológica durante la lisis y la fragmentación. En la **Figura 2** se muestra otra realización de la materia de la invención, donde los electrodos de lisis (210, 220) están sobre un sustrato aislante (250) que está expuesto a un fluido que contiene una muestra biológica. En una realización de este tipo, las paredes aislantes (230) se pueden utilizar para definir un canal de flujo, y se pueden aumentar adicionalmente mediante la adición de una pared aislante (260) que forma una cámara (240).

En otras realizaciones, los electrodos de lisis están dentro del espacio interior de una cámara o canal. Por ejemplo, la **Figura 3** muestra una cámara de lisis o zona de lisis con electrodos lineales (310, 320) que están dentro de una cámara o canal (340) delimitada por paredes aislantes (330). Se podría construir tal cámara o canal como un serpentín, y configurarse para utilizar una muestra en flujo o estática. La **Figura 4** ilustra una realización similar que utiliza una matriz de electrodos microestructurados (410) que se colocan en la zona de lisis delimitada por los aislantes (420) para formar una cámara o canal (430) que contiene una muestra biológica. En una realización de este tipo con los electrodos se puede formar una superficie planar mediante medios adecuados (que incluyen, por ejemplo, micromecanizado, moldeado, recubrimiento y electrodeposición) y se pueden configurar de manera que el hueco entre los electrodos sea mayor que el diámetro de un electrodo individual.

En otras realizaciones, la zona de lisis es esencialmente tubular. En la **Figura 5** se muestra una realización de este tipo, donde un electrodo de lisis (510) es un tubo hueco que forma la pared exterior de una cámara (540) que contiene una muestra biológica y un segundo electrodo de lisis (520) está dentro de la luz del electrodo tubular (510). El electrodo de lisis más externo (510) puede estar rodeado o integrado en un aislante (530) en una realización de este tipo. Se puede utilizar una realización de este tipo con una muestra en flujo o estática.

En algunas realizaciones, la zona de lisis se configura como un canal que contiene electrodos de lisis. La **Figura 6** ilustra una realización de este tipo, donde un canal (640) incluye un par de electrodos de lisis (620, 610) que incluye salientes o proyecciones que sobresalen hacia el canal. Estos sirven para incrementar la intensidad del campo local aplicado a una muestra biológica dentro del canal (640) y, en el caso de una corriente fluida de una muestra fluida, sirve para provocar turbulencias que mejoran la mezcla. Tales salientes o proyecciones se pueden producir por moldeado, micromecanizado, electrodeposición de materiales microestructurados o cualquier medio adecuado. En una realización alternativa, la **Figura 7** muestra un canal (740) que incluye un par de electrodos de lisis (710, 720) que están configurados como un conjunto de rieles situados en el borde de las paredes aislantes (730) del canal. En tales realizaciones, la muestra biológica puede estar presente en un fluido que fluye a lo largo del canal o situada de manera estática dentro del canal.

En otra realización más, como se muestra en la **Figura 8**, los electrodos de lisis (810, 820) son permeables a los líquidos y están separados por un aislante (830), de modo que un fluido que contiene la muestra biológica dentro del espacio (840) que está entre los electrodos pueda someterse a lisis y fragmentación. La muestra biológica puede estar presente en un fluido que fluye a lo largo de los electrodos de lisis o situada de manera estática entre los electrodos de lisis. En una realización de este tipo los electrodos de lisis pueden ser porosos, tejidos, en forma de una malla o red, o una combinación de estos, y también pueden servir como medio de filtración.

Las realizaciones del electrodo de lisis y zona de lisis descritas anteriormente se pueden incorporar en un cartucho. Un cartucho de este tipo puede preparar una muestra para el análisis posterior; un cartucho preparativo de este tipo puede, por ejemplo, configurarse para separar una porción de una muestra biológica de un frotis o colector de la muestra y transportarla a una zona de lisis donde los compartimentos biológicos se lisan y liberan los analitos fragmentados. En una realización de este tipo, la muestra biológica puede incluir el contenido de un frotis eluido en un tampón, sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, orina, heces, líquido seminal, moco, tejido, líquidos respiratorios, alimentos, agua, aire, contenidos eluidos de un filtro o secreciones urogenitales. En la **Figura 9** se muestra un ejemplo de un cartucho preparativo, donde un sustrato (910) actúa de soporte de un depósito de fluido (920) que está en comunicación fluida con un área o zona de recepción de la muestra (930), que a su vez está en comunicación fluida con una cámara o zona de lisis (940) que incluye un par de electrodos de lisis. Un flujo de fluido, que puede incluir reactivos que potencian la lisis y funciones de fragmentación del dispositivo, desde el depósito de fluido transporta una porción de la muestra biológica a la zona de recepción de la muestra (930) y a la zona de lisis (940). El depósito de fluido (920) puede incluir una pared deformable o flexible, de modo que la presión aplicada a la superficie exterior de una pared de este tipo reduce el volumen interno del depósito de fluido y conduce el flujo hacia la zona de recepción de la muestra. Tras la lisis y fragmentación, la muestra preparada puede abandonar el cartucho a través de una salida (950).

En otras realizaciones, se puede configurar un cartucho para incluir áreas adecuadas tanto para preparar una muestra biológica como para caracterizar la muestra preparada resultante, y proporcionar de esta manera un cartucho de muestra-a-solución. En la **Figura 10** se muestra un ejemplo de un cartucho de muestra-a-solución. Aquí, un sustrato (1010) actúa de soporte de un depósito de fluido (1020) que está en comunicación fluida con un área o zona de recepción de la muestra (1030), que a su vez está en comunicación fluida con una cámara o zona de lisis (1040) que incluye un par de electrodos de lisis. Un flujo de fluido, que puede incluir reactivos que potencian las funciones de lisis y fragmentación del dispositivo, desde el depósito de fluido transporta una porción de la muestra biológica en la zona de recepción de la muestra (1030) a la zona de lisis (1040). El depósito de fluido (1020) puede incluir una pared deformable o flexible, de modo que la presión aplicada a la superficie externa de una pared de este tipo reduce el volumen interno del depósito de fluido y conduce el flujo hacia la zona de recepción de la muestra. Tras la lisis y fragmentación, la muestra preparada se mueve a una cámara o zona de análisis (1050) que está en comunicación fluida con la cámara o zona de lisis (1040), donde se caracteriza. Una zona de análisis de este tipo puede incluir un electrodo de detección y un electrodo de referencia para uso en la detección electroquímica de analitos. En algunas realizaciones, la zona de análisis del cartucho de análisis puede utilizar un electrodo de lisis de la zona de lisis del cartucho de preparación como un electrodo de referencia. En otras realizaciones, una única cámara o canal de flujo puede incluir tanto electrodos de lisis como electrodos de detección y referencia. En otra realización más, una única cámara o canal de flujo puede incluir electrodos de lisis y un electrodo de detección, donde un electrodo de lisis actúa como un electrodo de referencia para la caracterización de analitos.

En una realización alternativa, un cartucho de preparación de la muestra y un cartucho de análisis se pueden proporcionar como unidades separadas que se ponen en comunicación fluida para formar un dispositivo de muestra-a-solución. Esta disposición permite convenientemente alternar configuraciones y personalizar fácilmente los dispositivos donde un cartucho de preparación de la muestra puede estar acoplado a diferentes tipos de cartuchos analíticos para producir fácilmente dispositivos de muestra-a-solución con diferentes funciones o especificidades. La **Figura 11** ilustra una realización de este tipo, donde la porción de preparación de la muestra incluye un sustrato (1110) que actúa de soporte de un depósito de fluido (1120) que está en comunicación fluida con un área o zona de recepción de la muestra (1130), que a su vez está en comunicación fluida con una cámara o zona de lisis (1140) que incluye un par de electrodos de lisis. Un flujo de fluido, que puede incluir reactivos que potencian las funciones de lisis y fragmentación del dispositivo, desde el depósito de fluido transporta una porción de la muestra biológica en la zona de recepción de la muestra (1130) a la zona de lisis (1140). El depósito de fluido (1120) puede incluir opcionalmente una pared deformable o flexible, de modo que la presión aplicada a la superficie externa de una pared de este tipo reduce el volumen interno del depósito de fluido y conduce el flujo hacia la zona de recepción de la muestra. La muestra preparada abandona la zona de lisis a través de una salida de la muestra preparada (1150), que se puede poner en comunicación fluida con la entrada de la muestra preparada (1160) del cartucho de análisis. El cartucho de análisis incluye un segundo sustrato (1170) que actúa de soporte de una entrada de la muestra preparada (1160) que está en comunicación fluida con una zona de análisis (1180) que puede incluir un electrodo de detección y un electrodo de referencia para uso en la detección electroquímica de analitos. En algunas realizaciones, la zona de análisis del cartucho de análisis puede utilizar un electrodo de lisis de la zona de lisis del cartucho de preparación como un electrodo de referencia.

En otra realización más, se proporciona un cartucho de muestra-a-solución en el que la muestra preparada se distribuye en dos o más zonas de análisis. Esta disposición permite convenientemente realizar una variedad de caracterizaciones en una única muestra biológica aplicada al cartucho. Por ejemplo, se pueden realizar tanto caracterizaciones inmunoquímicas como de ácidos nucleicos a partir de la misma muestra biológica en el mismo cartucho. Como alternativa, las zonas de análisis se pueden configurar para realizar diferentes caracterizaciones de ácidos nucleicos, lo que permite la detección de múltiples marcadores genéticos a partir de una única muestra biológica en el mismo cartucho. En otra realización, una zona de análisis puede actuar como una zona de análisis de referencia. En una realización de este tipo, la zona de análisis de referencia se puede configurar para la caracterización de un analito que se ha introducido en la muestra biológica o que se sabe que está presente. El resultado de una caracterización de este tipo se puede utilizar para "escalar" el resultado de la caracterización de un segundo analito (en una segunda zona de análisis) que está presente en cantidades desconocidas, y proporcionar de esta manera un grado de corrección del funcionamiento del dispositivo y/o reactivos particulares.

En la **Figura 12** se muestra otro ejemplo de una realización con una pluralidad de zonas de análisis. Aquí, un sustrato (1210) actúa de soporte de un depósito de fluido (1220) que está en comunicación fluida con un área o zona de recepción de la muestra (1230), que a su vez está en comunicación fluida con una cámara o zona de lisis (1240) que incluye un par de electrodos de lisis. Un flujo de fluido, que puede incluir reactivos que potencian las funciones de lisis y fragmentación del dispositivo, desde el depósito de fluido transporta una porción de la muestra biológica en la zona de recepción de la muestra (1230) a la zona de lisis (1240). El depósito de fluido (1220) puede incluir una pared deformable o flexible, de modo que la presión aplicada a la superficie externa de una pared de este tipo reduce el volumen interno del depósito de fluido y conduce el flujo hacia la zona de recepción de la muestra. Tras la lisis y fragmentación, la muestra preparada se mueve a través de un canal fluido ramificado y se distribuye en dos zonas de análisis (1250, 1260), donde se caracteriza. Cada zona de análisis puede incluir un electrodo de detección y un electrodo de referencia para uso en la detección electroquímica de analitos. Las zonas de análisis se pueden configurar para realizar diferentes caracterizaciones. En una realización de este tipo, múltiples zonas de análisis se pueden configurar para utilizar un único electrodo de referencia y/o contraelectrodo. En una realización alternativa, las zonas de análisis pueden utilizar un electrodo de lisis del tipo descrito previamente en la zona de lisis del cartucho de preparación como un electrodo de referencia o contraelectrodo. En otras realizaciones una única cámara o canal de flujo puede incluir tanto los electrodos de lisis como los electrodos de detección y referencia. En otra realización más, una única cámara o canal de flujo puede incluir electrodos de lisis y electrodos de detección, donde un electrodo de lisis actúa como un electrodo de referencia para la caracterización de analitos.

En algunas realizaciones de la materia de la invención, se proporcionan depósitos de reactivos secundarios que permiten la adición de los reactivos necesarios para procesos que tienen lugar después de estos depósitos. Los reactivos se pueden suministrar como líquidos mantenidos dentro de los depósitos de reactivos pero también se pueden suministrar como reactivos secos que están presentes en rutas fluidas, y se reconstituyen cuando se establece un flujo de un tampón líquido de un depósito anterior. Como alternativa, los reactivos se pueden suministrar como reactivos secos almacenados con un depósito de reactivo. En una realización de este tipo, los reactivos secos se reconstituirían cuando el usuario añadiera líquido, tal como tampón o agua, a un depósito de reactivo de este tipo antes de su uso.

Las rutas fluidas de los dispositivos contemplados incluyen válvulas para dirigir y controlar el flujo de fluido. Por ejemplo, en un dispositivo en el que se establece el flujo aplicando presión a una pared deformable que forma parte de un depósito de reactivo una o más válvulas unidireccionales se podrían incorporar a las rutas fluidas del dispositivo para asegurar que la flexión de la pared deformable al liberar la presión no invierte la dirección del flujo. En otras realizaciones, las rutas fluidas pueden incluir características de atrapamiento de burbujas, por ejemplo, incorporando una ruta de serpiente en comunicación con membranas permeables al gas o respiraderos. En algunas realizaciones las cámaras dentro del dispositivo, por ejemplo, una zona de lisis o una zona de análisis, pueden incluir características que permiten la verificación de un nivel eficaz de fluido (por ejemplo, suficiente para entrar en contacto con los electrodos) dentro de la cámara. Por ejemplo, se pueden construir una zona de lisis y una zona de análisis, al menos en parte, de materiales transparentes o translúcidos que permitan la monitorización óptica no invasiva de los niveles de fluido en el interior.

Como se ha señalado anteriormente, la zona de análisis se puede configurar para realizar detección electroquímica. En tales realizaciones, la zona de análisis incluye un electrodo de detección y un electrodo de referencia. En uso, se aplica una carga o corriente de polarización al electrodo de detección al electrodo de referencia. Tras la adición de una muestra preparada, los cambios en la carga o corriente resultante se miden para caracterizar la muestra preparada. Tales electrodos de detección pueden ser nanoestructurados, como se divulga en el documento US2011/0233075.

Las nanoestructuras del electrodo de detección pueden tener púas, se irregulares o fractales. Un electrodo de detección de este tipo también puede incluir un sistema indicador que responda a un estímulo biomolecular. Por ejemplo, un sistema indicador podría incluir una molécula sonda que responda a interacciones proteína:proteína o a una hibridación de ácido nucleico. Las moléculas sonda de este tipo incluyen, sin carácter limitante, ácidos nucleicos, ácidos peptidonucleicos, análogos de ácido nucleico de tipo morfolino, ácidos nucleicos bloqueados,

inmunoglobulinas, proteínas y péptidos. Por ejemplo, en la caracterización de un ácido nucleico diana de una muestra, una molécula sonda puede incluir una secuencia que es complementaria al menos parcialmente a la secuencia del ácido nucleico diana. En otro ejemplo, en la caracterización de un antígeno de una muestra, una molécula sonda puede incluir un anticuerpo monoclonal específico para el antígeno. Un sistema indicador también puede incluir porciones de fijación con grupos químicos, tales como tioles, que facilitan la unión al electrodo de detección. Un sistema indicador también puede incluir un indicador electrocatalítico, tal como hexamina de rutenio, ferricianuro de potasio o combinaciones de estos. Tales sistemas indicadores pueden proporcionar suficiente sensibilidad para detectar directamente material genético no amplificado a partir de una muestra biológica procesada.

La **Figura 13** muestra un frotis de una muestra y una realización preferida de un cartucho de muestra-a-solución. Un sustrato (1310) actúa de soporte de un depósito de fluido (1320) que está en comunicación fluida con una zona de recepción de la muestra (1340). Se muestra la aplicación de la muestra biológica en la punta de recogida de un colector de la muestra (1330), que está dentro de la zona de recepción de la muestra (1340), que se puede cerrar utilizando una cubierta de la muestra (1350). El cierre de la cubierta de la muestra asegura el aplicador de la muestra y define una cámara de la muestra que ayuda a dirigir el flujo de fluido desde el depósito de fluido (1320) y a través de la punta de recogida del colector de la muestra (1330), para transferir de esta manera una porción de la muestra biológica a la zona de lisis (1360). Tras la lisis y fragmentación al menos una porción de la muestra preparada se transfiere a la zona de análisis (1380); en este momento se pueden añadir reactivos secundarios de un depósito de reactivo secundario (1370). Los materiales de desecho se recogen en un depósito de desechos (1390) según la muestra biológica se prepara y caracteriza.

Existen varios formatos, materiales y escalas de tamaño que se pueden utilizar en la construcción de los cartuchos de preparación de la muestra y análisis de la muestra descritos en la presente. Algunas realizaciones se construyen, al menos en parte, como dispositivos de microfluidos. En tales realizaciones, los depósitos de reactivos, zonas de lisis, zonas de análisis y los canales fluidos conectores pueden comprender PDMS (o polímeros similares) y fabricarse utilizando litografía blanda.

En algunas realizaciones, se contemplan dispositivos monocapa. En otras realizaciones, se contemplan dispositivos de multicapa.

Otros métodos de fabricación de dispositivos mono y multicapa son, sin carácter limitante, micromecanizado de un sólido a granel, uso de adhesivos sensibles a la presión con estructuras en canal cortadas y laminadas posteriormente, moldeo por inyección, sobremoldeo, termomoldeo o estructuras texturizadas en caliente, o cualquier otro método que se utiliza en la producción de estructuras de microfluidos o mayores conocidos por los expertos en la técnica.

Ejemplos

Lisis y fragmentación. Se preparó una suspensión de *Escherichia coli* en PBS sin nucleasas y se introdujo en una zona de procesamiento que contenía un par de electrodos de lisis. Se aplicó un potencial de 40 V a los electrodos de lisis como pulsos de 40 milisegundos a una frecuencia de 1 Hz. Las muestras se prepararon en diversos intervalos de tiempo y se aplicaron a un gel de agarosa al 2% preparado con 1X TBE, junto con los patrones de tamaño adecuado, y posteriormente se tiñó con Oro SYBR y se obtuvieron imágenes. Los resultados se muestran en la Figura 14. La **Figura 14A** muestra una exposición normal del gen; la **Figura 14B** muestra el mismo gel que se ha sobreexponido con el fin de revelar los detalles. Los carriles 1 y 2 contienen patrones de peso molecular elevado y bajo (respectivamente), el carril 3 contiene un oligómero de 20 unidades, y el carril 4 contiene un control de ARN de *E. coli* total. Una muestra tomada antes de la aplicación de voltaje a los electrodos de lisis se colocó en el carril 5, que no muestra una entrada de material significativa en el gel. Los carriles de 6 a 10 muestran el efecto del voltaje aplicado a los electrodos de lisis durante 25, 50, 75, 100 y 125 segundos desde el inicio del voltaje. Estos dispositivos se hicieron funcionar con una amplitud de pulso de 40 ms y una frecuencia de 1 Hz. Los carriles 6-10 equivalen a un voltaje aplicado acumulado de 1, 2, 3, 4 y 5 s, respectivamente. La liberación significativa de ARN de peso molecular elevado es evidente con un voltaje aplicado de tan solo 1 segundo a los electros de lisis. La liberación de ARN adicional y la fragmentación del ARN liberado de esta manera es evidente después de tan solo dos segundos, con la acumulación estable de fragmentos de ARN con una longitud de menos de aproximadamente 500 bases y una pérdida concomitante de ARN de peso molecular elevado según el voltaje aplicado total se eleva hasta 5 segundos. La **Figura 14C** proporciona una leyenda para los carriles experimentales del gel.

Efectos de la fragmentación del ARN. Se realizó una simulación para determinar el efecto de la reducción en el tamaño del analito de ARN debido a la fragmentación en el tiempo requerido para el análisis de la muestra. El tiempo requerido para acumular una molécula de ARN en un electrodo de detección se calculó como una función del tamaño del ARN diana presente en una muestra procesada. Los resultados se muestran en la **Figura 15**. La reducción en el tamaño del ARN analito de una longitud de 2000 bases a 500 bases o menos reduce el tiempo requerido para acumular, y por lo tanto analizar, el ARN analito en un 50% o más.

Por lo tanto, se han divulgado realizaciones y aplicaciones específicas de los métodos y dispositivos para la preparación y análisis de la muestra. Debería ser evidente, sin embargo, para los expertos en la técnica que son posibles muchas más modificaciones además de las ya descritas sin alejarse de la divulgación de la presente.

5 Además, en la interpretación tanto de la memoria descriptiva como de las reivindicaciones, todos los términos se deben interpretar de la manera más amplia posible que sea coherente con el contexto. En particular, se debe interpretar que los términos “comprende” y “que comprende” se refieren a elementos, componentes o pasos de una manera no exclusiva, lo que indica que los elementos, componentes o pasos referenciados pueden estar presente, o utilizarse, o combinarse con otros elementos, componentes o pasos a los que no se haga referencia expresamente.

10 Además, cuando una definición o uso de un término en una referencia no sea coherente o sea contrario a la definición de ese término proporcionada en la presente, se aplica la definición de este término proporcionada en la presente y no se aplica la definición de este término en la referencia.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar ácidos nucleicos en una muestra biológica, comprendiendo el método:
transferir la muestra biológica a una zona de extracción, donde la zona de extracción comprende un par de electrodos;
seleccionar una diferencia de potencial modulado para aplicar al par de electrodos;
- 5 aplicar la diferencia de potencial modulado al par de electrodos, de modo que una pluralidad de ácidos nucleicos se libera de la muestra biológica y se fragmenta dentro de la zona de extracción para producir una pluralidad de ácidos nucleicos fragmentados;
- 10 donde la selección de la diferencia de potencial modulado comprende seleccionar, en función de una longitud de bases promedio deseada de los ácidos nucleicos, al menos uno de una magnitud de un voltaje aplicado al par de electrodos, una duración de un pulso de voltaje aplicado al par de electrodos y una frecuencia a la que se aplica un pulso de voltaje al par de electrodos;
- donde la pluralidad de ácidos nucleicos fragmentados tiene una longitud promedio que es igual o inferior a un 75% de la longitud de una pluralidad representativa de ácidos nucleicos fragmentados antes de la fragmentación.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, donde la longitud en bases promedio de los ácidos nucleicos fragmentados es igual o inferior a un 50% de la longitud en bases promedio de la pluralidad de ácidos nucleicos antes de la fragmentación.
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la pluralidad de ácidos nucleicos fragmentados tiene una longitud en bases promedio igual o inferior a 200 bases.
- 20 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la selección de la diferencia de potencial modulado es eficaz para reducir un tiempo de hibridación de la pluralidad de ácidos nucleicos fragmentados con una sonda de captura unida a fase sólida en al menos un 25% de un tiempo de hibridación de la primera pluralidad de ácidos nucleicos antes de la fragmentación.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que además comprende:
- 25 proporcionar un dispositivo que tiene una zona de extracción que está en acoplamiento fluido a una zona de análisis, donde la zona de extracción comprende un par de electrodos, y donde la zona de análisis comprende un electrodo de detección y un electrodo de referencia;
- conducir al menos una porción de una muestra biológica a la zona de extracción;
- 30 aplicar una primera carga o corriente al par de electrodos según un protocolo eficaz para liberar una pluralidad de ácidos nucleicos de la porción de la muestra biológica y fragmentar la pluralidad de ácidos nucleicos dentro de la zona de extracción para producir de esta manera una pluralidad de ácidos nucleicos fragmentados;
- mover la muestra biológica que contiene los ácidos nucleicos fragmentados a una zona de análisis y aplicar una segunda carga o corriente a un electrodo de detección y un electrodo de referencia; y
- medir un tercer flujo de carga o corriente entre el electrodo de detección y el electrodo de referencia para cuantificar o determinar la presencia de un ácido nucleico diana en la muestra biológica.
- 35 6. El método de la reivindicación 5, donde el electrodo de detección es un microelectrodo nanoestructurado, y donde el microelectrodo nanoestructurado es fractal.
7. Un dispositivo para preparar ácidos nucleicos en una muestra biológica, comprendiendo el dispositivo:
un depósito de fluido;
una zona de recepción de la muestra configurada para recibir una muestra biológica que contiene ácidos nucleicos; y
- 40 una zona de extracción que comprende un par o múltiples pares de electrodos configurados tanto para efectuar la liberación de ácidos nucleicos de la muestra biológica como para fragmentar los ácidos nucleicos liberados;
- de modo que la zona de recepción de la muestra esté entre el depósito de fluido y la zona de extracción y está en comunicación fluida con cada uno.
- 45 8. El dispositivo de la reivindicación 7, donde el depósito de fluido comprende una pared deformable, teniendo la pared deformable una superficie externa configurada de modo que la presión aplicada a la superficie externa de la pared

deformable dé como resultado la deformación de la pared deformable hacia un volumen interior del depósito de fluido, para conducir de esta manera el flujo fluido a través de la zona de recepción de la muestra.

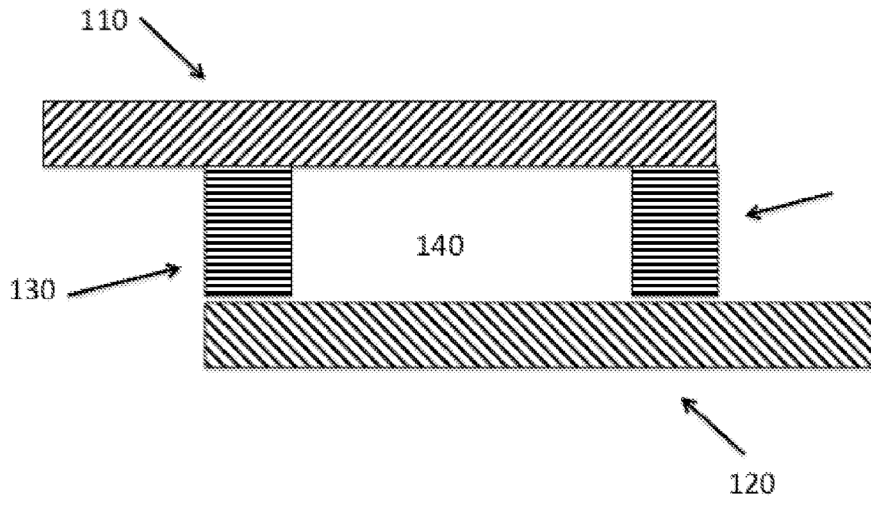


Figura 1

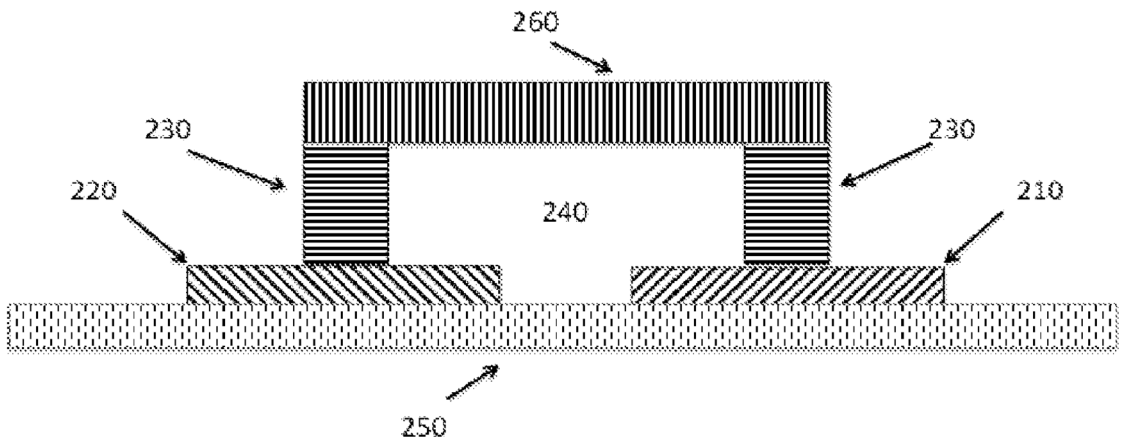


Figura 2

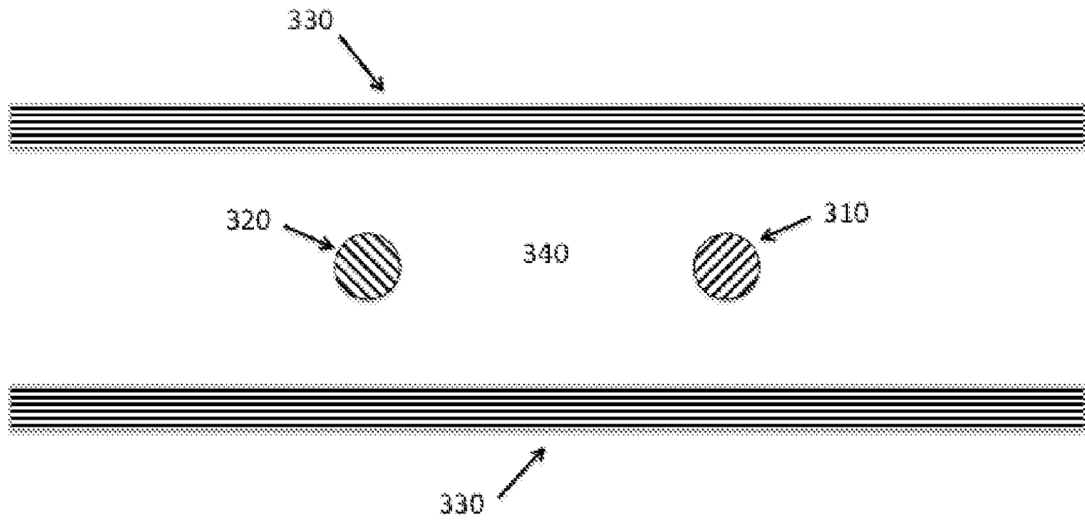


Figura 3

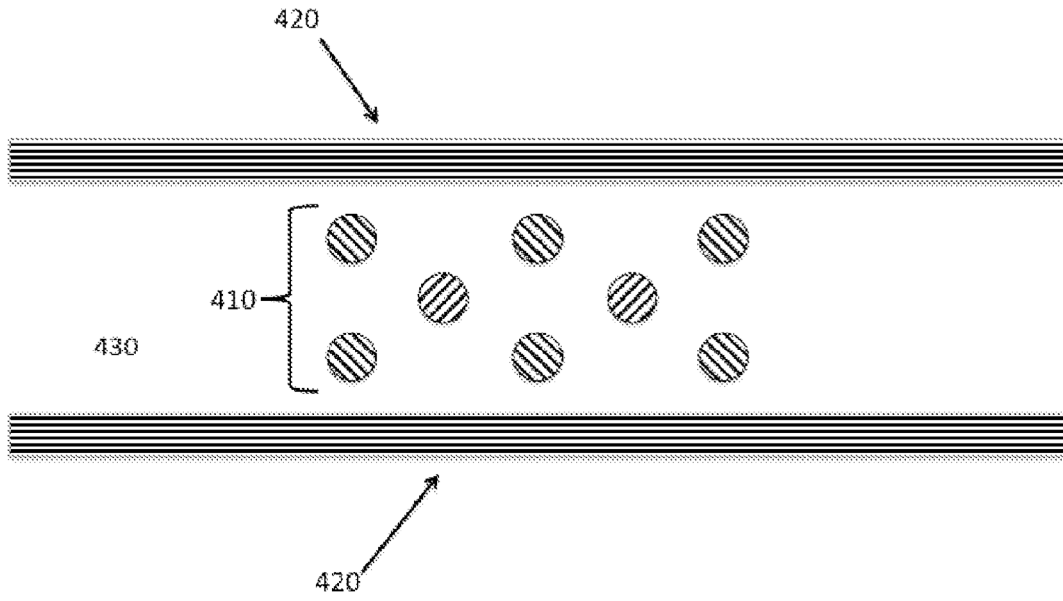


Figura 4

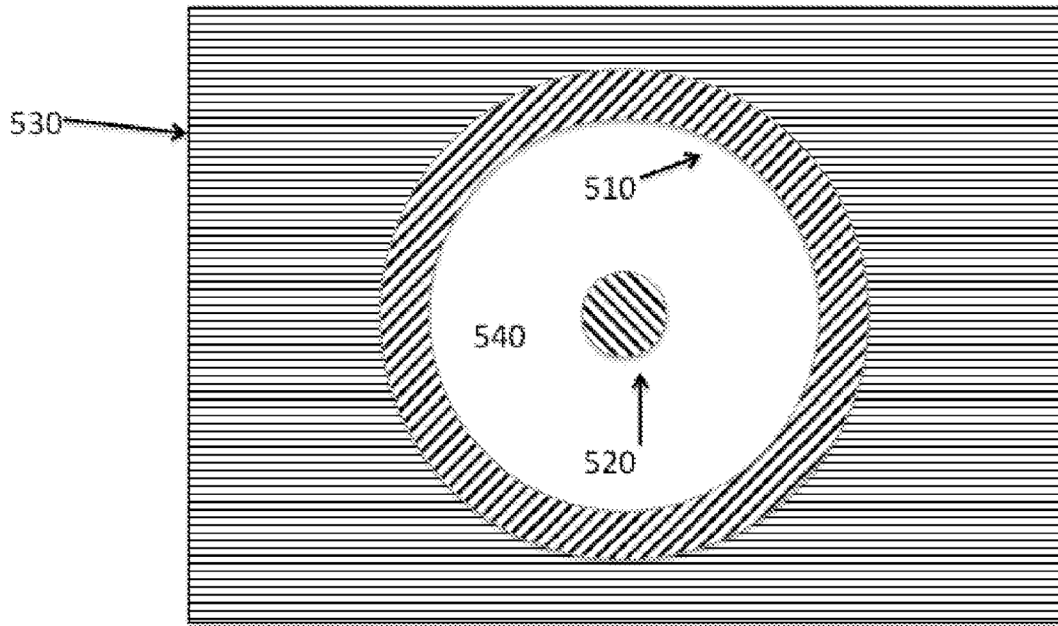


Figura 5

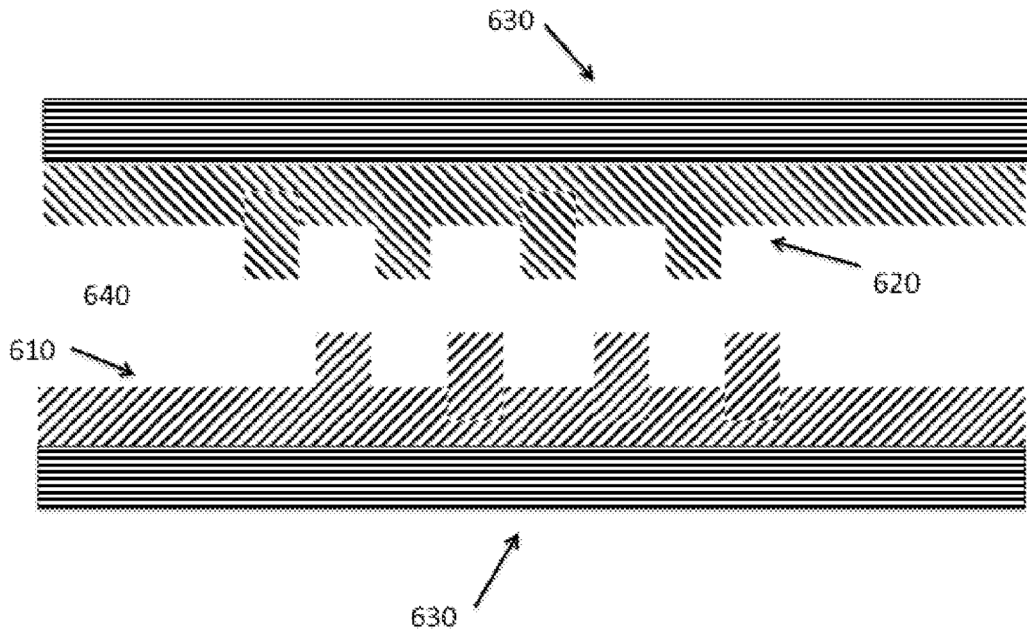


Figura 6

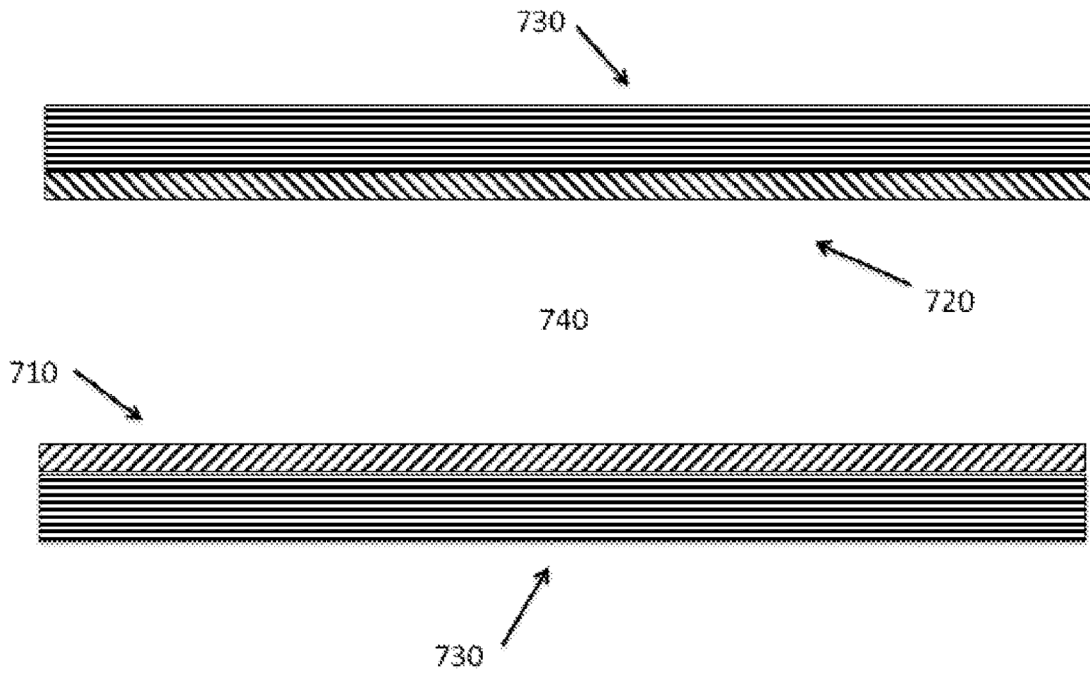


Figura 7

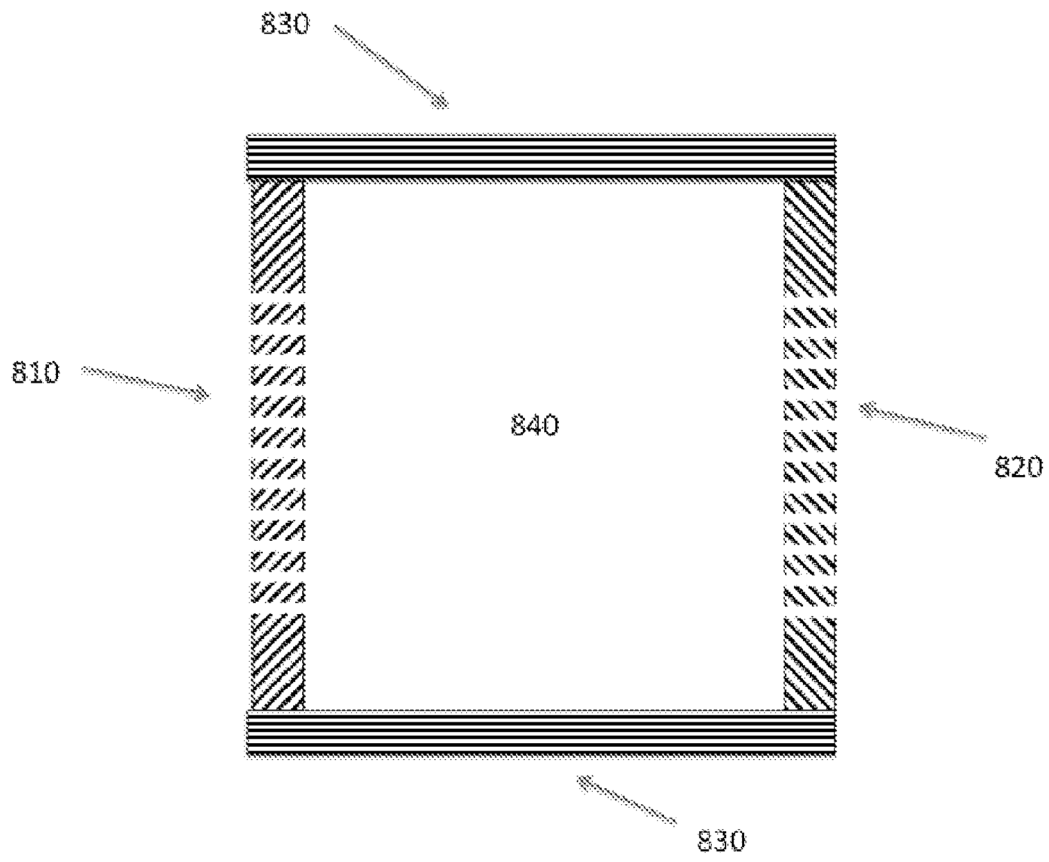


Figura 8

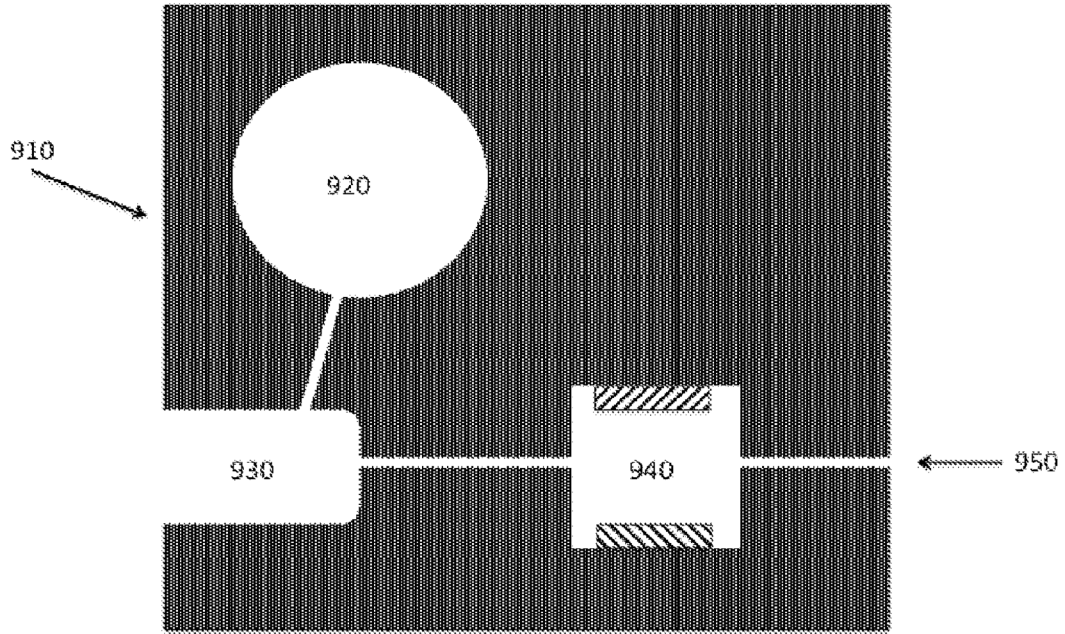


Figura 9

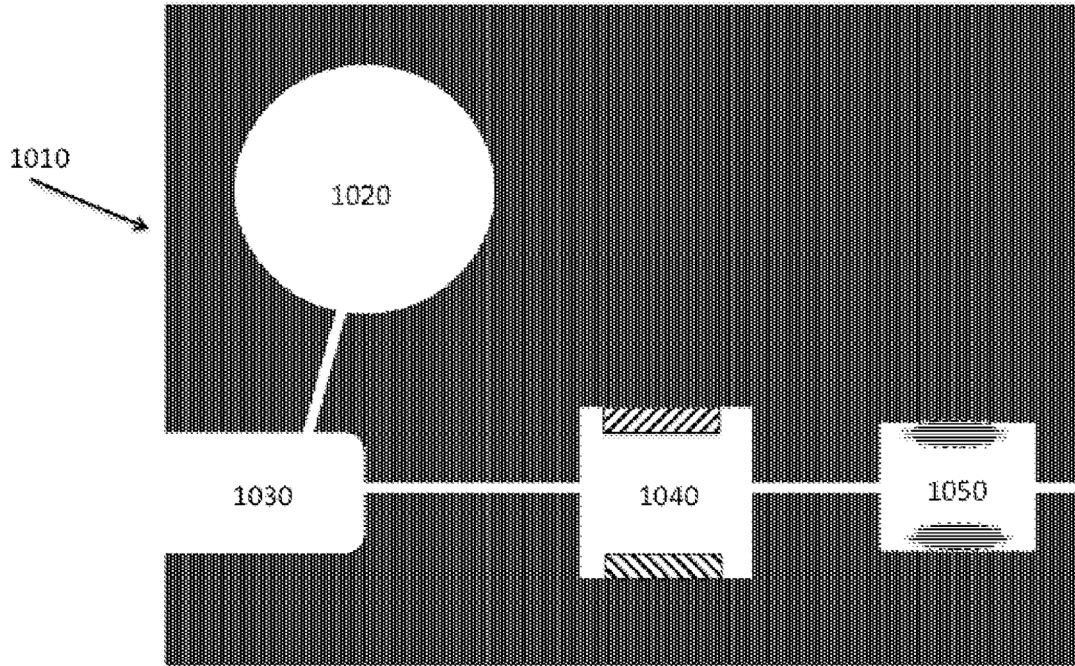


Figura 10

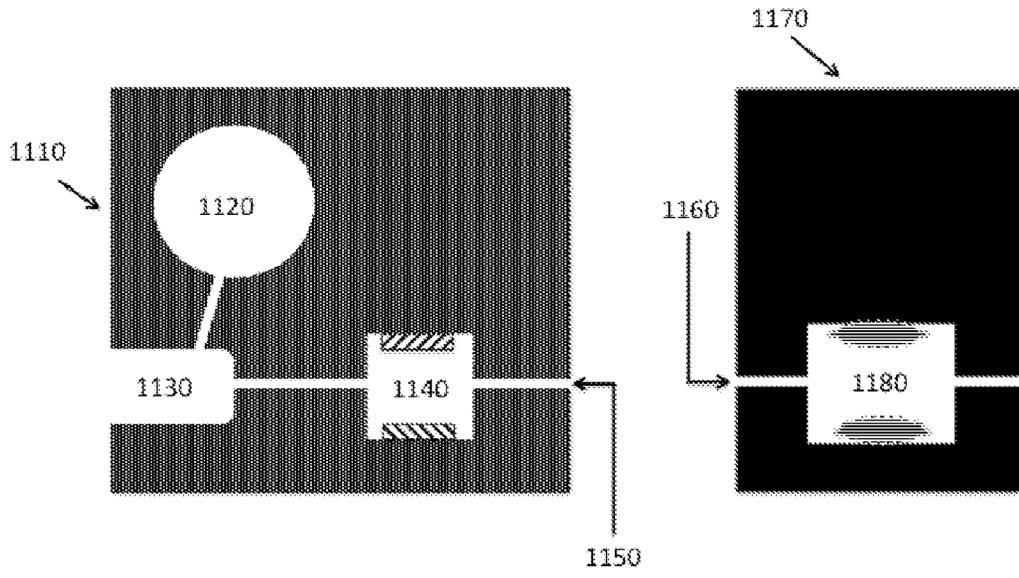


Figura 11

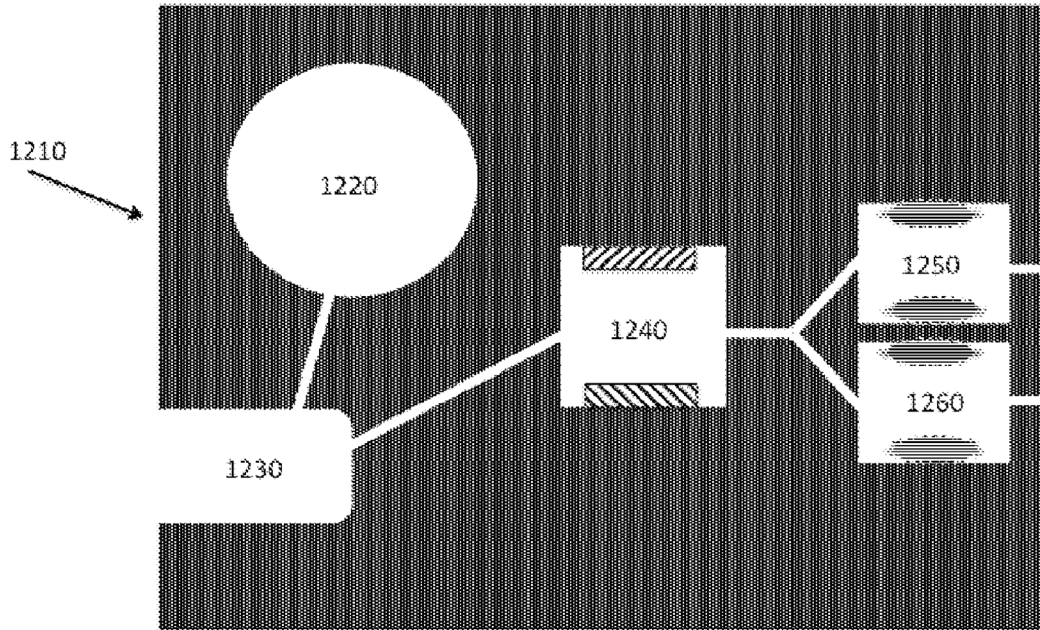


Figura 12

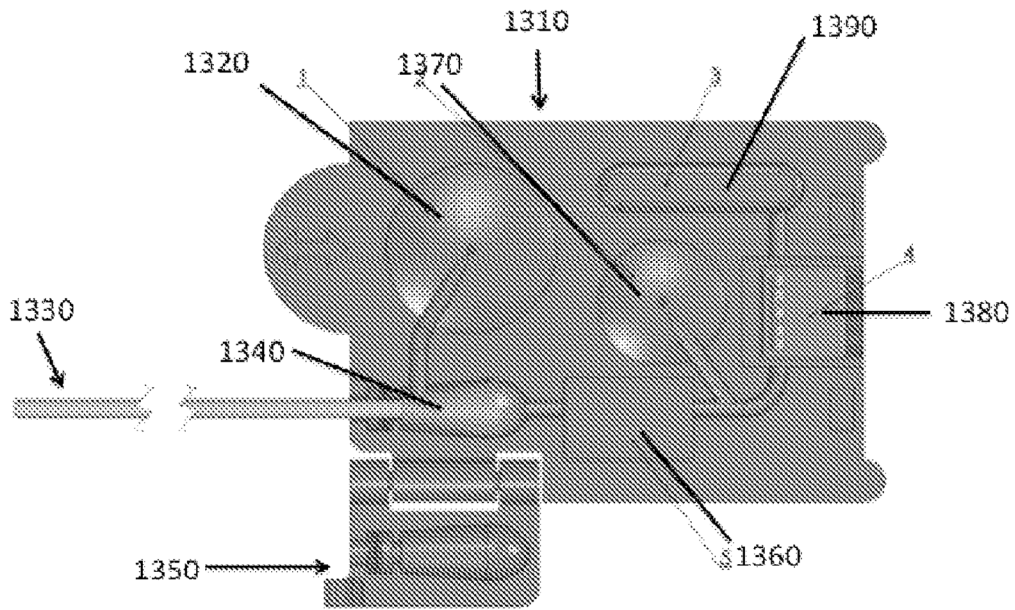


Figura 13

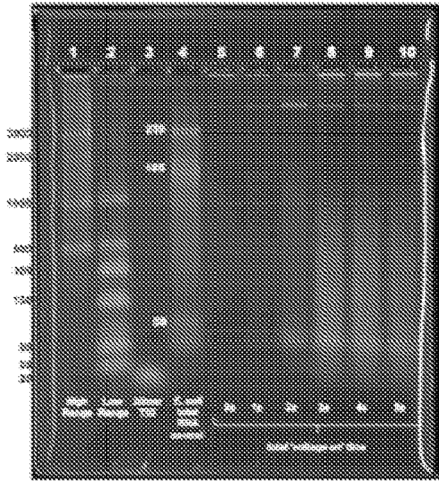


Figura 14A

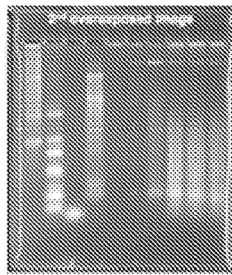


Figura 14B

Lane	Sample	Size	Intensity	Position	Other Data
1	Ladder	2000	High	Top	Reference
1	Ladder	1500	High	Second	Reference
1	Ladder	1000	High	Third	Reference
1	Ladder	500	High	Bottom	Reference
2	Sample	~1800	Medium	~1800	Sample 1
3	Sample	~1200	Low	~1200	Sample 2
4	Sample	~800	Low	~800	Sample 3
5	Sample	~600	Low	~600	Sample 4
6	Sample	~400	Low	~400	Sample 5
7	Sample	~300	Low	~300	Sample 6
8	Sample	~200	Low	~200	Sample 7
9	Sample	~150	Low	~150	Sample 8
10	Sample	~100	Low	~100	Sample 9

Figura 14C

Figuras 14A a 14C

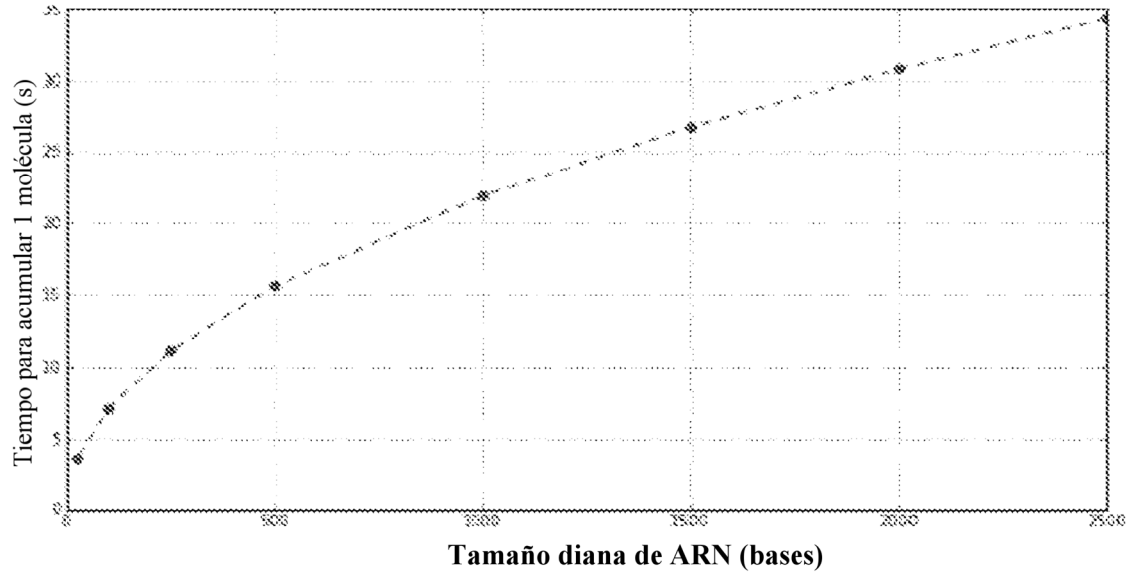


Figura 15