



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 346 128**

51 Int. Cl.:
B04B 15/02 (2006.01)
B01F 3/08 (2006.01)
B04B 5/02 (2006.01)
G01N 1/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00921255 .6**
96 Fecha de presentación : **24.03.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1173284**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.01.2002**

54 Título: **Homogeneización de mezclas de pequeño volumen mediante centrifugación y calentamiento.**

30 Prioridad: **25.03.1999 SE 9901104**
22.06.1999 SE 9902378

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.10.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.10.2010

73 Titular/es: **AlphaHelix Molecular Diagnostics AB.**
Kungsängsvägen, 29
753 23 Uppsala, SE

72 Inventor/es: **Malmquist, Mats**

74 Agente: **No consta**

ES 2 346 128 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

Homogeneización de mezclas de pequeño volumen mediante centrifugación y calentamiento.

5 La presente invención se refiere a un dispositivo y método para reacciones químicas o bioquímicas que implican templado repetido y homogeneización de la mezcla de reacción, y en particular reacciones químicas en medios líquidos.

Antecedentes de la invención

10 Muchos procesos industriales importantes, así como procedimientos aplicados en los laboratorios de diferentes tipos dependen de reacciones químicas. Normalmente, el tiempo consumido para completar un proceso o procedimiento se determina por el tiempo que tarda alguna reacción o reacciones químicas específicas en alcanzar el equilibrio. A menudo esto se denomina propiedades cinéticas de una reacción química o sencillamente cinética de reacción. Una gran cantidad de variables influyen en la cinética de reacción en cada caso, por ejemplo, las concentraciones de los reactivos, temperatura, presencia de agentes catalíticos, etc.

20 Normalmente, la temperatura elevada hace más rápidas las reacciones químicas al acelerar mecanismos clave como el poner en contacto moléculas o dominios de moléculas entre sí. Por lo tanto, es común calentar los recipientes de reacción, por ejemplo, poniéndolos en contacto con una llama abierta, gas caliente, líquido caliente, arena caliente o un material sólido. Este procedimiento se denomina con frecuencia incubación.

25 Un problema típico relacionado con las incubaciones de mezclas de reacción fluidas es la heterogeneidad térmica, porque las partes de la mezcla de reacción que están en contacto estrecho con las paredes del recipiente de reacción se calentarán antes que las partes más hacia el centro de la mezcla de reacción. En muchos casos existe el riesgo de que una parte de la mezcla de reacción se sobrecaliente antes de que otras partes alcancen incluso la temperatura deseada. Esto lleva a que se formen gradientes de temperatura en la mezcla de reacción. Los subconjuntos calientes de la mezcla de reacción tienen normalmente una densidad inferior a la de subconjuntos fríos lo que tiende a generar gradientes de temperatura o fases diferenciadas de volúmenes de líquido más o menos isotérmicos, denominadas termoclinos. Por lo tanto, partes calientes, menos densas de la mezcla de reacción tienden a encontrar una posición encima de partes frías, más densas. El movimiento molecular y las corrientes en la mezcla de reacción, homogenizarán eventualmente la mezcla de reacción con respecto a la temperatura, un proceso denominado templado de la mezcla de reacción. El tiempo que se tarda en templar una mezcla de reacción puede contribuir sustancialmente al tiempo necesario para la reacción completa.

35 Sin embargo, el consumo de tiempo, en si mismo, no es el único problema implicado con el templado de mezclas de reacción químicas. En ciertos procedimientos de incubación, tales como los templados repetitivos implicados en los denominados procesos de termociclado, por ejemplo, para llevar a cabo las reacciones en cadena de la polimerasa, también conocidas como reacciones PCR, los largos periodos de templado también conducen a reacciones secundarias no deseadas, que a veces provocan problemas graves de calidad con respecto a la exactitud y la especificidad de los productos de PCR obtenidos.

45 En el esfuerzo continuo para miniaturizar los volúmenes de las reacciones químicas, como es evidente, por ejemplo, en el campo de la selección de alto rendimiento, se encuentran muchos otros problemas. En un recipiente de reacción pequeño, tal como un pocillo en una placa de microtitulación, tanto el mezclado como el templado de la muestra y los reactivos, pueden resultar gravemente limitados. Cuando dos o más fluidos miscibles se mezclan, se supone normalmente que forman en primer lugar una mezcla homogénea, que luego reacciona. Sin embargo, este caso es poco común.

50 Las placas de microtitulación y cubetas, convencionales frecuentemente se fabrican de poliestireno, un polímero hidrófilo. Sin detenerse en el comportamiento exacto del líquido en los límites del recipiente, puede concluirse que se formarán zonas estancadas, y que se producirá fácilmente un mezclado insuficiente en un recipiente de reacción pequeño, tal como un pocillo en una placa de microtitulación. Las propiedades de los reactivos y los fluidos de muestra también influyen en su interacción entre si y con los límites del recipiente. La segregación parcial, la formación de fases, la agregación, etcétera, son sólo algunos ejemplos de irregularidades que pueden encontrarse en un recipiente de reacción.

60 Hay razones para distinguir entre dos procesos diferentes que causan problemas con la distribución de temperatura heterogénea en una mezcla de reacción. El proceso causado por la menor fluidez cerca a las paredes de un recipiente de reacción, es un problema que aumenta cuando la escala de la reacción disminuye. Por el contrario, el problema implicado con que las partes centrales del volumen de líquido sean más frías que el líquido cerca a las paredes al calentar un recipiente de reacción, aumenta cuando la escala de reacción aumenta. Ésta es la razón por la cual los dispositivos de termociclado para procesos en los que se requiere un templado adecuado (por ejemplo, procesos como la PCR) tienen un intervalo dinámico muy estrecho con respecto a la escala de reacción. Típicamente, en las reacciones PCR, estos problemas son más graves cuando los volúmenes de reacción son inferiores a 5 μL y superiores a 50 μL .

Otro problema, aparentemente sin relación con las cuestiones de mezclado y templado, es el de la evaporación. Con el fin de evitar la evaporación, existe una tendencia a hacer que los recipientes de reacción y, en particular, los

pocillos en las placas de microtitulación sean más profundos y estrechos. Naturalmente, esto aumenta adicionalmente los problemas anteriormente mencionados de templado y mezclado insuficiente.

Hasta ahora, la heterogeneidad de temperatura se ha tratado en términos de propiedades en un recipiente de reacción individual. Especialmente cuando se trata la miniaturización de los ensayos, debe considerarse otra dimensión más de la heterogeneidad de la templado; la de la variación entre los recipientes de reacción. En ensayos con fines comparativos (es decir, con o sin el análisis cuantitativo, como en la selección de nuevos candidatos de fármacos, mutaciones en ácidos nucleicos, el polimorfismo de un solo nucleótido, etcétera), es importante considerar la reproducibilidad, comúnmente denominada la uniformidad entre pocillos.

Dado que los procesos que conducen a una mala uniformidad térmica son difíciles de predecir cuantitativamente, la única solución disponible al problema es con frecuencia centrarse en medios para mejorar los procesos de homogeneización. Para lograr esto, se aplican diversas estrategias.

Una es usar recipientes de reacción con configuraciones oblongas o planas específicas con el fin de minimizar la distancia entre las zonas centrales y periféricas de la masa de la mezcla de reacción, un ejemplo de esto es llevar a cabo la incubación en capilares finos tal como se describe por Wittwer, CT *et al.*, (The LightCycler™: A Microvolume Multisample Fluorimeter with Rapid Temperature Control, Bio-Techniques 22:176-181, enero de 1997). Una desventaja de este enfoque es que los capilares de vidrio, poco unidos a sus partes de sujeción plásticas, requieren una extensa manipulación manual. La elección de los capilares de vidrio hace posible tanto el rápido templado de la mezcla de reacción como la detección de fluorescencia después de la amplificación. Sin embargo, un capilar de vidrio tiende a maximizar el contacto superficie-fluido, con todas las consecuencias que esto tiene sobre el mezclado y el templado. Además, el uso de capilares de vidrio tiene el inconveniente adicional de obstruir el procesamiento de la muestra tras la PCR. Ejemplos de procesamiento tras la PCR incluyen los procedimientos de secuenciación del ADN, etc.

Otras formas de resolver el problema de la heterogeneidad de la temperatura y el mezclado es introducir perturbaciones agitando o sacudiendo el recipiente de reacción. Instrumentos específicos diseñados para este fin son, por ejemplo, diversas clases de agitadores de matraz y las denominadas máquinas Vortex. Un problema a menudo encontrado con este enfoque es que la periodicidad de la perturbación puede causar corrientes u ondas estancadas y por consiguiente homogeneidad incompleta.

Otro enfoque para la homogeneización es el uso de ondas ultrasónicas en un procedimiento convencional denominado sonicación. Este último procedimiento es, desafortunadamente, a menudo difícil de combinar con varios métodos de incubación convencionales.

Aún otro enfoque es el uso de sistemas de flujo continuo, en los que un líquido en movimiento constante se somete a calentamiento.

Dentro del campo de la PCR, se ha prestado mucha atención a la transferencia de calor y a la cuestión de ajustes con rampa más rápida, es decir, cómo acortar la velocidad para ajustes de temperatura tanto en la fase de calentamiento como en la de enfriamiento.

Técnica anterior más cercana

El documento WO 98/49340 (PCT/AU98/00277) da a conocer un método y dispositivo de ciclos de temperatura, en el que se carga una mezcla de reacción y una muestra en pocillos de carga en un rotor desechable, rotor que se coloca entonces en un dispositivo centrífugo de ciclos térmicos y se hace girar, de modo que la mezcla de reacción y la muestra se mueven mediante la fuerza centrífuga hacia un pocillo de reacción en la periferia del rotor. El dispositivo comprende medios de calentamiento, por ejemplo, luces infrarrojas, elementos de calefacción por convección o fuentes de microondas. De manera interesante, en la memoria descriptiva también se incluyen disposiciones para enfriar el rotor. Según una realización, la velocidad del rotor se incrementa, dando como resultando la introducción de aire al dispositivo y el enfriamiento rápido del contenido de las cámaras de reacción en la periferia del rotor. Además del aire ambiental, puede utilizarse un gas refrigerante. El aire refrigerado se da como un ejemplo de gases refrigerantes. De manera importante, la divulgación del documento WO 98/49340 implica el uso de diferentes velocidades de rotación. Además, el documento WO 98/49340 no trata los problemas de mezclado y de templado homogéneo. Por ejemplo, no especifica la dirección de calentamiento, ni contempla el calentamiento y enfriamiento simultáneos.

El documento DE 19501105 A1 da a conocer una centrifugadora con un sistema de control de la temperatura, en el que un fluido circulante entra al rotor desde arriba y fluye hacia el exterior y hacia abajo, en la dirección del radio, alrededor de los tubos de ensayo o recipientes de muestra. El inventor de la centrifugadora según el documento DE 19501105 critica los dispositivos conocidos hasta la fecha que utilizan una fuente de radiación de calor y los rechaza como poco satisfactorios. Los documentos US-A-4498896, US-A-3600900 y US-A-5772572 dan a conocer adicionalmente centrifugadoras con control de temperatura convencional, es decir, que mantienen las muestras a una temperatura deseada durante la centrifugación.

El propósito de la presente invención es solucionar el problema las etapas de mezclado y templado insuficientes y que consumen mucho tiempo en procedimientos en los que está implicada la incubación de mezclas de reacción químicas de pequeño volumen, hallando medios para un mezclado y homogeneización eficaces. De manera importante,

dichos medios deben ser compatibles con medios para el análisis sin obstáculos de la reacción y, preferiblemente, también deben poder aplicarse en tecnologías existentes y futuras en los campos de reacciones químicas y biotecnológicas, selección y análisis, tales como selección de alto rendimiento, reacciones de amplificación, etc.

- 5 En particular, la necesidad de un dispositivo de termociclado rápido y preciso y del método correspondiente aún no está satisfecha por los dispositivos y métodos de la técnica anterior.

Sumario da la invención

- 10 Este problema se resuelve por la invención según un método tal como se define en la reivindicación 1. Además, el problema se consigue mediante un dispositivo que tiene la combinación de características de la reivindicación 12 en la parte descriptiva de las reivindicaciones adjuntas, que se incorporan en el presente documento. La invención comprende tanto dispositivos como métodos tal como se da a conocer en la descripción y se define en las reivindicaciones adjuntas. Otros problemas que se resuelven por la invención y las ventajas obtenidas pueden derivarse de la descripción y los dibujos.

Breve descripción de las figuras

- 20 La presente invención se describe a continuación con referencia a los dibujos adjuntos en los que
- la figura 1 muestra esquemáticamente una primera realización de la invención, que tiene un dispositivo (7) para la medición de temperatura que se comunica con un procesador (4);
- 25 la figura 2 muestra una segunda realización de la invención, en la que el dispositivo (7) para la medición de temperatura se complementa con una fuente (8) láser y sensor (9);
- la figura 3 muestra una tercera realización de la invención, en la que la temperatura se mide con una sonda (12), que se comunica a través de un transmisor (13) y receptor (14) con el procesador (4);
- 30 la figura 4 muestra una sección transversal esquemática de un dispositivo según la invención, que muestra componentes básicos, tales como el manto (6) de calentamiento,
- la figura 5 muestra una vista esquemática desde arriba de una realización según a la figura 2;
- 35 la figura 6 muestra una vista esquemática desde arriba de una realización, por ejemplo una realización según la figura 1, y
- la figura 7 muestra una sección transversal esquemática de un dispositivo con una fuente (17) de calor colocado en una mitad (16) de manto inferior que puede moverse verticalmente.

Descripción

- 45 En la siguiente descripción de la invención, se utilizarán algunas definiciones. Deben de interpretarse tal como se indica a continuación:

La dirección del campo gravitacional: descrito con vectores, la dirección del campo gravitacional es la misma que el vector resultante cuando se añade un vector que representa la fuerza centrífuga, que es un vector en ángulo recto con el eje del rotor de la centrifugadora dirigido desde el centro del rotor, al vector que representa la gravitación de la tierra. En consecuencia, hacia abajo se define en el presente texto como la misma dirección que el campo gravitacional tal como se define por la suma de los vectores que representan la fuerza centrífuga y la gravitación.

55 Mezcla de reacción: cualquier mezcla de reacción fluida, preferiblemente una mezcla de reacción líquida, en la que la cinética de reacción se ve influida por la temperatura y en la que se desea un templado más rápido, más eficaz y homogéneo. Ejemplos de reacciones adecuadas para el presente dispositivo y método son las reacciones químicas/bioquímicas en el campo de la selección de alto rendimiento y las reacciones bioquímicas que implican templado repetido, por ejemplo, cambios cíclicos de temperatura, incluyendo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una reacción en cadena de la ligasa (LCR), una reacción LCR con huecos, una amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA), una replicación autosostenible (3SR), una amplificación mediada por transcripción (TMA), una amplificación por desplazamiento de cadenas (SDA), una amplificación diana, una amplificación de la señal, o una combinación de cualquiera de los anteriores.

Normalmente, una reacción en cadena de la polimerasa implica las siguientes etapas:

- 65 1) Preparación de las mezclas de reacción, es decir, la preparación de las muestras que van a someterse a prueba,
- 2) Amplificación, es decir, la replicación exponencial de las moléculas de ADN, y
- 3) Detección de secuencias específicas, por ejemplo, mediante electroforesis o hibridación.

ES 2 346 128 T3

La etapa 2) implica cambios de temperatura repetidos para llevar la mezcla de reacción a través de las etapas de apareamiento y extensión de las cadenas de nucleótidos. Un templado ineficaz, es decir temperaturas difusas en la mezcla de reacción, conduce a productos de amplificación no específicos. La necesidad de un templado rápido y homogéneo de la mezcla de reacción es fundamental para la calidad y la fiabilidad de la reacción.

5

Recipiente de reacción: cualquier recipiente que puede contener una mezcla de reacción dentro del intervalo de temperatura necesario para llevar a cabo la reacción. Ejemplos de recipientes de reacción adecuados para su uso según la invención incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: tubos de ensayo, denominados microtubos, tubos Eppendorf, un único pocillo o una multitud de pocillos en una placa de microtitulación, tal como una placa de microtitulación del formato de 96 pocillos, y varios formatos con redes de alta densidad de pocillos, tales como el formato de 192 pocillos, el formato de 384 pocillos, formatos más densos o similares. El recipiente de reacción para su uso según la presente invención puede ser un recipiente de reacción convencional, comercialmente obtenible tal como se mencionó anteriormente, o un recipiente de reacción especialmente adaptado para su uso en el dispositivo inventivo, por ejemplo, que incluye un elemento óptico en su extremo distal, un color o superficie especial para la absorción de calor en su extremo distal o que tiene superficies opacas, aislantes o reflectantes en sus paredes laterales, etc.

15

La mezcla de reacción se encuentra en un recipiente de reacción, por ejemplo, un recipiente que tiene al menos una abertura y un extremo cerrado, sustancialmente en la dirección opuesta del extremo abierto. Dicho recipiente se carga con una muestra y por lo menos un reactivo, lo que por definición constituye la mezcla de reacción y mezcla que va a incubarse homogéneamente. Los reactivos se dispensan a través del extremo abierto, que puede sellarse después de la dispensación, por ejemplo, utilizando una tapa. La dispensación de los reactivos puede realizarse usando dispositivos de pipeteo manual o automatizado o, en una realización preferida de la invención, utilizando capilares de reactivos predispensados (PCT/SE91/00343) o cartuchos de reactivo (PCT/SE97/01562).

20

El extremo cerrado se define como el extremo distal que apunta en la misma dirección que el campo gravitacional actual. El extremo abierto o el extremo cerrado con una tapa o cartucho de reactivo se denomina el extremo proximal. Por lo tanto, cuando no se produce centrifugación, el extremo distal de un recipiente de reacción a menudo está dirigido hacia abajo según el campo gravitacional de la tierra. En congruencia con esta declaración, hacia arriba se define en el presente texto como la dirección opuesta al campo gravitacional que afecta al recipiente de reacción con contenido en una situación específica. En consecuencia, el extremo proximal está dirigido hacia arriba o en una dirección opuesta a la fuerza centrífuga.

25

30

Un dispositivo según una realización preferida de la presente invención se muestra en la figura 1 que comprende medios, tales como un rotor 1 para la sujeción de al menos un recipiente 2 de reacción con contenido; medios para someter dicho al menos un recipiente de reacción y su contenido a una fuerza centrífuga, tales como un motor 3; medios 5 y 6 para calentar la parte del recipiente de reacción dirigida hacia el exterior en relación a la fuerza centrífuga; y medios para enfriar el extremo proximal del recipiente de reacción (no mostrado). Se muestra un sensor 7 de temperatura, con una línea que indica de forma esquemática, que la lectura se toma del extremo que contiene la muestra de un recipiente 2 de reacción en rotación. El sensor 7 de temperatura es preferiblemente un sensor de infrarrojos (IR).

35

40

Empleando un sensor IR u otro sensor rápido, se consigue una medición de la temperatura en línea. La medición rápida y exacta de la temperatura hace que sea posible utilizar las temperaturas muy altas que se describen.

45

En la figura 1 se muestra un procesador 4. Este procesador puede ser cualquier circuito lógico convencional cargado con instrucciones de funcionamiento en la forma de código informático, o un circuito especialmente adaptado para el dispositivo inventivo. Las funciones del procesador incluyen como mínimo las siguientes: procesar la señal de temperatura del sensor 7 de temperatura y controlar el funcionamiento del motor 3 y la fuente 5 de calentamiento/enfriamiento según uno o más programas, elegidos por el operador.

50

Preferiblemente, dichos medios 1 para sujetar al menos un recipiente de reacción es un rotor, por ejemplo, un rotor elegido de los siguientes: un rotor de tambor, un rotor basculante y un rotor de ángulo fijo. Además, el rotor elegido se modifica preferiblemente para permitir el contacto térmico sin obstáculos entre el extremo distal o "inferior" de los recipientes de reacción y la fuente de calentamiento. Del mismo modo, el rotor puede modificarse convenientemente para permitir un enfriamiento eficaz del extremo proximal.

55

La fuente 5 y 6 de calentamiento puede ser cualquier fuente de calentamiento, que puede calentar los extremos distales de los recipientes de reacción, por ejemplo, una fuente de radiación, tal como un elemento de calentamiento con cables de resistencia eléctrica, una fuente IR, un elemento de microondas y similares. Según una realización de la presente invención, el calentamiento y enfriamiento se realizan mediante el uso de al menos una fuente externa de calor y frío (ilustrada a lo largo de las figuras como 5) conectada a un manto 6. El manto abraza la trayectoria de rotación de los recipientes 2 de reacción durante al menos parte de esta trayectoria como se indica en las secciones transversales de las figuras 1, 2, 3 y 4.

60

Preferiblemente, el manto 6 se adapta a la forma del rotor, como se indica esquemáticamente en las figuras 5 y 6, que muestran dos realizaciones de la invención. En la figura 7 se muestra una realización en la que el manto o una parte del mismo puede moverse en relación a la trayectoria de rotación de los recipientes de reacción. La parte móvil del manto es entonces preferiblemente un reflector 16 circular o parcialmente circular que contiene una fuente 17 de

65

ES 2 346 128 T3

calor y dispuesto de manera que se puede mover para acercarse y alejarse de la parte rotativa de los recipientes de reacción.

5 La fuente de calentamiento también puede situarse en el interior del rotor, en los extremos distal o inferior de los recipientes de reacción (no se muestra). Según una realización de la invención, una lente telecéntrica se coloca entre la fuente de calentamiento y el recipiente de reacción o los recipientes de reacción.

10 La fuente de enfriamiento o los medios para el enfriamiento pueden elegirse de enfriamiento por convección y un medio refrigerante circulante, por ejemplo, un gas refrigerado, tal como el aire y, preferiblemente, nitrógeno. En una realización, tal como las mostradas en los dibujos adjuntos, el medio refrigerante se deja entrar en el manto y por lo tanto entra en contacto con los recipientes de reacción en rotación. Según otra realización (no mostrada) el entorno del rotor se refrigera con excepción del manto. Al mover el manto en relación al rotor, por ejemplo, subiéndolo o bajándolo a estrecha proximidad de los recipientes de reacción en rotación, dichos recipientes se calientan. Al bajar, levantar o extraer de otro modo el manto, se permite de nuevo que el entorno frío circundante entre en contacto con los recipientes de reacción en rotación. En lugar de mover el manto, puede moverse el rotor mientras que el manto se mantiene en una posición fija.

20 Los recipientes 2 de reacción pueden ser uno cualquiera de los siguientes: un conjunto de tubos individuales, por ejemplo, tubos Eppendorf, pocillos individuales en una placa de microtitulación o tubos de ensayo individuales.

25 La figura 2 muestra esquemáticamente una realización en la que una fuente 8 de radiación emite radiación, por ejemplo, un haz láser que cruza la trayectoria de rotación de los recipientes de reacción. La reflectancia de esta radiación se detecta con un sensor 9. El sensor 7 de temperatura, por ejemplo, un sensor IR, puede comunicarse con el sensor 9 de reflectancia a través de un procesador 10, por ejemplo, con el fin de ajustar las mediciones de temperatura a la velocidad de rotación. La fuente 8 de radiación y el sensor 9 de reflectancia también pueden usarse para la detección de reacciones químicas en las muestras, por ejemplo, la reflectancia o emisión de luz que indica el punto final de una reacción o la respuesta positiva o negativa de una prueba.

30 Además en la figura 2 se indica una interfaz de usuario 11. Dicha interfaz de usuario puede incluir un teclado o similar para la introducción de la selección de parámetros de funcionamiento o una elección de planes de funcionamiento preprogramados, una pantalla para indicar el progreso del funcionamiento, los parámetros de proceso, etc.

35 Según una realización preferida, el dispositivo según la invención incluye medios para leer información sobre la identidad de la muestra, las instrucciones de funcionamiento, etc. Ejemplos de tal información incluyen parámetros de funcionamiento, tales como el tiempo y la temperatura, número de ciclos, temperatura tras la PCR, etc., información de la muestra, tal como la fecha, la fuente, la identidad del paciente, calidad, etc., e información del reactivo, tal como el número de lote, fecha, cantidad del reactivo, tipo, etc.

40 Según una realización, las muestras o los recipientes de reacción llevan la información anterior o similar, por ejemplo, en forma de signos legibles ópticamente, tales como códigos de barras, discos legibles ópticamente, etc., o información legible por vía electrónica, tal como información contenida en un soporte magnético o en un circuito integrado o chip. Usando esta realización se logra un alto grado de seguridad y control. Se minimiza el error del operario. Se identifican las muestras y el funcionamiento se realiza según la información contenida en cada soporte de muestra, por ejemplo, cada placa de microtitulación. La información puede leerse por el operario, por ejemplo, utilizando un lector de código de barras, o por el dispositivo, detectando automáticamente la información cuando se cargan las muestras en el dispositivo.

50 En la figura 3 se muestra una realización, en la que la lectura y el control de la temperatura se efectúan mediante un sensor 12 colocado en uno de los recipientes de reacción, que se comunica con el procesador 4 a través de un transmisor 13 y un receptor 14. El sensor es, por ejemplo, un termopar y el sistema transmisor / receptor puede ser un sistema que utiliza señales IR.

55 La figura 4 muestra una sección transversal esquemática de un dispositivo según la invención, en la que se muestra el manto 6. Los recipientes 2 de reacción, el rotor 1 y el motor 3 son tal como se dieron a conocer anteriormente.

60 La figura 5 muestra una vista esquemática desde arriba, por ejemplo, de una realización según la figura 2. El manto 6 tiene una entrada y una salida, indicadas con flechas, que llevan hacia el interior y hacia el exterior del manto, respectivamente. Se ve, que el manto cubre sólo una parte de la trayectoria de rotación de los recipientes 2 de reacción, dejando un sector para la medición sin obstáculos. Aquí la medición se muestra incluyendo el sensor 7 IR, una fuente 8 láser y un sensor 9 de reflectancia.

65 En la figura 6 se muestra una realización, en la que el manto 6 rodea la trayectoria de rotación completa de los recipientes 2 de reacción. Las mediciones, que aquí se indican por el sensor 7, se toman a través del manto, preferiblemente a través de la sección 15 del manto, siendo permeable a o capaz de transmitir las señales detectadas por el sensor.

La figura 7 muestra una sección transversal esquemática de una realización en la que la fuente 17 de calentamiento, por ejemplo, una lámpara IR tubular, está dispuesta en un reflector 16 móvil. Mediante la activación de la lámpara IR y

ES 2 346 128 T3

la elevación del reflector a estrecha proximidad de los recipientes de reacción en rotación, los volúmenes de la muestra se calientan eficientemente. Cuando las lámparas se desactivan y se baja el reflector, el calor se disipa rápidamente de dichos volúmenes de muestra. El enfriamiento puede ayudarse refrigerando todo el volumen interior del dispositivo o el volumen más cercano a los recipientes de reacción en rotación. No se necesita disponer el reflector 16 por debajo de la trayectoria de rotación de los recipientes de reacción, sino que también puede disponerse por encima o alrededor de dicha trayectoria. En esos casos, el reflector se mueve hacia abajo o hacia adentro, hasta que llega a proximidad cercana de los recipientes de reacción en rotación.

Según una realización de la invención, dicho dispositivo puede someter el contenido del recipiente o los recipientes de reacción a una fuerza centrífuga significativa, preferiblemente una fuerza centrífuga en el intervalo aproximadamente 500 xg a 20.000 xg o superior, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1.500 xg a aproximadamente 20.000 xg, y más preferible de aproximadamente 5.000 xg a aproximadamente 15.000 xg. El templado alcanzado por el presente dispositivo inventivo o método es naturalmente una función del volumen de reacción, su constitución, la temperatura y la fuerza centrífuga.

Además, un dispositivo según una realización de la invención comprende medios para enfriar la parte del recipiente de reacción dirigida hacia el interior en relación con la fuerza centrífuga. En este caso, el rotor se modifica para permitir contacto térmico sin obstáculos entre el extremo proximal o “superior” de los recipientes de reacción y el medio refrigerante.

Los medios de calentamiento comprenden al menos una fuente de calor, por ejemplo, una fuente de radiación que emite radiación dentro de un intervalo de longitudes de onda que genera calor, por ejemplo, una fuente IR, un elemento eléctrico, gas caliente o líquido caliente, el cual se coloca dentro de, o se conecta a, la centrifugadora de tal manera que cuando se emite el calor, alcanza el extremo o los extremos distales, de uno o varios recipientes de reacción cuando estos recipientes de reacción, estando convenientemente situados en el rotor de la centrifugadora, se centrifugan. Cuando la invención se pretende para el calentamiento y enfriamiento cíclicos, esta fuente de calor puede encenderse y apagarse sin terminar la centrifugación. El efecto de la fuente de calor debe ser lo bastante alto para llevar la cantidad total de la mezcla de reacción contenida en el recipiente de reacción o los recipientes de reacción a la temperatura que es apropiada para la reacción química deseada. Los medios de calentamiento pueden comprender preferiblemente un sensor o sensores de temperatura o un termostato para la monitorización y el control del calentamiento.

Según una realización de la invención, se fuerza aire caliente al interior de un espacio que rodea los recipientes de reacción en rotación o por lo menos los vértices de dichos recipientes. Este espacio se denomina “manto de calentamiento”.

El aire caliente al que se hace referencia en este contexto es aire o una mezcla de gases adecuada, calentada hasta una temperatura que supera la temperatura de fusión del material de los recipientes de reacción, por ejemplo, el termoplástico de los tubos Eppendorf o pocillos de microtitulación. La temperatura es preferiblemente lo más alta posible, dadas las restricciones que plantea el equipo utilizado, y preferiblemente una temperatura en el intervalo de 200 a 800 grados Celsius, lo más preferiblemente de aproximadamente 600 grados Celsius.

El efecto de enfriamiento se logra a una velocidad de rotación sin cambios. Según una realización de la invención, el manto de calentamiento se retira de la vecindad inmediata de los recipientes de reacción, ya sea moviendo el manto de calentamiento en relación con el rotor, por ejemplo, levantando el manto de calentamiento, o bajando el rotor. Los recipientes de reacción en rotación rápida entrarán entonces en contacto con la mezcla de gases o el aire circundante, por ejemplo, el aire dentro de la centrifugadora o el aire aspirado de la sala circundante. Según una realización preferida, el aire o la mezcla de gases dentro de la centrifugadora se enfría hasta una temperatura inferior a la temperatura ambiente. El rotor también puede encerrarse en un espacio más grande, que se refrigera. Cuando se aleja el manto de calentamiento del contacto inmediato con los recipientes de reacción, el aire refrigerado enfriará rápidamente los recipientes.

Los medios para el enfriamiento pueden comprender medios para dirigir un medio refrigerante, por ejemplo, un gas, líquido o aire ambiental a la estrecha proximidad del extremo proximal o “superior” de los recipientes de reacción. Un medio refrigerante adecuado es nitrógeno líquido o gas nitrógeno refrigerado.

Cuando se utiliza la invención, se sitúan recipientes de reacción que incluyen la mezcla de reacción completa o un subconjunto de ésta, en el rotor de la centrifugadora con el extremo cerrado dirigido hacia abajo o de otra manera según la práctica convencional de centrifugación de los recipientes de reacción en cuestión. Entonces se pone en marcha la centrifugadora, es decir, se enciende el motor que hace girar al rotor. Cuando el rotor se ha acelerado hasta la fuerza gravitacional elegida, la rotación se mantiene a velocidad constante. Ahora se enciende la fuente de calentamiento conduciendo a un aumento de temperatura predominantemente en los vértices de los recipientes de reacción. El calor se transferirá a través del material de las paredes de los recipientes de reacción, a la parte más distal de la masa de la mezcla de reacción. El aumento del movimiento molecular debido al aumento de temperatura se expandirá, es decir, se reducirá la densidad de esta parte calentada de la mezcla de reacción. Debido a la presión causada por el campo gravitacional que actúa sobre subconjuntos más densos de la mezcla de reacción, las partes con menor densidad se verán forzadas a moverse hacia arriba, sustituidas inmediatamente por mezcla de reacción con una mayor densidad. Entonces se calentará esta parte densa por medio del mismo proceso de transferencia de calor de la fuente de calentamiento. La densidad de esta parte de la mezcla de reacción disminuirá y se moverá hacia arriba y se

ES 2 346 128 T3

sustituirá por mezcla de reacción más fría. Los medios para el enfriamiento, según una realización de la invención, que actúan simultáneamente en la parte superior o proximal del recipiente de reacción actuarán conjuntamente para garantizar un mezclado y homogeneización completos. Esta cadena de eventos continuará, llevando eventualmente a una mezcla de reacción homogénea mezclada completamente, y a una distribución de temperatura homogénea en la masa de la mezcla de reacción.

Según una realización preferida, el dispositivo según la invención está equipado con un sensor IR, y preferiblemente un sensor IR enfocado que monitoriza la temperatura del contenido en los recipientes en rotación. Métodos de la técnica anterior de control de temperatura a menudo usan un termopar, colocado en un recipiente de reacción, que participa en el procedimiento de termociclado. Sin embargo, esto no es necesariamente preciso. Ya que la mayoría de los materiales plásticos, utilizados para los recipientes de reacción, no absorben la radiación IR, la medición según la presente invención realmente dará la temperatura en la propia muestra. La medición puede estar gobernada por un algoritmo, dando no sólo la temperatura media de los recipientes en rotación, sino también posibles desviaciones de este valor medio.

El sensor IR anterior está equipado preferiblemente con un láser que emite un rayo concentrado de luz que impacta los recipientes de reacción. Este “punto” láser visible en los recipientes puede registrarse por un sensor opcional y emplearse para controlar el foco del sensor IR, la velocidad de rotación, para activar la medición de la temperatura de la muestra y para mediciones reflectométricas y/o fluorométricas. Cuando se utiliza la reflexión del láser para activar las mediciones de la temperatura, puede alcanzarse una mayor precisión.

Además, con el fin de evitar interferencias entre el sensor IR y la fuente IR, posiblemente utilizada para el calentamiento de los recipientes de reacción, debe elegirse la fuente IR de modo que emita radiación IR a una longitud de onda claramente diferente de la longitud de onda de lectura del sensor IR.

El enfriamiento simultáneo desde la dirección opuesta del campo gravitacional, proporcionado según una realización de la invención, aumenta eficazmente el grado de homogeneización de densidad, es decir, reduce el tiempo de templado y homogeneización de la mezcla de reacción.

Un método según la invención comprende las siguientes etapas:

- i) dosificar al menos un reactivo en un recipiente de reacción,
- ii) colocar dicho recipiente de reacción en un dispositivo que puede someterlo simultáneamente a centrifugación y calentamiento; y
- iii) someter dicho recipiente de reacción a centrifugación,
- iv) someter el extremo distal del recipiente de reacción a calentamiento.

Según una realización preferida de la invención se añade al menos un reactivo usando un capilar o dispositivo similar, que sólo libera su contenido con la centrifugación.

Un método según una realización de la invención comprende las siguientes etapas:

- i) dosificar al menos un reactivo en un recipiente de reacción, llevando dicho recipiente información sobre las etapas de proceso o el tratamiento previsto,
- ii) leer la información mediante un dispositivo, que forma parte de o se conecta a un dispositivo que puede someterlo simultáneamente a centrifugación y calentamiento
- iii) colocar dicho recipiente de reacción con su contenido en el dispositivo anterior para la centrifugación y el calentamiento; y
- iv) someter dicho recipiente de reacción a centrifugación
- v) someter el extremo distal del recipiente de reacción a calentamiento;
- vi) realizar las etapas iv y v según la información contenida en el recipiente de reacción.

Al realizar el método según las etapas i) a vi) anteriores, se minimiza el riesgo de error del operario, si no se elimina totalmente. El método también permite un gran grado de automatización del proceso y, además, simplifica el cumplimiento de los esquemas de control de calidad.

En general, la presente invención también da a conocer un nuevo método para realizar reacciones químicas en medios fluidos contenidos en recipientes de reacción, caracterizado porque se usa un dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones de aparato adjuntas.

ES 2 346 128 T3

En particular, la presente invención da ha conocer un método novedoso y eficaz para realizar reacciones que exigen un alto grado de homogeneización y que implican templados repetidos, por ejemplo, análisis y síntesis que implican termociclado. Un ejemplo de este tipo de análisis es la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Otra aplicación importante está en el campo de la selección de alto rendimiento. Este y otros métodos se esbozan previamente en la descripción.

El dispositivo según la invención es particularmente adecuado para una variación del análisis PCR, generalmente conocida como “PCR de arranque en caliente”. Utilizando el dispositivo inventivo, en primer lugar se fija la temperatura a una temperatura por encima de la temperatura de apareamiento de los cebadores. Durante este templado inicial, se gira el rotor a una velocidad más baja, suficiente para ayudar al templado. Cuando se alcanza la temperatura deseada, se añaden los reactivos con la ayuda de capilares de reactivo o cartuchos de reactivo (por ejemplo, capilares o cartuchos tal como se da a conocer en los documentos PCT/SE91/00343 y PCT/SE97/01562 por el mismo solicitante). El vaciado de los capilares o cartuchos de reactivo se desencadena aumentando la velocidad de rotación. A una velocidad de rotación mayor, se vacían los capilares o cartuchos por la fuerza centrífuga y el análisis de PCR puede llevarse a cabo, tal como se describió anteriormente en la descripción.

Al realizar un análisis de PCR utilizando un dispositivo o aparato según la presente invención, el tiempo requerido para las etapas de amplificación se reduce considerablemente. En experimentos prácticos realizados por el inventor, una amplificación de PCR que normalmente requiere aproximadamente 2 horas para completarse, ahora puede realizarse en menos de 20 minutos con resultados que no se ven afectados o mejorados. Los resultados se confirmaron en geles SDS-Page, que mostraron una alta especificidad y resolución.

Aunque la invención se describe con respecto a sus realizaciones preferidas, que constituyen el mejor modo conocido actualmente por los inventores, debe entenderse que pueden realizarse diversos cambios y modificaciones que resultarán obvios para un experto en la técnica sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas al presente documento.

ES 2 346 128 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para reacciones químicas o bioquímicas que implican templado repetido y homogeneización, que comprende las etapas de
- a) cargar un recipiente de reacción con una mezcla de reacción que va a incubarse homogéneamente,
 - b) someter dicho recipiente de reacción y su contenido a una fuerza centrífuga, y
 - 10 c) ajustar la mezcla de reacción en dicho recipiente de reacción a una temperatura apropiada para una reacción deseada bajo dicha fuerza centrífuga, mediante lo cual la dirección de la fuerza centrífuga que actúa sobre subconjuntos más densos de la mezcla de reacción conduce a una mezcla de reacción homogénea completamente mezclada y a una distribución de temperatura homogénea en la masa de la mezcla de reacción.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, en el que la fuerza centrífuga en b) supera los 500 xg.
- 20 3. Método según la reivindicación 2, en el que la fuerza centrífuga está en el intervalo de 1.500 a 20.000 xg.
4. Método según la reivindicación 1, en el que el calentamiento del recipiente de reacción se realiza usando una fuente de radiación que emite radiación dentro de una longitud de onda que genera calor en la mezcla de reacción contenida en dicho recipiente de reacción.
- 25 5. Método según la reivindicación 1, en el que el enfriamiento del recipiente de reacción se realiza rotando el recipiente de reacción en un entorno que contiene uno de aire ambiental, aire refrigerado, un gas refrigerado distinto del aire.
- 30 6. Método según la reivindicación 1, en el que la medición de la temperatura se realiza usando un sensor de infrarrojos (IR) monitorizando la temperatura del contenido en los recipientes en rotación.
7. Método según la reivindicación 1, en el que el templado repetido implica cambios de temperatura cíclicos.
- 35 8. Método según la reivindicación 1, en el que el ajuste de c) se realiza calentando simultáneamente el extremo distal del recipiente y enfriando el extremo proximal del recipiente.
9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la reacción bioquímica es una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- 40 10. Dispositivo para realizar reacciones químicas o bioquímicas que implican templado repetido y homogeneización, que comprende
- a) medios (1) para sujetar un recipiente (2) de reacción que contiene una mezcla de reacción que va a incubarse homogéneamente,
 - 45 b) medios (3) para someter el recipiente de reacción y su contenido a una fuerza centrífuga, y
 - c) medios (5, 6) para ajustar la temperatura del contenido del recipiente de reacción a temperaturas apropiadas para reacciones deseadas bajo dicha fuerza centrífuga, mediante lo cual la dirección de la fuerza centrífuga que actúa sobre subconjuntos más densos de la mezcla de reacción conduce a una mezcla de reacción homogénea completamente mezclada y a una distribución de temperatura homogénea en la masa de la mezcla de reacción.
- 50 11. Dispositivo según la reivindicación 10, en el que la fuerza centrífuga creada por los medios b) supera los 500 xg.
- 55 12. Dispositivo según la reivindicación 11, en el que la fuerza centrífuga está en el intervalo de 1.500 a 20.000 xg.
- 60 13. Dispositivo según la reivindicación 10, en el que los medios para ajustar la temperatura comprenden medios (5, 6) para calentar el contenido del recipiente (2) de reacción que comprenden medios que emiten radiación dentro de una longitud de onda que genera calor en la mezcla de reacción contenida en dicho recipiente de reacción.
- 65 14. Dispositivo según la reivindicación 10, en el que los medios para ajustar la temperatura comprenden medios para enfriar el contenido del recipiente de reacción que comprenden medios para exponer el recipiente de reacción en rotación a un entorno que contiene uno de aire ambiental, aire refrigerado, un gas refrigerado distinto del aire.
15. Dispositivo según la reivindicación 10, en el que los medios para medir la temperatura de la mezcla de reacción comprenden medios (7) para monitorizar la radiación IR emitida por la mezcla de reacción.

ES 2 346 128 T3

16. Dispositivo según la reivindicación 10, en el que el templado y la homogeneización implican templado repetido, por ejemplo, cambios de temperatura cíclicos.

5 17. Dispositivo según la reivindicación 10, en el que los medios de c) actúan calentando simultáneamente el extremo distal del recipiente y enfriando el extremo proximal del recipiente.

18. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17, en el que la reacción bioquímica es una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

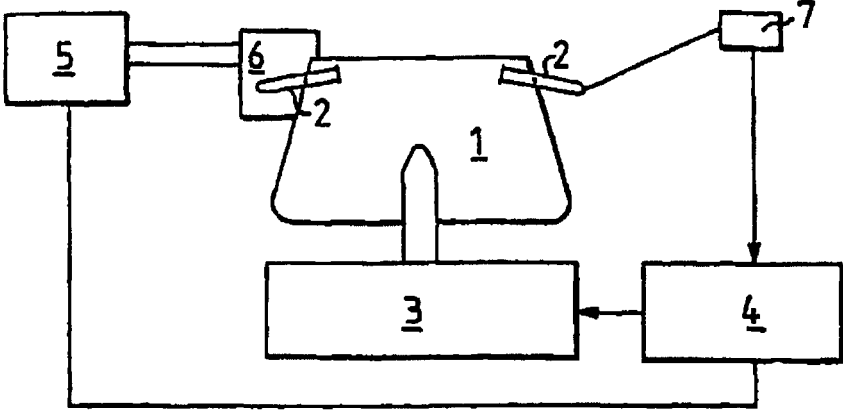


FIG.1

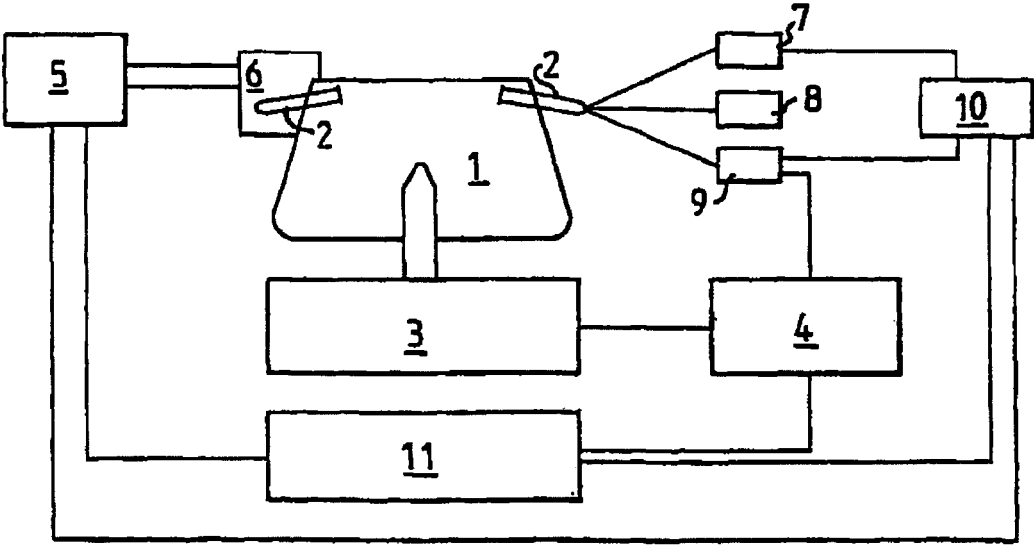


FIG. 2

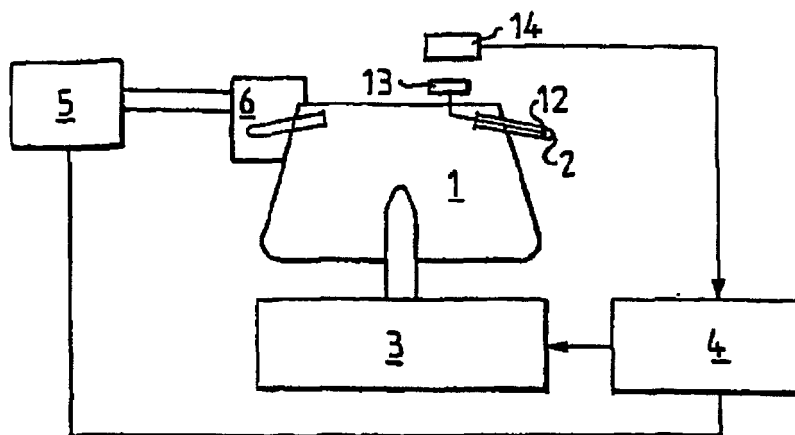


FIG. 3

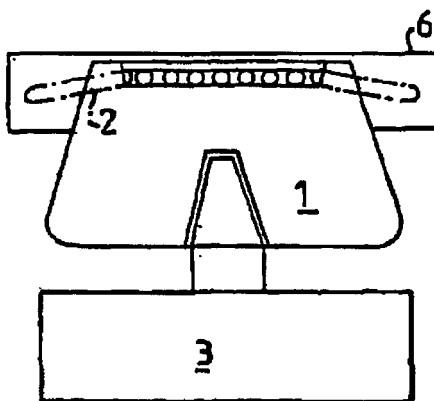


FIG. 4

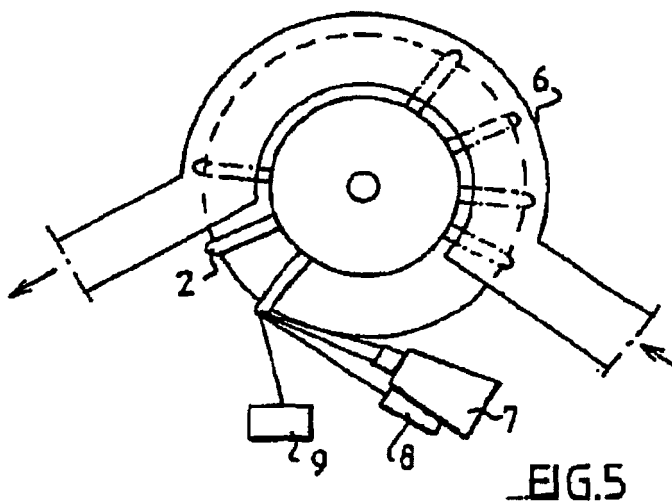


FIG. 5

