



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 321 810**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01994813 .2**

96 Fecha de presentación : **19.12.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1409722**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.04.2004**

54 Título: **Procedimiento de análisis de macromoléculas.**

30 Prioridad: **30.01.2001 DE 101 03 954**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**12.06.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**12.06.2009**

73 Titular/es: **Advalytix AG.**  
**Eugen-Sänger-Ring 4**  
**85649 Brunnthal, DE**

72 Inventor/es: **Gauer, Christoph**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 321 810 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).

# ES 2 321 810 T3

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de análisis de macromoléculas.

5 El invento se refiere a un procedimiento para el análisis de macromoléculas con la ayuda de un microarray.

Un método para el análisis rápido de macromoléculas comprende la aplicación en una disposición regular sobre un microarray. Las densidades, que es posible alcanzar en la actualidad en un microarray de esta clase llegan, por ejemplo para el DNA (ácido desoxirribonucleico) a aproximadamente 250.000 clases distintas de moléculas por  $\text{cm}^2$ .  
10 La aplicación paralela y rápida de las moléculas es posible, por ejemplo, con robots de pipetado. En una forma geométrica de la matriz de esta clase se puede realizar de manera sencilla el análisis, por ejemplo una medición de la fluorescencia ("DNA microarrays" editado por M. Schena, Oxford University Press, Nueva York 1999). Las sustancias analizadas son por ejemplo anticuerpos, antígenos, proteínas o DNA.

15 En un microarray de esta clase se disponen las distintas macromoléculas en diferentes puntos de una matriz. Por encima del microarray se vierte otro líquido con otra clase de macromoléculas, que establece una unión específica con al menos una clase de las macromoléculas del microarray. Si se elimina después el líquido nuevamente de la superficie, las macromoléculas a analizar sólo permanecen en los puntos de las uniones específicas. Con la ayuda de una medición con resolución local, por ejemplo una medición de la fluorescencia, se pueden determinar los puntos en los que halla  
20 la macromolécula a analizar. De la posición conocida de las distintas macromoléculas en la matriz del microarray se puede determinar por lo tanto la clase de macromoléculas con las que la macromolécula a analizar establece una unión específica.

25 Para ello es preciso garantizar, que las macromoléculas a analizar puedan entrar en contacto con todas las macromoléculas de la matriz. Para es, por ejemplo, preciso, que la totalidad de la superficie del sustrato sobre el que se halle el microarray sea anegada con el líquido con la macromolécula a analizar.

La duración de un experimento correspondiente es determinada por la difusión y puede requerir por ello cierto tiempo. Si, por ejemplo, la concentración de la macromolécula a analizar es demasiado pequeña en el líquido, puede  
30 pasar mucho tiempo hasta que haya encontrado su pareja de unión específica sobre la matriz. Además, la cinética de reacción de la unión específica depende de numerosos parámetros de la reacción, como por ejemplo la temperatura, la concentración en sales y/o el valor pH, que difícilmente es posible mantener constantes durante un tiempo grande sobre una superficie típica de algunos  $100 \mu\text{m}^2$  hasta algunos  $\text{cm}^2$ . Para mejorar la reproducibilidad limitada de los resultados debida a ello se prevén en la actualidad con frecuencia varias clases iguales de macromoléculas en distintos  
35 puntos sobre el microarray para poder obtener así datos estadísticos.

El líquido con la macromolécula a analizar, por ejemplo un oligonucleotido, también puede ser vertido por medio de microcanales sobre una superficie de cuerpo sólido a lo largo de la que las macromoléculas de distintas clases se hallen como oligonucleotidos captadores ("Geniom<sup>®</sup> Technology: From DNA-Chips to DNA-Processors" en "Chips to  
40 Hits", 06-09, noviembre 2000, Philadelphia, PA, USA; IBC Conferences Inc.).

El oligonucleotido a analizar se sitúa con ello a lo largo del canal en la proximidad de todos los oligonucleotidos captadores.

45 El microarray es, para este estado de la técnica, por ejemplo, una estructura Sándwich con bombas externas en cuyo lado inferior se halla una cámara CCD. El fondo y la tapa son transparentes para que se pueda medir la fluorescencia de oligonucleotido marcado en la luz pasante. Los líquidos con los distintos oligonucleotidos se bombean sobre el array por medio de canales cerrados. Dada la sección transversal típica de los canales de  $100 \mu\text{m}$  por  $100 \mu\text{m}$  se requiere para la longitud necesaria de los canales una presión de varios bar, con lo que se encarecen tanto las alimentaciones,  
50 como también el propio chip. Las bombas y las válvulas, que lo realizan, poseen necesariamente un volumen muerto, lo que da lugar a un mayor consumo de reactivos.

El documento WO 94/27719 y el documento EP 1 053 784 A2 describen microarrays, cuyos diferentes puntos de unión se humedecen de manera preferida en relación con su entorno.

55 El documento WO 99/43688 describe ácidos nucleicos con grupos fotorreactivos, que se fijan a superficies de cuerpos sólidos,

A través del documento US 5,874,219 se conoce el procedimiento de agrupar los arrays en diferentes "Test-wells".

60 El objeto del presente invento es divulgar un procedimiento y un dispositivo, que permitan realizar un análisis en lo posible reproducible con un volumen pequeño de las pruebas.

Este problema se soluciona con un procedimiento de análisis con las características de la reivindicación 1. El  
65 problema se soluciona, además, con un dispositivo de análisis con las características de la reivindicación 10. Las reivindicaciones subordinadas se refieren a configuraciones ventajosas.

## ES 2 321 810 T3

En un procedimiento según la reivindicación 1 se halla sobre un microarray una gran cantidad de primeras macromoléculas, eventualmente distintas, con una disposición conocida. El microarray está dispuesto de acuerdo con el invento sobre una zona de la superficie de un cuerpo sólido, que posee propiedades de humectación distintas de las de la superficie de cuerpo sólido circundante. Un líquido con una gran cantidad de segundas macromoléculas, que -  
5 debido a la modulación de las propiedades de humectación - se sitúa con preferencia en esta zona de permanencia es aplicado sobre la zona de permanencia preferida de la superficie del cuerpo sólido. Después de una amplia eliminación del líquido de la superficie del cuerpo sólido, se analizan con resolución local las segundas macromoléculas, que se hallen todavía sobre la superficie de cuerpo sólido. De la posición de estas segundas macromoléculas remanentes se determinan las primeras macromoléculas, que hayan establecido una unión específica con las macromoléculas  
10 de la segunda cantidad. A partir de ello es posible determinar la clase, respectivamente las clases de las segundas macromoléculas contenidas en el líquido y/o obtener una información de su naturaleza.

Con la definición de una zona de permanencia preferida es posible limitar la superficie del cuerpo sólido, que es cubierta con el líquido con la clase de macromoléculas a analizar. Con la elección de una forma geométrica correspondiente es posible mantener muy pequeño el volumen de la prueba y garantizar a pesar de ello, que las segundas macromoléculas contenidas en el líquido establezcan una unión con todas las primeras macromoléculas dispuestas sobre el microarray. Con la elección de una zona de permanencia preferida por medio de la modulación de las propiedades de humectación no es necesario anegar con el líquido la totalidad de la superficie del chip.

El líquido con las macromoléculas a analizar se sitúa, debido a las diferentes propiedades de humectación, sólo sobre la zona de permanencia preferida. Para ello no son necesarios canales o surcos cualesquiera, que limiten o frenen el movimiento del líquido con las macromoléculas a analizar. Por lo tanto es posible un rápido reparto sobre la zona de permanencia preferida. La tensión de superficie del líquido da lugar, debido a las distintas propiedades de humectación, a que el líquido no pueda abandonar sin la acción de una fuerza externa la zona de permanencia preferida.

Las distintas propiedades de humectación pueden ser obtenidas, por ejemplo, con un recubrimientos correspondiente de la zona de permanencia preferida o de su entorno. Así por ejemplo, es posible definir zonas hidrófilas, respectivamente hidrófobas. Si las macromoléculas a analizar se halla en solución acuosa, se elige la zona de permanencia preferida por ejemplo de tal modo, que sea más hidrófila que la superficie de cuerpo sólido circundante. Esto se puede lograr con un recubrimiento hidrófilo de la zona de permanencia preferida o con un entorno hidrófobo. Un entorno hidrófobo puede ser creado por ejemplo con una superficie silanizada. Según las propiedades de humectación del líquido en el que estén contenidas las macromoléculas también se puede elegir una superficie hidrófila, lipófila o lipófila de cuerpo sólido circundante de la zona de permanencia en comparación con la superficie de la zona de permanencia preferida.

Las propiedades de humectación pueden ser moduladas también por medio de un microestructurado, como es el caso del efecto de loto basado en la distinta rugosidad de la superficie. La distinta rugosidad da lugar en este caso a propiedades de humectación distintas. La rugosidad puede se creada por ejemplo por medio de un microestructurado de las correspondientes zonas de la superficie, por ejemplo por medio de un tratamiento químico o de una irradiación con iones.

La creación de zonas con propiedades de humectación distintas es sencilla y barata con la utilización de procedimientos litográficos y/o tecnologías de recubrimiento conocidas.

Dado que el dispositivo según el invento no necesita límites mecánicos, como por ejemplo canales, también es posible recubrir con el líquido sólo zonas parciales del microarray. La aplicación de esta clase es ventajosa, cuando sólo se necesita un análisis específico, que no tenga que involucrar todas las macromoléculas existentes en el microarray.

En una configuración según la reivindicación 2 se desplaza al menos una onda de superficie en la dirección del líquido. Debido a la transmisión del impulso al líquido se puede obtener una distribución y/o mezcla del líquido, de manera, que las segundas macromoléculas puedan entrar de manera eficaz y rápida en contacto con las primeras macromoléculas. Igual que en la primera configuración, se elimina después ampliamente el líquido de la zona del microarray y, con resolución local, se determinan los puntos del microarray en los que las segundas macromoléculas han establecido una unión con las primeras macromoléculas por lo que todavía permanecen sobre la superficie de  
55 cuerpo sólido.

En esta configuración del invento se mezclan las macromoléculas contenidas en el líquido con la ayuda de la onda de superficie y se reparten de manera eficaz sobre la superficie de cuerpo sólido. De esta manera se agita prácticamente el líquido. Con ello se pueden reducir los tiempos de reacción grandes, necesarios en los procedimientos convencionales, ya que el movimiento de las moléculas no tiene lugar por difusión. En el procedimiento según el invento conforme con la segunda configuración se puede prescindir, además, de dispositivos de transporte o de mezcla, como bombas con accionamiento micromecánico o piezoeléctrico.

La distribución y la mezcla del líquido tienen lugar prácticamente sin presión. La mezcla del líquido por medio de la onda de superficie da lugar a condiciones de reacción homogéneas, por ejemplo desde el punto de vista de la temperatura, del valor pH o de la concentración en sales, en la totalidad de la zona barrida por la onda de superficie.

## ES 2 321 810 T3

La onda de superficie puede ser generada con la ayuda de al menos un dispositivo generador de ondas de superficies. Las ondas de superficies transmiten un impulso al líquido con las macromolécula a analizar. La transmisión del impulso se obtiene por medio de la deformación mecánica de la superficie de cuerpo sólido o por la acción de la fuerza de los campos eléctricos, que lo acompañan, sobre la materia cargada o polarizable.

La intensidad de la acción de la fuerza sobre el líquido puede ser ajustada en un margen amplio por medio de la amplitud de la onda de superficie. La onda de superficie puede ser generada con forma de impulsos con pulsos de distinta longitud o de manera continua. La excitación del dispositivo de generación de ondas de superficies con un Software correspondiente es posible de manera sencilla.

Las ondas de superficies pueden ser generadas sobre substratos piezoeléctricos o sobre substratos con zonas piezoeléctricas. En este caso es suficiente, que el substrato, respectivamente el recubrimiento correspondiente sólo exista en la zona en la que se halle el dispositivo de generación de ondas de superficies. La onda acústica de superficie se propaga entonces también exteriormente a la zona piezoeléctrica.

Para la generación de la onda de superficie se utiliza ventajosamente un transductor interdigital en sí conocido. Un transductor interdigital de esta clase posee en su ejecución más sencilla dos electrodos, que penetran uno en otro a modo de dedos. Con la aplicación de un campo alterno de alta frecuencia, por ejemplo del orden de magnitud de algunos cientos de MHz, se genera en un substrato piezoeléctrico o en una zona piezoeléctrica del substrato una onda de superficie, cuya longitud de onda es el resultado del cociente de la velocidad del sonido en la superficie y la frecuencia. La dirección de propagación es perpendicular a la estructura de electrodos con forma de dedos, que penetran unos en otros. Con la ayuda de un transductor interdigital de esta clase se puede generar de una manera muy sencilla una onda de superficie definida. La construcción del transductor interdigital resulta sencilla y barata con los procedimientos litográficos y las tecnologías de recubrimientos conocidas. Los transductores interdigitales también pueden ser excitados inalambricamente, por ejemplo por aplicación de un campo alterno electromagnético a un dispositivo de antena conectado con el transductor interdigital.

Se puede crear un pista acústica limitada lateralmente de la onda de superficie con una configuración ventajosa en la que la separación de los dedos del transductor interdigital varíe entre los electrodos. Con una frecuencia dada sólo se cumple en una zona limitada lateralmente en el espacio la condición de resonancia de que la frecuencia sea igual al cociente de la velocidad del sonido sobre la superficie y la separación entre los dedos. Con un transductor de esta clase se puede barrer por lo tanto con la onda de superficie una zona elegida.

La forma geométrica de la zona de permanencia preferida puede ser adaptada a la aplicación correspondiente. Así por ejemplo, es posible, que la zona de permanencia preferida se extienda con forma de meandro sobre del microarray, de manera, que las diferentes posiciones del microarray se alineen a lo largo de la zona de permanencia preferida. En este caso se garantiza, que todos los puntos de análisis entren en contacto con el líquido. Igualmente se puede prever una disposición en cruz en la que la diferentes posiciones del microarray se hallen en los puntos de cruce. En una configuración sencilla se dispone el microarray sobre una zona de permanencia limitada, que rodee estrechamente los diferentes puntos de análisis del microarray.

La medición con resolución local de las segundas macromoléculas remanentes sobre la superficie de cuerpo sólido después de eliminar el líquido, es decir, que han creado un híbrido con las primeras macromoléculas, puede ser realizada con una medición de la fluorescencia. Para ello es preciso, que las macromoléculas a analizar se marquen con un colorante fluorescente o que posean un componente fluorescente.

De manera alternativa es posible proveer las macromoléculas a analizar con un grupo funcional con actividad eléctrica o que lo comprendan. La medición con resolución local puede ser realizada entonces como una medición eléctrica.

Para el análisis también se puede recurrir a la conductividad o a las propiedades dieléctricas de las segundas macromoléculas.

Igualmente es posible marcar las segundas macromoléculas de manera radiactiva para poder determinar la posición de las segundas macromoléculas remanentes después de eliminar ampliamente el líquido.

Otra posibilidad es la utilización de "Beads". Estas partículas de masa con un tamaño de por ejemplo  $10\ \mu\text{m}$  se funcionalizan de tal modo, que sólo se adhieran a determinadas macromoléculas. Posteriormente se pueden determinar entonces los puntos del microarray en los que se encuentran estos "Beads". Con ello es posible obtener una información de la naturaleza y de la clase de las macromoléculas en el propio microarray. Los "Beads" pueden ser localizados por ejemplo como un recubrimiento con masa en el punto determinado del microarray. Para ello se puede aprovechar por ejemplo el hecho de que una onda acústica de superficie es atenuada por el recubrimiento con masa de la superficie. Sí, por ejemplo en un transductor interdigital como el descrito más arriba se propaga sobre la superficie de cuerpo sólido una onda acústica de superficie limitada lateralmente, de tal modo, que sólo incida en uno o pocos puntos del microarray, se puede determinar a partir de la atenuación de esta onda de superficie si en este punto se halla o no una masa adicional con la forma de un "Bead".

## ES 2 321 810 T3

El procedimiento según el invento puede ser utilizado por ejemplo ventajosamente para el análisis de oligonucleótidos. Los distintos oligonucleótidos se hallan en una disposición conocida sobre el microarray. Sobre el microarray se aplica un líquido con el oligonucleótido a analizar. Con resolución local se determina el punto en el que los oligonucleótidos del líquido se unen específicamente, respectivamente forman un híbrido con los oligonucleótidos que los oligonucleótidos están formados por ejemplo por secuencias de DNA cortas (secuencias de ácido desoxirribonucleico). Sin embargo, igualmente es posible prever, respectivamente analizar en el microarray diferentes proteínas, diferentes antígenos o diferentes anticuerpos.

En un perfeccionamiento ventajoso del procedimiento según el invento se propaga, después de la aplicación del líquido sobre la superficie de cuerpo sólido, al menos una onda de superficie por encima de la superficie de cuerpo sólido. De la intensidad de la onda de superficie, que es necesaria para deshacer la unión de las macromoléculas del microarray con las macromoléculas contenidas en el líquido, se puede deducir la intensidad de la unión. La unión puede ser anulada tanto por la deformación mecánica de la superficie de cuerpo sólido, como también por la fuerza del campo eléctrico, que acompaña a la deformación.

Con dos ondas de superficie, cuyas pistas acústicas posea un ancho limitado y que incidan en el microarray desde direcciones distintas se puede elegir un punto singular para la medición de la fuerza de la unión sobre el microarray. La deformación del cuerpo sólido en el punto de cruce de las ondas de superficie es máxima. Una unión de macromoléculas ubicada aquí es sometida a un esfuerzo mayor que las uniones del entorno en el que no se cruzan las sondas de superficie.

Así por ejemplo, en el caso de una medición de la fluorescencia de las segundas macromoléculas aumenta la amplitud de la onda de superficie y la señal de fluorescencia es medida con resolución local. Si en el punto de fluorescencia se rompe la unión entre las primeras y las segundas macromoléculas debido a la mayor amplitud, varía con ello la señal de fluorescencia.

Las ondas de superficie también pueden ser utilizadas por ejemplo para el transporte de la cantidad de líquido en la zona del microarray, respectivamente para eliminar el líquido del microarray. Así por ejemplo, con una onda de superficie de un recipiente, que se halle sobre la superficie de cuerpo sólido y formado por ejemplo por una zona, cuyas propiedades de humectación se eligen de tal modo, que el líquido se mantenga con preferencia en ella, se puede impulsar el líquido por medio de una onda de superficie en la dirección hacia el microarray. Una vez finalizado el experimento se puede someter la zona del microarray a la acción de una onda de superficie, de manera, que el líquido, impulsado por la magnitud del impulso de la onda de superficie, abandone nuevamente el microarray. Con una intensidad muy grande de la onda de superficie también es posible eliminar totalmente el líquido de la totalidad de la superficie de cuerpo sólido.

El tratamiento de la superficie de cuerpo sólido con la onda acústica de superficie da lugar, además, con una elección correspondiente de la intensidad a una limpieza de las zonas barridas.

La utilización de ondas de superficie para mezclar, respectivamente distribuir el líquido sobre la superficie de cuerpo sólido evita los volúmenes muertos, que se forman en las disposiciones convencionales de bombas. Se eliminan las alimentaciones largas y las válvulas, que es preciso "vaciar por bombeo". Con las ondas de superficie también es posible crear, incluso con cantidades mínimas de líquido, turbulencias a lo largo de distancias grandes. De esta manera se incrementa la velocidad media de las macromoléculas a analizar y se reduce el tiempo de reacción. Las ondas de superficie pueden ser utilizadas por lo tanto ventajosamente para la aplicación y la mezcla de sustancias de prueba para acelerar el tiempo de reacción en un proceso determinado por la difusión.

Con un líquido con segundas macromoléculas conocidas se puede determinar, respectivamente caracterizar la clase y eventualmente las primeras macromoléculas desconocidas sobre el microarray.

En un procedimiento según el invento para la construcción de un microarray se aplica un líquido con al menos una clase de macromoléculas sobre una zona de una superficie de cuerpo sólido, cuyas propiedades de humectación se diferencien de las de la superficie de cuerpo sólido circundante de tal modo, que el líquido se mantenga con preferencia sobre ella. Las macromoléculas se cierran con un inhibidor con actividad lumínica, que evite la unión con la superficie. Nuevamente, el líquido no puede abandonar, debido a la tensión superficial y a las propiedades de humectación, la zona preferida de la superficie sin la acción de una fuerza externa. Por lo tanto, el líquido ya está localizado, sin que sea necesario anegar la totalidad de la superficie de cuerpo sólido con el líquido. De esta manera se reduce la cantidad necesaria de reactivos.

Una zona secundaria de la zona de permanencia preferida es iluminada localmente para disolver el inhibidor de la macromolécula en la zona iluminada. Las macromoléculas de la zona secundaria pueden ser fijadas ahora y son fijadas en la zona de permanencia preferida en los puntos iluminados. De esta manera se puede determinar con exactitud el punto de la zona de permanencia en el que se debe hallar la macromolécula.

Estos pasos se repiten eventualmente con una o varias clases distintas de macromoléculas para inmovilizar diferentes macromoléculas en puntos definidos y conocidos de la zona de permanencia preferida. Con la definición de una zona de permanencia preferida por medio de la elección de sus propiedades de humectación se evitan los canales, los surcos, los cantos u otros impedimentos mecánicos. El líquido se puede mover libremente antes de la fijación en la zona de permanencia preferida.

## ES 2 321 810 T3

Para el transporte del líquido y la mezcla durante la creación del microarray de primeras macromoléculas para la síntesis fotoinducida, por ejemplo para la síntesis del DNA, se puede utilizar igualmente de manera ventajosa ondas de superficie. El transporte del líquido ya no es determinado por la difusión y se garantiza una distribución homogénea del líquido. Otras ventajas se desprenden de manera análoga al procedimiento de análisis descrito más arriba.

5 Las configuraciones del procedimiento según el invento se describirán con detalle por medio de las figuras adjuntas, no hechas a escala. En ellas muestran:

10 La figura 1, una representación esquemática de un dispositivo para la realización del procedimiento según el invento.

La figura 2, en una representación esquemática, otro dispositivo para la realización de un procedimiento según el invento.

15 La figura 3, en una representación esquemática, un tercer dispositivo para la realización de un procedimiento según el invento.

20 La figura 4, en una representación esquemática, un cuarto dispositivo para la realización de un procedimiento según el invento.

La figura 5a, respectivamente b, un detalle a mayor escala de los dispositivos representados en la figura 1, respectivamente 4.

25 Las representaciones de las figuras se deben entender en el sentido de que eventualmente sólo representan una parte de un sistema más grande en el que se hallan otros dispositivos de análisis, respectivamente de síntesis de la clase según el invento u otra.

30 En la figura 1 se designa con 1 un cuerpo sólido, por ejemplo de material piezoeléctrico como cuarzo o  $\text{LiNbO}_3$ . De manera alternativa se puede prever un cuerpo sólido, que posea al menos una superficie parcialmente piezoeléctrica, por ejemplo de ZnO. La referencia 1 puede ser en este caso un detalle de un chip mayor.

35 Sobre la superficie de cuerpo sólido se halla una zona 3 de permanencia preferida, que posee propiedades de humectación distintas de la superficie de cuerpo sólido circundante. La superficie de la zona 3 se elige de tal modo, que el líquido en el que se halle el material a analizar se mantenga en ella de manera preferida. La superficie de la zona 3 de superficie preferida es, en el caso de una solución acuosa, por ejemplo hidrófila en comparación con la superficie más hidrófoba del cuerpo sólido circundante. Para ello es posible, que la superficie de cuerpo sólido restante esté salinizada o microestructurada y sea por ello hidrófoba.

40 La referencia 5 designa a título de ejemplo una posición de una clase de macromoléculas, que se halla sobre la zona 3 de permanencia. También es posible prever muchas más posiciones 5. La referencia 15 designa una pista de entrada sobre el cuerpo 1 sólido, que posee las mismas propiedades de superficie que la zona 3 de permanencia preferida. La referencia 16 designa la correspondiente pista de salida. Como es natural, la entrada y la salida también pueden estar cambiadas. Las referencias 15 y 16 conducen, de una manera no descrita con detalle, por ejemplo a un recipiente u otras estaciones de análisis.

45 La figura 5a representa a mayor escala una parte de la zona 3. Sólo se representan algunas de las zonas 5.

50 La referencia 7 designa un transductor interdigital, que sirve como dispositivo de generación de ondas de superficie. El transductor 7 interdigital se compone de dos electros 9 y 11 con prolongaciones 13 a modo de dedos, que penetran unos en otros. Al aplicar un campo alterno a los electrodos del transductor se genera una onda de superficie con una longitud de onda, que equivale a la separación de los dedos de los electrodos. La dirección de propagación 8 es perpendicular a los dedos, que penetran unos en otros. El transductor comprende una gran cantidad de dedos, que penetran unos en otros, de los que sólo se representan algunos esquemáticamente y no a escala.

55 Con la elección de la orientación de los cristales y/o la forma geométrica de los transductores interdigitales se pueden generar diferentes tipos de ondas, por ejemplo ondas de Rayleigh u ondas de empuje. El transductor 7 interdigital se crea sobre la superficie del chip con procedimientos litográficos y con procedimientos de recubrimiento.

60 Como es natural, alrededor del microarray se pueden disponer, de manera no representada, varios transductores, eventualmente con distintas direcciones de emisión.

Un dispositivo según el invento de esta clase puede ser utilizado como sigue. Como ejemplo de macromoléculas se describen en lo que sigue oligonucleotidos.

65 En un microarray según el invento se aplican secuencias A1, A2, A3... de DNA de diferentes clases, llamados oligonucleotidos, sobre las diferentes posiciones 5 del microarray (véase por ejemplo la figura 5a). La clase de la secuencia, definida por la sucesión de las bases adenina, citosina, guanina y timina, es conocida y es definida por la posición en la matriz. Las separaciones típicas entre los oligonucleotidos de distintas clases son en este caso aproxima-

## ES 2 321 810 T3

damente 100  $\mu\text{m}$  y las secuencias tienen una longitud típica de 10 a 100 pares de bases. La prueba de oligonucleótidos a analizar (en lo que sigue, por ejemplo "a1") es marcada con un colorante fluorescente o también con un grupo funcional con actividad eléctrica y se aplica sobre la matriz a través de la pista 15 de entrada y disuelta en un líquido. Las propiedades de humectación de la pista 15 de entrada se eligen de tal modo, que el líquido no abandone lateralmente esta zona 15.

El líquido se reparte sobre la zona 3 de permanencia preferida. Una vez que el líquido se halle sobre la zona 3, se genera una onda de superficie en la dirección 8 con la ayuda del transductor 7 interdigital. Para ello se aplica a los electrodos 9, 11, por ejemplo por medio de hilos de contacto, un campo alterno de algunos MHz. De manera alternativa es posible irradiar un campo alterno en un dispositivo de antena conectado con los electrodos. La onda de superficie se propaga en la dirección 8 y da lugar, debido a la transmisión del impulso al líquido, a la mezcla y a la distribución de él sobre la superficie de permanencia preferida. De esta manera se garantiza, que el líquido se desplace sobre toda la zona 3 y entre en contacto con todos los puntos 5 de análisis de microarray.

Para el movimiento a lo largo de la pista 15 de entrada también se puede utilizar una onda de superficie generada por un transductor interdigital no visible en el detalle de la figura 1. En cualquier caso, las amplitudes de las ondas de superficie se eligen de tal modo, que el líquido no abandone la zona 3, 15, 16 de permanencia preferida.

Sí un "oligonucleótido A1 captor" complementario de la prueba se halla en una posición 5 de la matriz, tiene lugar la hibridización entre los oligonucleótidos a1 y A1 complementarios.

A continuación se elimina nuevamente la solución de prueba de la matriz por medio de la acción de una onda de superficie en la dirección 8 a través de la pista 16 de salida. El marcador con actividad eléctrica o fluorescente ya sólo permanece allí donde el oligonucleótido a1 de prueba se haya hibridizado con un oligonucleótido captor. La fluorescencia, respectivamente su señal eléctrica es medida ahora con resolución local. A partir de la posición de la señal se determina la secuencia DNA ubicada sobre el microarray y que ha hibridizado el oligonucleótido a1 de prueba. Con ello se puede identificar el oligonucleótido a1 de la prueba.

Con la zona 3 de permanencia limitada se lleva el oligonucleótido de prueba de manera efectiva a los oligonucleótidos captadores de los puntos 5 del microarray. Con la mezcla y la distribución adicionales se reducen de manera significativa los tiempos de reacción.

Las diferentes secuencias A1, A2, A3... de DNA pueden ser aplicadas sobre la forma matricial del microarray, por ejemplo, con un robot de pipetado.

En un procedimiento especialmente preferido se crean estos oligonucleótidos captadores sobre el propio microarray por sintetización fotoinducida. Las diferentes bases de la sintetización de los oligonucleótidos se cierran cada una con un inhibidor con actividad lumínica. El oligonucleótido sólo puede ser prolongado en los puntos en los que incide la luz. Una base disuelta, por ejemplo guanina, es aplicada sobre la zona 3 de permanencia preferida. Un rayo de luz disuelve localmente los inhibidores en un punto 5 en el que debe anclarse la guanina. Después de un determinado tiempo de espera se produjo la reacción en los puntos prefijados. Esta reacción puede ser acelerada igualmente por medio de la mezcla con una onda de superficie con la ayuda de un transductor 7 interdigital. Después de la reacción se elimina nuevamente de la matriz el líquido con la guanina. Ahora se puede repetir el mismo paso con otra base, por ejemplo citosina. De esta manera se crea un microarray en el que distintas secuencias de DNA se hallan en determinados puntos.

La figura 2 muestra otra forma de ejecución con la que se puede realizar el procedimiento según el invento. Nuevamente se representa un detalle de una superficie de chip. La zona 30 de permanencia preferida está dispuesta aquí en forma de cruz y se representa nuevamente rayada. En los puntos de cruce se hallan los puntos 5 de análisis. En un lado del microarray se prevé un segundo transductor 19 interdigital con una dirección de radiación perpendicular a la dirección 8 de radiación del primer transductor 7 interdigital. Con la ayuda de un segundo transductor 19 interdigital de esta clase se puede intensificar la mezcla, respectivamente la distribución del líquido con el oligonucleótido a1 de prueba. Como es natural, también es posible prever transductores interdigitales correspondientes en los restantes lados del microarray.

El líquido puede ser aplicado a la pista 17 de entrada. Una vez que haya alcanzado la zona 18 puede ser desplazado con la ayuda del transductor 19 interdigital, que posee un sentido de radiación en la dirección a lo largo de la pista 18 de entrada. El líquido eventualmente siguiente sobre la zona 17 es arrastrado por medio de la tensión de superficie.

La cantidad de líquido llega así a la zona 30 de permanencia preferida. Aquí se puede mezclar distribuir el líquido de manera eficaz por medio de los transductores 7 y 19 interdigitales. El transductor 7 interdigital da lugar a una componente en la dirección horizontal de la figura 2, mientras que el transductor 19 interdigital da lugar a una componente de movimiento perpendicular en la representación de la figura 2. Así se puede obtener de manera sencilla y rápida una distribución óptima del líquido con un nucleótido de prueba sobre el microarray de la figura 2.

Una vez finalizado el experimento se conduce el líquido a través de la pista 16 de salida por medio de una onda de superficie generada con el transductor 7 interdigital, por ejemplo a un recipiente no representado, que se puede hallar igualmente sobre la superficie del chip. La entrada, respectivamente salida 16, 17 y 18 de la figura 2 están funcionalizadas igual que la zona 30 de permanencia preferida.

## ES 2 321 810 T3

En la forma de ejecución de la figura 2 también se puede realizar, análogamente a la forma de ejecución de la figura 1, la aplicación de una primera macromolécula. La disposición en cruz de la zona 30 de permanencia de la forma de ejecución de la figura 2 reduce la cantidad de líquido necesaria para llevar el nucleotido de prueba de manera eficaz a la zona de todos los nucleotido A1, A2, A3 captores.

En al figura 3 se representa otra configuración, igualmente como detalle de una superficie de chip. Los transductores 21, 23 y 31 interdigitales se configuran como transductores interdigitales “adelgazados”. El transductor 21 interdigital comprende electrodos 25 y 27 con prolongaciones 29 a modo de dedos. La separación de estos dedos no es constante a lo largo del eje de unión entre los electrodos 25 y 27. La separación de los dedos determina la longitud de onda de la onda de superficie emitida. Con una velocidad del sonido de la onda de superficie constante sólo se cumple, por lo tanto, la condición de resonancia de que la frecuencia de la onda de superficie es el resultado del cociente de la velocidad acústica de la onda de superficie y la longitud e onda para una determinada frecuencia aplicada y para una determinada separación de los dedos. De esta manera se puede generar una onda de superficie, que sólo posea una extensión lateral muy pequeña perpendicularmente a la dirección de propagación y una posición definida a lo largo del eje del transductor.

Los transductores 23 y 31 interdigitales poseen una construcción análoga, poseyendo el transductor 23 interdigital una dirección de propagación de la onda de superficie contraria a la dirección de propagación de una onda de superficie del transductor 21 interdigital. El transductor 31 interdigital posee una dirección de propagación perpendicular a aquella. Como es natural, aquí también es posible prever transductores interdigitales adicionales, por ejemplo un transductor interdigital con una dirección de propagación contraria a la dirección de propagación del transductor 31 interdigital.

A título de ejemplo se representa una onda de superficie generada con el transductor 21 interdigital con una dirección 51 de propagación. La referencia 52 designa la dirección de propagación de una onda de superficie, que puede ser generada con el transductor 31 interdigital. Con la elección de la frecuencia de la onda se superficie aplicada a los dos transductores interdigitales se puede elegir el punto 50 de análisis en el que se detecta la intensidad máxima.

Un dispositivo de esta clase puede ser utilizada ventajosamente como sigue.

En primer lugar se aplica nuevamente un líquido con el nucleotido a1 de prueba por medio de la pista 15 de entrada sobre la zona 3 de permanencia preferida en la que se hallan diferentes nucleotidos A1, A2, A3... captores, como se representa en la figura 5b. Con la emisión de una onda de superficie se acelera la mezcla y la distribución del líquido con el nucleotido a1 de prueba sobre la zona 3 de permanencia preferida. Transcurrido el tiempo de reacción se elimina nuevamente el líquido de la superficie y el oligonucleotido a1 de prueba sólo permanece en los puntos en los que el oligonucleotido a1 se haya hidrolizado con un oligonucleotido A1 captor del microarray. La onda de superficie es desplazada a lo largo de la línea de unión entre los electrodos 25 y 27 recurriendo a frecuencias distintas.

La medición con resolución local permite la determinación de la macromolécula en la que se haya hibridizado el nucleotido a1 de prueba. Para ello se puede realizar nuevamente una medición de la fluorescencia, como ya se describió más arriba.

Con la ayuda del transductor 21 “estrechado” se puede generar ahora una onda de superficie, que incida exactamente en el punto 50 de análisis en el que se encuentra el oligonucleotido a1 después de la hibridización. Emitiendo una onda de superficie con una dirección de propagación contraria, pero con la misma frecuencia se puede generar con la ayuda del transductor 23 interdigital un potencial dinámico en el punto del oligonucleotido a1 de prueba. Cuanto más intensa se ala onda de superficie, más intensa será la transmisión del impulso. A partir de una determinada intensidad del potencial dinámico se rompe la unión entre a1 y el correspondiente oligonucleotido A1 captor y el oligonucleotido a1 fluorescente abandona el punto del microarray. De esta manera se puede controlar la fuerza de la unión del oligonucleotido a1 en el punto correspondiente del microarray. La transmisión de la fuerza a la unión puede ser generada con ayuda de las ondas de superficie tanto de manera mecánica, como también eléctrica por medio de los campos eléctricos, que acompañan a la deformación de la superficie de cuerpo sólido. Para elegir un punto 50 de análisis determinado se pueden utilizar, como se expuso más arriba, dos transductores 21, respectivamente 31 interdigitales con direcciones 51, respectivamente 52 de propagación perpendiculares entre sí.

A partir de la fuerza de la unión así caracterizada se puede determinar por ejemplo si el oligonucleotido de prueba y el oligonucleotido captor poseen 19 o 20 pares de bases complementarias.

Una vez finalizado el experimento se puede utilizar le transductor 31 interdigital para generar una onda de superficie con la que se expulse el líquido de la zona 3 de análisis a través de la pista 15 de entrada, respectivamente de evacuación.

En la forma de ejecución según la figura 4 se configura la zona 300 de permanencia con forma de meandro, alineándose los nucleotidos captores a lo largo de esta zona con forma de meandro. La figura 5b muestra un detalle de la zona 300. De las posiciones 5 sólo se representan nuevamente algunas de ellas a título de ejemplo. Con la ayuda del transductor 7 interdigital se puede desplazar la cantidad de líquido a lo largo de esta zona de permanencia con forma de meandro, de manera, que se garantice, que los nucleotidos de prueba del líquido se sitúen muy cerca de los oligonucleotidos captores. Para favorecer el movimiento a lo largo de la zona 300 de permanencia con forma de meandro se pueden prever todavía otros transductores interdigitales no representados.

## ES 2 321 810 T3

Como es obvio, las diferentes formas geométricas, como las representadas a título de ejemplo en las figuras 1 a 4, también pueden ser combinadas entre sí. Finalmente, en cada una de las configuraciones se pueden utilizar transductores interdigitales adicionales para reforzara los efectos según el invento.

5 Cada uno de los diferentes dispositivos puede formar parte de un complejo más grande sobre una superficie de cuerpo sólido sobre la que se hallen varias estaciones de análisis y/o recipientes para líquidos para realizar un red o un "Lab on the chip".

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 321 810 T3

## REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para el análisis de macromoléculas con la ayuda de un microarray sobre el que se hallan en una  
disposición conocida una gran cantidad de primeras macromoléculas al menos distintas en parte, estando dispuesto el  
microarray sobre una superficie (1) de cuerpo sólido plana en la que se defina una zona (3, 30, 300), cuyas propiedades  
de humectación se diferencian de las de la superficie circundante de cuerpo sólido de tal modo, que un líquido con una  
gran cantidad de segundas macromoléculas se ubique con preferencia en ella, no poseyendo la superficie de cuerpo  
sólido para la definición de esta zona surcos o canales y abarcando la zona (3, 30, 300) el microarray, siendo aplicado  
10 el líquido con la gran cantidad de segundas macromoléculas sobre la zona (3, 30, 300) de permanencia preferida así  
definida de la superficie de cuerpo sólido para hacer posible una reacción de las segundas macromoléculas con las  
primeras macromoléculas, siendo eliminado nuevamente al menos ampliamente el líquido de la zona (3, 30, 300)  
de permanencia preferida y detectando con resolución local las segundas macromoléculas remanentes después del  
proceso de eliminación y determinando a partir de la posición de estas segundas macromoléculas remanentes las  
15 primeras macromoléculas que hayan establecido una unión con las macromoléculas de la segunda gran cantidad de  
macromoléculas para determinar así la clase, respectivamente las clases de las segundas macromoléculas contenidas  
en el líquido y/o obtener una información de su naturaleza.

20 2. Procedimiento para el análisis de macromoléculas según la reivindicación 1 en el que se emite en la dirección  
(8, 51, 52) del líquido al menos una onda de superficie, que por medio de la transmisión del impulso al líquido da  
lugar a la distribución definida y/o a la mezcla del líquido sobre la superficie de cuerpo sólido.

25 3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 o 2 en el que las segundas macromoléculas a analizar se  
marcan con un colorante fluorescente o poseen un componente fluorescente y en el que la medición con resolución  
local es una medición de fluorescencia.

30 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3 en el que las segundas macromoléculas a analizar com-  
prenden un grupo funcional con actividad eléctrica o se marcan de esta manera y en el que la medición con resolución  
local es una medición eléctrica.

35 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4 en el que las segundas macromoléculas a analizar se  
marcan de manera radiactiva para su medición con resolución local.

6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5 en el que la gran cantidad de primeras macromoléculas  
comprende oligonucleótidos distintos y/o proteínas distintas y/o antígenos distintos y/o anticuerpos distintos, cuya  
posición en el microarray es conocida.

40 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6 en el que antes, respectivamente después de eliminar el  
líquido de la superficie (1) de cuerpo sólido, respectivamente fuera eliminado de ella, se lanza al menos una onda de  
superficie por encima de la superficie (1) de cuerpo sólido para obtener una información de la fuerza de la unión de  
las segundas macromoléculas con las primeras macromoléculas remanentes del o después del proceso de eliminación.

45 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7 en el que la superficie (1) de cuerpo sólido se somete a  
una onda de superficie para llevar el líquido a la zona del microarray y/o para eliminarlo de ella.

50 9. Utilización del procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8 para el análisis de oligonucleótidos como  
segundas macromoléculas.

55 10. Dispositivo de análisis de macromoléculas para la realización del procedimiento según la reivindicación 2,  
respectivamente de un procedimiento según una de las reivindicaciones 3 a 8, siempre que dependa directa o indirecta-  
mente de la reivindicación 2, con una zona (3, 30, 300) de permanencia preferida sobre una superficie (1) de cuerpo  
sólido plana sobre la que está dispuesto un microarray, poseyendo la zona (3, 30, 300) de permanencia preferida pro-  
piedades de humectación distintas de las de la superficie de cuerpo sólido circundante y no poseyendo la superficie de  
cuerpo sólido canales o surcos para la definición de la zona de permanencia preferida y con al menos un dispositivo  
(7, 19, 21, 23) de generación de ondas de superficie para la emisión de una onda de superficie en la dirección (8, 51,  
52) de la zona (3, 30, 300) de permanencia preferida.

60 11. Dispositivo de análisis de macromoléculas según la reivindicación 10 en el que la zona (300) de permanencia  
preferida se dispone con forma de meandro sobre la superficie (1) de cuerpo sólido.

65 12. Dispositivo de análisis de macromoléculas según la reivindicación 10 en el que la zona (300) de permanencia  
preferida se dispone en forma de cruz sobre la superficie (1) de cuerpo sólido.

Fig. 1

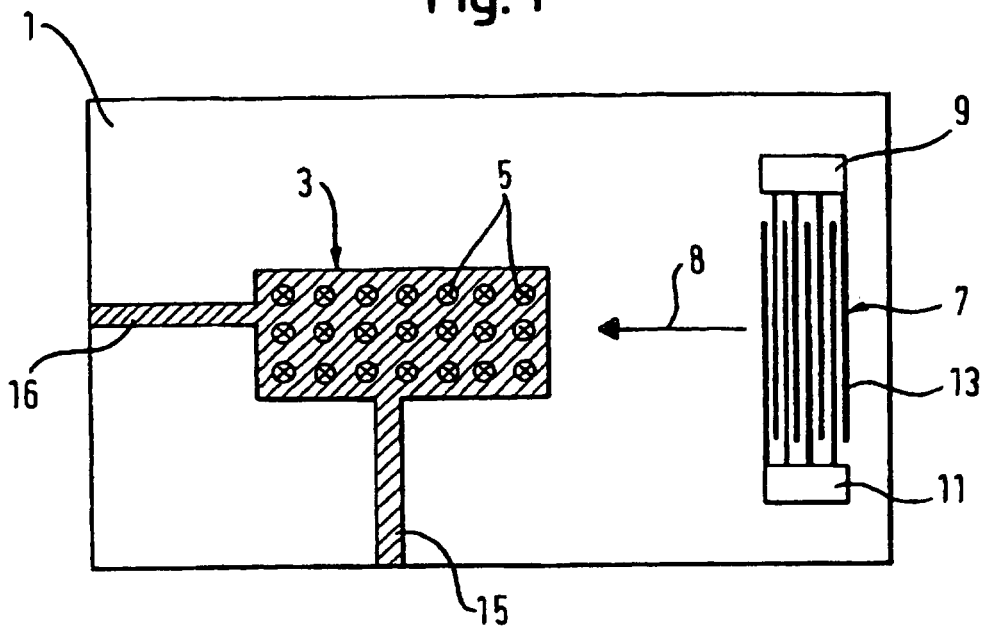


Fig. 5a

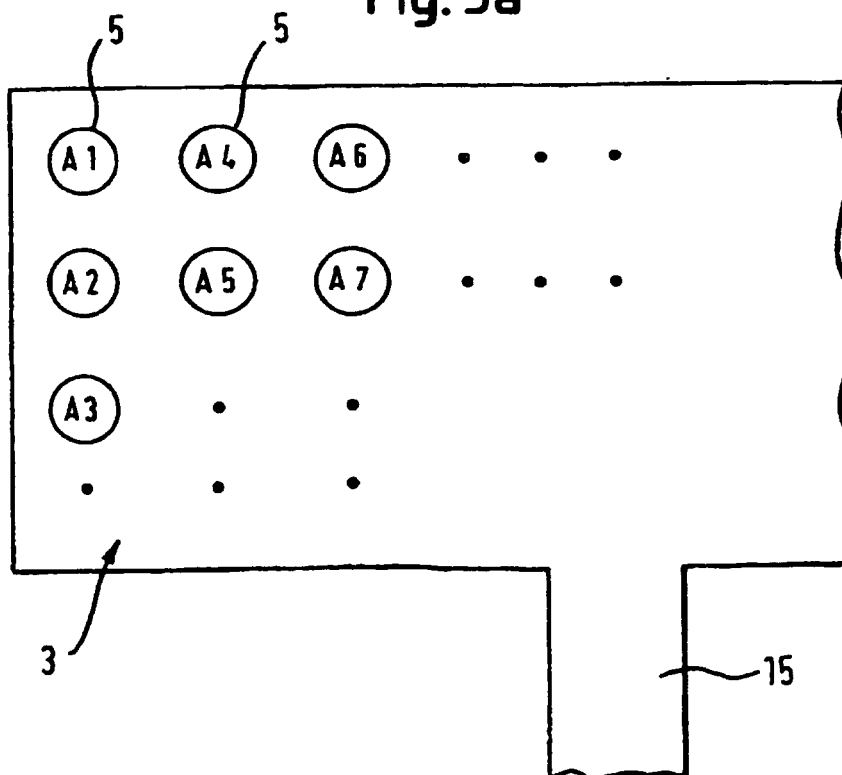


Fig. 2

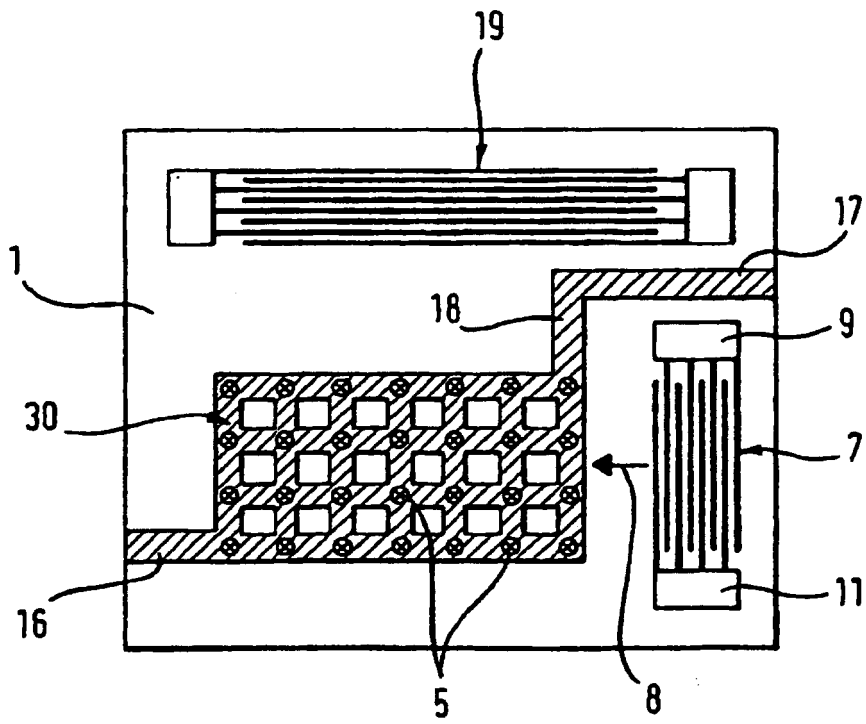


Fig. 3

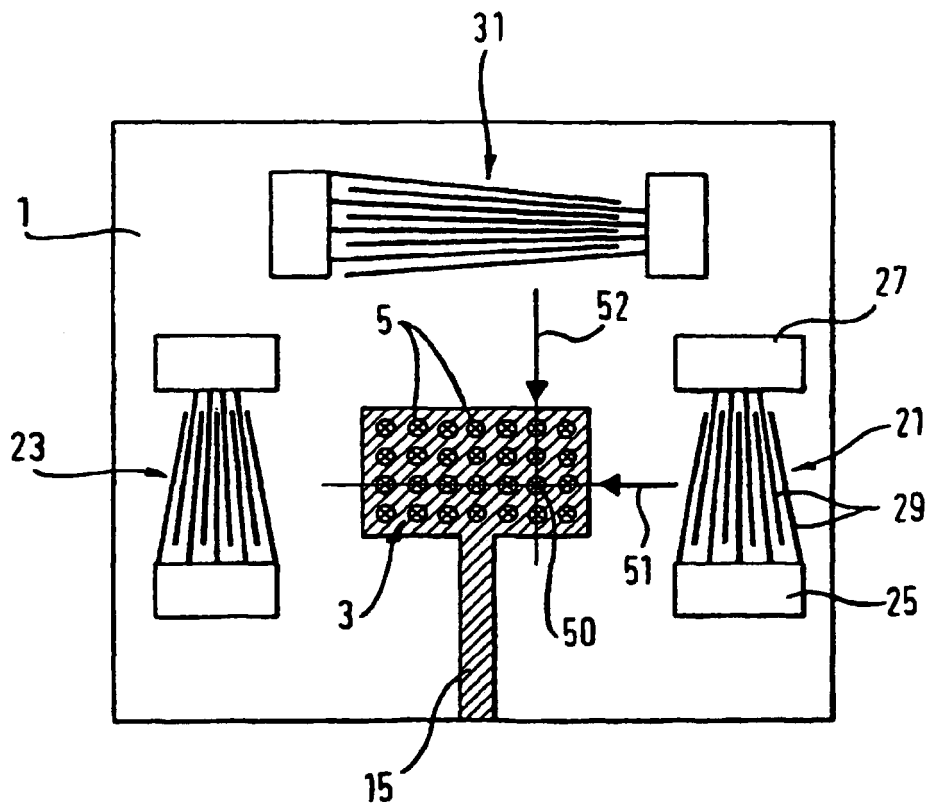


Fig. 4

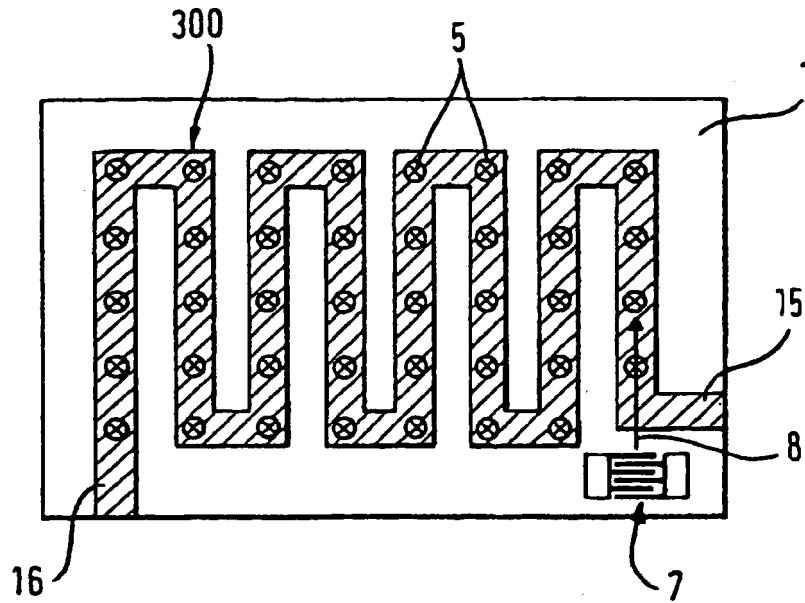


Fig. 5b

