



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 267 828**

51 Int. Cl.:
G01N 33/543 (2006.01)
C08J 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01979987 .3**
86 Fecha de presentación : **10.10.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1362240**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **19.11.2003**

54 Título: **Polímeros que se adsorben sobre superficies y su uso para tratar superficies hidrófobas o hidrófilas.**

30 Prioridad: **10.10.2000 US 239316 P**
28.09.2001 US 326091 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2007

73 Titular/es: **Serono Genetics Institute S.A.**
Route Nationale 7
91000 Evry Cédex, FR

72 Inventor/es: **Sudor, Jan**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 267 828 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

Polímeros que se adsorben sobre superficies y su uso para tratar superficies hidrófobas o hidrófilas.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a métodos para reducir la adsorción de materiales orgánicos (por ejemplo péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, y células), sobre superficies hidrófobas o hidrófilas (por ejemplo, superficies poliméricas). La invención también se refiere a dispositivos, recipientes y aparatos (por ejemplo placas de microtitulación, canales de microfluído y kits), que han sido tratados mediante tales métodos, y los métodos para realizar operaciones de fluidos.

Antecedentes

Los materiales biológicos tales como péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, y células, frecuentemente se almacenan, se transfieren o se hacen reaccionar en dispositivos o aparatos tales como placas de múltiples pocillos, tubos de microcentrífuga y pipetas, hechas de plástico u otros materiales no polares. Es una observación común que los compuestos biológicos se adsorben o se unen a las superficies de dichos dispositivos. Esto es verdad también para los materiales orgánicos que muestran alguna hidrofobia en una solución acuosa, por ejemplo los compuestos de acridinilo, PCBs, etc.

Para muchas aplicaciones, tal unión es no deseable. Por ejemplo, la unión da como resultado la pérdida de materiales valiosos, tales como enzimas o anticuerpos, y puede dar como resultado variaciones en la dispensación de materiales orgánicos, especialmente cuando están implicados volúmenes pequeños. La unión de proteínas, células y plaquetas a superficies hidrófobas es también una preocupación en una variedad de procedimientos de manejo de sangre.

Como resultado de estas consideraciones, se han hecho importantes esfuerzos para proporcionar métodos para reducir la unión de proteínas y otros compuestos orgánicos a diversas superficies. Ejemplos de las aproximaciones que se han considerado pueden encontrarse en Caldwell *et al.*, Patente de EE. UU. N° 5.516.703; Ding *et al.*, Publicación de Solicitud Internacional WO 94/03544; Amiji *et al.*, *Biomaterials*, 13:682-692, 1992; J. Andrade, "Principles of Protein Adsorption", en *Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers*, J. Andrade ed., Volumen 2, Plenum Press, New York, 1-80, 1985; Lee *et al.*, *Polymeric Mater. Sci. Eng.*, 57:613-617, 1987; Lee *et al.*, *Journal of Biomedical Materials Research*, 23:351-368, 1989; Lee *et al.*, *Biomaterials*, 11:455-464, 1990; Lee *et al.*, *Prog. Polym. Sci.*, 20:1043-1079, 1995; Merrill *et al.*, *ASAIO Journal*, 6:60-64, 1983; Okano *et al.*, *Journal of Biomedical Material Research*, 20:1035-1047, 1986; Okkerna *et al.*, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, 1:43-62, 1989; Owens *et al.*, *Journal of Cell Science*, 87:667-675, 1987; Rabinow *et al.*, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, 6:91-109, 1994; Schroen *et al.*, *Journal of Membrane Science*, 80:265-274, 1993; Sheu *et al.*, *J. Adhesion Sci. Technol.*, 6:995-1009, 1992; Shimada *et al.*, *Polymer Journal*, 15:649-656, 1983; y Thurow *et al.*, *Diabetologia*, 27:212-218; 1984.

De particular interés es el tratamiento de dispositivos de pequeños volúmenes de reacción que permiten múltiples reacciones bajo una variedad de condiciones. Tales avances se han hecho en la tecnología de la microfluídica y de las placas de microtitulación, por lo tanto, existe una necesidad de métodos para tratar estos dispositivos para disminuir la contaminación, aumentar los rendimientos de la reacción y ahorrar en reactivos valiosos.

La microfluídica implica utilizar microcanales en lugar de tubos de ensayo o microplacas, para llevar a cabo los análisis y las reacciones. Estos microcanales o microcircuitos están incluidos en silicio, cuarzo, cristal, cerámica o plástico. El tamaño de estos canales está en el orden de micrómetros, mientras que los volúmenes de reacción están en el orden de nanolitros o microlitros. El principio es guiar a los medios de reacción, que contienen reactivos y muestras, hacia las zonas que corresponden a las diferentes etapas del protocolo. La integración de reactores, columnas de cromatografía, sistemas de electroforesis capilar y sistemas de detección en miniatura en estos sistemas de microfluidos, permite la automatización de protocolos complejos mediante su integración en una plataforma única. Estos "laboratorios sobre chips" han hecho posible obtener resultados que son eficientes en términos de velocidad de reacción, en términos de economía de producto y en términos de miniaturización, lo que permite el desarrollo de dispositivos portátiles. Se han obtenido también resultados remarcables para la integración y automatización de protocolos complejos, tales como protocolos bioquímicos o de biología molecular, que frecuentemente requieren numerosas manipulaciones. Estas manipulaciones comprenden en particular mezclar reactivos y muestras, controlar la temperatura de la reacción, llevar a cabo ciclos térmicos y detección. Wolley *et al.*, (*Anal. Chem.*, 68, 4081-4086, 1996), por ejemplo, describe la integración de un microrreactor de PCR, un sistema de electroforesis capilar y un detector, en un único dispositivo. Se ha descrito un dispositivo sobre un chip, que permite la integración de una etapa para mezclar los reactivos y una reacción enzimática, por Hadd *et al.*, (*Anal. Chem.*, 69, 3407-3412, 1997). Este dispositivo proporciona un microcircuito de canales y reservorios dentro de un sustrato de cristal, y el movimiento y la mezcla de los líquidos tiene lugar mediante electrocinética. Se han descrito numerosos sistemas de microfluidos para la integración de protocolos y de análisis, en particular en la solicitud de patente internacional WO 98/45481.

Una de las grandes dificultades para implementar estos dispositivos reside en la elevada adsorción de muestras y reactivos sobre la superficie de los canales durante el movimiento de los líquidos a través de los canales. En general, los dispositivos de microfluidos contienen canales de un intervalo de tamaño de micrómetros, que tienen razones de superficie a volumen grandes (~10-100 veces mayores que una razón de superficie a volumen en las placas de

microtitulación convencionales). Esto lleva a un aumento de la importancia de las propiedades/calidad/química de las superficies en los dispositivos de microfluidos. Al mismo tiempo, las muestras biológicas (por ejemplo, muestras de proteínas, o mezclas de reacción tales como mezclas de PCR, mezclas de LCR, mezclas de microsecuenciación (MIS), etc.), son mezclas complejas de moléculas grandes y pequeñas de diferentes polaridades (por ejemplo, moléculas de DNA y proteína, dNTPs, ddNTPs, marcadores fluorescentes, etc.), que pueden tener una fuerte afinidad por los sustratos sólidos, así como por las interfaces líquido/líquido y líquido/aire. Las proteínas en particular son conocidas por adsorberse de forma importante a los materiales de sílice (Righetti, P.G., ed., 1996, *Capillary Electrophoresis in Analytical Biotechnology*, CRC series in Analytical Biotechnology, CRC Press, Boca Raton). Por estas razones, las superficies de los dispositivos de microfluidos se desactivan antes de que se realicen las reacciones biológicas en tales microestructuras. La desactivación de una superficie reduce la adsorción de materiales orgánicos sobre la superficie. Sin la desactivación de las superficies, las reacciones biológicas generalmente no pueden realizarse sobre microcanales de silicio (sílice) [Shoffner, M.A. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 24: 375-379 (1996) y Chang, j. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 24: 380-385 (1996)].

Se han mostrado varias posibilidades para desactivación de las superficies. Generalmente, la estrategia de desactivación depende del material del que está hecho el dispositivo de microfluidos. Por ejemplo, las superficies de sílice (chips de silicio) pueden hacerse funcionales químicamente, por ejemplo, a través de reacciones de silanización (Snyder, L.R., Kirkland, J.J., *Introduction to modern chromatography*, Wiley-Interscience, 1979, New York; Shoffner, M.A. *et al.*, *Nucleic Acid Res* 24: 375-379 (1996); y Kopp, M. *et al.*, *Science*, 280: 1046-1048 (1998)). Los chips silanizados pueden utilizarse directamente para reacciones biológicas o pueden modificarse posteriormente, mediante la preparación de una cubierta de polímero sobre la superficie.

La desactivación de las superficies utilizando cubiertas incluye dos aproximaciones: cubiertas covalentes y no covalentes. La estabilidad de las cubiertas covalentes, algunas de las cuales son denominadas brochas de polímero, y de las capas de polímero adsorbido depende de tres factores: (a) la estabilidad química de la superficie, (b) la estabilidad de la interacción polímero-superficie, y (c) la estabilidad química del polímero que se utiliza para una modificación de la superficie. Generalmente, con respecto a la estabilidad de una única interacción polímero/superficie (a), un puente covalente (cubierta covalente) es más estable que una interacción polímero/superficie no covalente (una fracción de una unidad $k_{\beta}T$, donde k_{β} es la constante de Boltzman y T es la temperatura) en las capas de polímero adsorbido. Sin embargo, debido al gran número de segmentos (a veces más del 10% del número total de segmentos/monómeros en un polímero) que interactúan con una superficie en las capas de polímero adsorbido, la energía total de adsorción por una única molécula de polímero puede ser muy grande, alcanzando varias unidades $k_{\beta}T$ y ocasionando así que la adsorción del polímero sea virtualmente irreversible.

Las cubiertas covalentes han implicado el crecimiento de una cadena de polímero de una superficie de sílice hecha funcional [Hjerten, S., *J. Chromatogr.*, 347, 191-198 (1985); y Cobb, K.A. *et al.*, *Anal. Chem.*, 62: 2478-2483 (1990)], y/o la inserción de una cadena de polímero sobre una superficie de sílice [Herren, B.J. *et al.*, *J. Colloid Interface Sci.*, 115:46 (1987); y Balachander, N. *et al.*, *Langmuir* 6:1621 (1990), Burns, N.L. *et al.*, *Langmuir* 11:2768 (1995)]. La desactivación de la superficie a través de reacciones químicas implica la formación de uniones covalentes entre grupos funcionales sobre una superficie (-OH) y un reactivo silano o una molécula de polímero hecha funcional [por ejemplo, un polietilén-glicol (PEG) silanizado]. Esta modificación química de superficies, llevada a cabo frecuentemente en disolventes orgánicos, consume tiempo y requiere varias etapas sintéticas antes de completarse. Así, esta estrategia de desactivación de superficies es generalmente cara y no está bien adaptada para modificar grandes cantidades de chips de una manera sencilla. Las uniones químicas covalentes (especialmente los puentes "-Si-O-X"), son susceptibles a la hidrólisis (por ejemplo, a un pH alcalino), que degrada las cubiertas covalentes a lo largo del tiempo [Cobb, K.A. *et al.*, *Anal. Chem.*, 62, 2478-2483 (1990)]. Como estas cubiertas no pueden regenerarse fácilmente, la vida de dichas superficies, y consecuentemente la de los dispositivos completos, es finita y la reproducibilidad día a día de la calidad de una superficie en un dispositivo de microfluidos modificada químicamente es pobre. Además, es difícil mantener una reproducibilidad lote a lote, debido a, por ejemplo, las impurezas de la superficie y/o el control de la humedad de los disolventes orgánicos utilizados.

Otra posibilidad para desactivar una superficie de microfluidica con una cubierta no covalente, es la adsorción de albúmina sérica bovina (BSA) sobre una superficie. La BSA se ha utilizado con éxito para desactivaciones de superficie en chips de PCR [Northrup, M.A., *Anal. Chem.*, 70: 918-922 (1998); Waters, L.C. *et al.*, *Anal. Chem.*, 70: 158-162 (1998); y Waters, L.C. *et al.*, *Anal. Chem.*, 70:5172-5176 (1998)]. La BSA se adsorbe sobre sílice, satura los lugares de adsorción de la superficie, y permite la realización de reacciones biológicas en dispositivos con altas relaciones superficie a volumen. Sin embargo, la BSA se desnaturaliza a temperaturas superiores a 55-65°C y, consecuentemente, puede coagularse y formar agregados grandes (dependiendo de la concentración de BSA) [Wetzel, R. *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 104: 469-478 (1980); y Oakes, J., *J. Chem. Soc. Faraday*, 172: 228-237 (1976)]. Esta coagulación (desnaturalización) de la BSA a una temperatura elevada es irreversible, es decir, la BSA no se vuelve a disolver en soluciones acuosas cuando se disminuye la temperatura. Cuando las reacciones biológicas se realizan de un modo estático (no en un flujo líquido), por ejemplo en micro-pocillos, la superficie de desactivación mediante BSA es robusta, y funciona bien [Northrup, M.A., *Anal. Chem.* 70: 918-922 (1998), Waters, L.C., *Anal. Chem.*, 70: 158-162 (1998); y Waters, L.C., *Anal. Chem.*, 70: 5172-5176 (1998)]. Sin embargo, cuando las reacciones biológicas se llevan a cabo en un flujo (es decir, hay un estrés de rozamiento que no es cero en la interfaz sólido/líquido) y en canales pequeños, los agregados grandes de BSA pueden ser arrastrados corriente abajo en una solución y, eventualmente, bloquear un microcanal o un capilar. Así, la desventaja de utilizar BSA para la desactivación de superficies en dispositivos de microfluidos, en los

que los reactivos se transportan de un lugar a otro mediante un flujo líquido, es el cambio en la solubilidad de la BSA en un intervalo de temperatura utilizado comúnmente para reacciones biológicas (PCR, LCR, MIS, etc.).

5 Shoffner *et al.*, Nucleic Acids Research, 1996, Vol. 24, Nº 2, páginas 375-379, describen la pasivación de una superficie de chips microfabricados de cristal de silicio para PCR. La pasivación de los chips de PCR utilizando un agente de silanización, seguida de un tratamiento con polímero (con poli-alfa-alanina; poli-L-ácido aspártico, poliglicina, poli-L-leucina, poli-DL-fenilalanina, poli-DL-triptófano, poli-L-lisina, polivinilpirrolidona, ácido poliadenílico, o polimaldimida), aparentemente da como resultado una amplificación buena, pero inconsistente. Sin embargo, ninguna de las mezclas de PCR (véase página 376 de ese mismo documento) contiene ningún polímero. Es más, los dispositivos son recubiertos con polímero *antes* de que la reacción de PCR tenga lugar - véase, por ejemplo, la sección titulada "Surface Treatments of Silicon Powder", que abarca las páginas 375 y 376. El polímero *no* se añade directamente a la muestra de fluido que contiene los reactivos. En lugar de esto, el dispositivo en el que se va a tener lugar la reacción es tratado y/o recubierto con el polímero *antes* de que la reacción se lleve a cabo.

15 El Documento EP-A-1 016 864 (Affymetrix Inc) describe procedimientos para la microfabricación de dispositivos para PCR-CE de pequeño volumen completamente integrados, hechos de cristal o materiales similares. Para su uso, los dispositivos utilizan una cubierta de superficie de poliacrilamida lineal, junto con la adición de BSA a la solución de tampón de amplificación. Véase el párrafo [0011] en la página 2 de ese mismo documento. Aunque el dispositivo (un chip de PCR) esta recubierto con polímero, la poliacrilamida no se añade directamente a la solución de tampón de amplificación. La BSA solo está presente en la solución de tampón de amplificación. El polímero *no* se añade directamente en la muestra de fluido que contiene los reactivos. En su lugar, el dispositivo en el que la reacción va a tener lugar se trata y/o se recubre con el polímero *antes* de que la reacción se lleve a cabo.

25 Amiji *et al.*, Biomaterials, 1992, Vol. 13, Nº 10, páginas 682-692, describen la utilización de una polidimetilacrilamida (PDMA) de cadena corta, para formar una cubierta dinámica sobre la superficie interna de los capilares utilizados para electroforesis, para suprimir el flujo electro-osmótico y las interacciones DNA-pared capilar. Específicamente, la superficie de un capilar es recubierta utilizando una solución de PDMA como un medio tamizador (véase, por ejemplo, la página 188, columna izquierda, líneas 25-35). Los capilares son primero enjuagados con solución de PDMA, y después las muestras se inyectan en los capilares (véase página 191, columna izquierda, líneas 8-17). Entre carreras, los capilares se enjuagan con agua y después con PDMA. El polímero *no* se añade directamente a la muestra de fluido que contiene los reactivos. En su lugar, el dispositivo en el que la reacción va a tener lugar se trata y/o se recubre con el polímero *antes* de que la reacción se lleve a cabo. Adicionalmente, en ninguna parte de este documento se describe ningún método en el que las muestras y/o las zonas de separación contienen el polímero (PDMA); en su lugar, este documento solo enseña métodos en los que un microcanal se recubre con PDMA *antes* de inyectar las zonas de separación y/o las zonas de muestra de fluido.

40 Ren *et al.*, Analytical Biochemistry, 1999, Vol. 276, Nº 2, páginas 188-194, describen la prevención de la adsorción de proteína y la adhesión de plaquetas sobre superficies, mediante copolímeros de tri-bloque de PEO/PPO/PEO (polímeros Pluronic[®]). Las superficies (cubre portaobjetos de cristal DDS o película LDPE) se tratan con polímero Pluronic[®], se dejan permanecer, y después se aclaran antes de permitir a las plaquetas extenderse sobre las superficies tratadas con Pluronic[®]. El polímero *no* se añade directamente a la muestra de fluido que contiene las plaquetas. En su lugar, las superficies se tratan y/o se recubren con el polímero *antes* de añadir las plaquetas.

45 Aunque hasta el momento se ha discutido la utilización de polímeros para prevenir la adsorción de muestras y reactivos a las superficies de microfluidos, pueden aplicarse las mismas técnicas a otras superficies, tales como superficies hechas de silicio, cuarzo, cristal, cerámica o plástico (polimérico), y otras interfaces (es decir, interfaces líquido/líquido y líquido/aire). Estas superficies pueden incluir, pero no se limitan a, las superficies de aparatos utilizados para almacenamiento, dispensación, o reacción de muestras de fluido, tales como tubos de ensayo, placas de multipocillos, pipetas, puntas de pipeta, placas de microtitulación, pocillos de reacción o tubos de microcentrífuga.

50 Dichas técnicas de tratamiento tienen una particular aplicación para las placas de microtitulación, porque éstas se utilizan para reacciones biológicas que requieren frecuentemente etapas sucesivas en el mismo pocillo de reacción, en pequeños volúmenes. Por ejemplo, el proceso de genotipaje mediante el método de extensión de base única, requiere tres reacciones biológicas sucesivas (es decir, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), purificación enzimática y microsecuenciación (MIS)). Así, es eficaz y beneficioso realizar dos o más reacciones sucesivas en el mismo pocillo de una única placa de microtitulación. En tales casos, debe asegurarse que no existe contaminación entre las reacciones, y que las biomoléculas de las reacciones previas no contaminan las reacciones subsiguientes. Sin embargo, esto ha demostrado ser difícil de conseguir debido a la elevada adsorción de biomoléculas residuales sobre las superficies de la placa de microtitulación, o a la elevada concentración de tales moléculas en las interfaces líquido/líquido o líquido/aire.

60 Muchos aparatos, tales como las placas de microtitulación son no polares, mientras que las biomoléculas (por ejemplo las muestras de proteína, o las mezclas de reacción tales como los reactivos de PCR y MIS), son mezclas complejas de moléculas grandes y pequeñas de diferentes polaridades (por ejemplo, moléculas de DNA y proteína, dNTPs, ddNTPs, marcadores fluorescentes, etc.), que frecuentemente tienen una potente afinidad por los sustratos sólidos. La adsorción de las biomoléculas sobre la superficie de la placa de microtitulación hace que esas biomoléculas no sean accesibles o sean menos accesibles a las enzimas durante las reacciones biológicas.

Un problema comúnmente encontrado es la adsorción de desoxinucleótidos (dNTPs) sobre la superficie de las placas de microtitulación, particularmente durante los procesos de genotipaje. La adsorción de los dNTPs añadidos durante la primera etapa de un procedimiento de genotipaje (es decir, la PCR) sobre la superficie de una placa de microtitulación, los hacen menos accesibles a la fosfatasa alcalina de gamba (SAP) durante las etapas posteriores (es decir, la purificación enzimática), y los dNTPs adsorbidos no son desfosforilados. Como los dNTPs se liberan de la superficie de una placa de microtitulación a temperaturas elevadas (por ejemplo, durante la desnaturalización de las enzimas EXO y SAP o durante los ciclos de temperatura de las reacciones MIS), ellos pueden contaminar dramáticamente la tercera etapa del proceso de genotipaje (es decir, la MIS). Como resultado, el producto oligonucleótido de la MIS puede extenderse más de una base (dNTPs); así los ddNTPs específicos de un SNP, marcados fluorescentemente, pueden incorporarse incorrectamente en el producto oligonucleótido varias bases aguas abajo del lugar SNP de interés. Consecuentemente, esto puede llevar a errores en el genotipaje (por ejemplo, una muestra homocigota puede aparecer como heterocigota), cuando se emplea una técnica de detección sin capacidad de discriminación de tamaño. Sin embargo, la prolongación adicional de un oligonucleótido de MIS por los dNTPs retenidos en una PCR, produce una disminución de una señal específica que puede ser una desventaja para cualquier técnica de detección empleada.

Otra desventaja relacionada con la adsorción de biomoléculas sobre la superficie de una placa de microtitulación, es la disminución del rendimiento de las reacciones biológicas. La adsorción de biomoléculas valiosas da como resultado una disminución del rendimiento del producto deseado. En un esfuerzo para evitar la pérdida de reactivos por la adsorción, frecuentemente se aumentan las concentraciones de los reactivos, para saturar los lugares de adsorción sobre las superficies de la placa. Sin embargo, esta no es una solución económica para prevenir la adsorción.

Una posibilidad para prevenir la contaminación, es transferir las muestras a una nueva placa de microtitulación entre las dos reacciones sucesivas. En el caso de un proceso de genotipaje, la PCR se lleva a cabo en una placa de microtitulación, y la purificación enzimática seguida de la MIS se lleva a cabo en otra placa de microtitulación. Sin embargo, este método de prevenir la contaminación no es completamente efectivo, ya que alrededor del 10% de las reacciones de MIS están todavía contaminadas por los dNTPs sobrantes de las reacciones de PCR (datos de Genset, Departamento de Análisis Genómicos). Esta contaminación se hace más evidente cuando las reacciones se llevan a cabo en volúmenes muy pequeños (por ejemplo, placas de alta densidad), ya que el número de interacciones de moléculas de la solución a granel con las superficies aumenta rápidamente cuando el volumen de reacción disminuye. Además, es técnicamente más conveniente y más barato utilizar un método que no requiera la transferencia de las muestras a una nueva placa de microtitulación.

Existe por lo tanto una necesidad de un método de desactivar las superficies que proporcione buena reproducibilidad día a día de la calidad de una superficie en el mismo chip, placa de microtitulación u otra superficie, que proporcione una superficie estable a las temperaturas relevantes para las aplicaciones biológicas, y que no incluya procesos de síntesis complicados y caros.

Sumario de la invención

La invención proporciona métodos para utilizar polímeros para adsorción competitiva a una superficie, para disminuir la adsorción de materiales orgánicos (por ejemplo biomoléculas) de muestras de fluido (por ejemplo acuosas) sobre dichas superficies. Alternativamente, la invención proporciona métodos de utilización de polímeros para disminuir la adsorción de materiales orgánicos sobre interfaces líquido/aire o líquido/líquido. Dichas superficies pueden estar hechas de silicio, cuarzo, cristal, cerámicas o plásticos tales como por ejemplo, poliestireno, polipropileno, metacrilato de polimetilo, cloruro de polivinilo, polietileno, policarbonato, polisulfona, fluoropolímeros, poliamidas, polimetilsiloxanos, poliuretano, polisulfona, politetrafluoroetileno, y elastómeros. Estas superficies pueden incluir, pero no se limitan a, las superficies de aparatos tales como los dispositivos o recipientes utilizados para el almacenamiento, dispensación, o reacción de muestras de fluido. Tales aparatos comprenden, pero no se limitan a, tubos de ensayo, placas de multipocillos, pipetas, puntas de pipeta, placas de microtitulación, pocillos de reacción, microcanales, aparatos de microfluidos, capilares y tubos de microcentrífuga. La invención además incluye métodos para realizar operaciones de fluidos sobre dichas superficies, de tal forma que la adsorción de materiales orgánicos en una muestra de fluido se minimice mediante la introducción de polímeros de adsorción a superficie. Las operaciones de fluidos incluyen, pero no se limitan a, reacciones, incubaciones, diluciones, titulaciones, detecciones, purificaciones, mezclas, ensayos de unión, ensayos de cribado de fármacos, y ensayos de mediciones (por ejemplo mediciones de cinética). También se prefieren operaciones de fluido que incluyen una enzima. Las muestras de fluido incluyen, pero no se limitan a, mezclas de reacción, tales como mezclas de PCR, mezclas de LCR, mezclas de reacción de extensión de cebador y mezclas de reacción de genotipaje (por ejemplo, mezcla de microsecuenciación). Las muestras de fluido preferidas son las muestras de fluido acuosas. Los materiales orgánicos incluyen biomoléculas, tales como ácidos nucleicos (por ejemplo DNA, RNA, polinucleótidos, oligonucleótidos, nucleótidos, dNTPs tales como dATP, dTTP, dCTP, dGTP, y ddNTPs tales como ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP), aminoácidos (por ejemplo proteínas, polipéptidos, péptidos, aminoácidos tales como aspartato, glutamato, lisina, arginina, histidina, alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, metionina, triptófano, prolina, serina, treonina, asparagina, glutamina, glicina, cisteína y tirosina), lípidos, compuestos químicos (por ejemplo marcadores fluorescentes), y más específicamente receptores o anticuerpos y sus ligandos, células y factores de crecimiento, inhibidores de crecimiento, enzimas y sustratos. Preferiblemente, las biomoléculas pueden comprender mezclas complejas de moléculas grandes y pequeñas de diferentes polaridades, tales como las moléculas listadas anteriormente, que pueden tener una potente afinidad por varias superficies. Cualquier tipo o especie de superficies, aparatos, operaciones de fluidos o materiales orgánicos listados anteriormente, puede ser específicamente incluido o excluido de las realizaciones de la invención.

Los métodos de la invención también se refieren a realizaciones que permiten la regeneración dinámica de superficies en las que las muestras de fluido corren secuencialmente en un aparato, tal como un dispositivo o recipiente (por ejemplo, un microcanal). Además, los métodos de la invención se refieren a realizaciones que permiten operaciones de fluidos posteriores, que pueden llevarse a cabo secuencialmente sobre la misma superficie, de tal forma que la contaminación se minimiza y los rendimientos de las reacciones se maximizan.

La introducción de polímeros de adsorción a superficie, que se unen no covalentemente a una superficie, previene la adsorción no deseable de materiales orgánicos sobre la superficie, reduciendo así la contaminación, y aumentando los rendimientos de la reacción. Preferiblemente, la superficie es de polaridad menor que la polaridad de una muestra de fluido acuosa. Tales cubiertas no covalentes tienen varias ventajas importantes con respecto a las cubiertas químicas (covalentes), utilizadas en las operaciones de fluidos: los métodos de desactivación no covalentes no implican síntesis química complicada y que consume mucho tiempo, y por lo tanto son baratos y están bien adaptados para modificar de una manera sencilla grandes cantidades de aparatos para almacenamiento, dispensación o reacción de muestras de fluido.

En un primer aspecto, la invención abarca un método para disminuir la adsorción de un material orgánico sobre una superficie, que comprende: a) añadir una muestra de fluido que contiene dicho material orgánico y un polímero de adsorción a superficie a dicha superficie. En una realización preferida, la superficie está hecha de silicio, cuarzo, cristal o plástico (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, metacrilato de polimetilo, cloruro de polivinilo, polietileno, policarbonato, polisulfona, fluoropolímeros, poliamidas, polidimetilsiloxanos, poliuretano, polisulfona, politetrafluoroetileno, y elastómeros). Además, el material orgánico es una mezcla compleja de moléculas grandes y pequeñas de diferentes polaridades tales como las biomoléculas listadas anteriormente, que pueden tener una potente afinidad por la superficie del aparato. Una muestra de fluido puede comprender una mezcla de reacción, tal como una mezcla de reacción de PCR, una mezcla de LCR, una mezcla de reacción de extensión de cebador o una mezcla de reacción de genotipaje (por ejemplo, mezcla de microsecuenciación (MIS)). El polímero de adsorción a superficie es un copolímero de bloque que contiene óxidos de polipropileno y óxidos de polietileno.

En otro aspecto, la invención abarca un método para disminuir la adsorción de material orgánico sobre una superficie que comprende: (a) obtener una muestra de fluido que contiene un material orgánico; (b) añadir una cantidad efectiva de un polímero de adsorción a superficie a dicha muestra de fluido; (c) poner en contacto dicha muestra de fluido que contiene dicho material orgánico y dicho polímero de adsorción a superficie, con una superficie; y (d) llevar a cabo una o más operaciones de fluidos. Las muestras de fluido preferidas no contienen normalmente ningún polímero de adsorción a superficie de la presente invención, antes de que se lleve a cabo uno de los métodos de la invención. Alternativamente, las muestras de fluido pueden contener normalmente un polímero de adsorción a superficie de la presente invención antes de la realización de uno de los métodos de la invención. Las operaciones de fluidos preferidas son operaciones de fluido que no incluyen normalmente ningún polímero de adsorción a superficie de la presente invención. Otras operaciones de fluidos preferidas son reacciones en las que dicho polímero de adsorción a superficie no es uno de los reactivos, o en las que dicho polímero de adsorción a superficie no tiene efecto activador o inhibidor sobre los reactivos. Otras operaciones de fluido todavía preferidas son reacciones en las que dicho polímero de adsorción a superficie no es necesario para que la reacción ocurra. Alternativamente, el polímero de adsorción a superficie puede ser uno de los reactivos de la operación de fluido. Alternativamente, el polímero de adsorción a superficie se añade en exceso, en masa o en polaridad, comparado con lo que sería necesario o utilizado normalmente para llevar a cabo una operación de fluido. Preferiblemente, el polímero de adsorción a superficie está en al menos un exceso de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, ó 10.000 veces más que lo que sería necesario para llevar a cabo la reacción en la que el polímero de adsorción a superficie es un reactivo, o a la cantidad normalmente utilizada cuando el polímero de adsorción a superficie no es un reactivo. En una realización preferida, dicha superficie es parte de un aparato que se utiliza para almacenamiento, dispensación o reacción de muestras de fluido, y puede incluir, pero no se limita a, un microcanal, un tubo de ensayo, una placa de multipocillos, una pipeta, una punta de pipeta, una placa de microtitulación, un pocillo de reacción, un microcanal o un tubo de microcentrífuga.

Todavía en otro aspecto, la invención abarca un método para disminuir la adsorción de un material orgánico sobre la superficie de un aparato, que comprende: (a) proporcionar un aparato que contiene o que consiste esencialmente en una superficie; (b) añadir una muestra de fluido que contiene dicho material orgánico y un polímero de adsorción a superficie a dicho aparato, donde dicho polímero de adsorción a superficie es capaz de unirse no covalentemente a dicha superficie; y (c) llevar a cabo una o más operaciones de fluido en el mismo dicho aparato.

En otro aspecto, la invención abarca un método para seleccionar la cantidad de un polímero de adsorción a superficie que se añade a una operación de fluido, que comprende las etapas de: (a) proporcionar un aparato que contiene o consiste esencialmente en una superficie; (b) añadir una muestra de fluido que contiene un material orgánico y un polímero de adsorción a superficie a dicho aparato, donde dicho polímero de adsorción a superficie es capaz de unirse no covalentemente a dicha superficie; (c) llevar a cabo una o más operaciones de fluido en el mismo dicho aparato; y (d) seleccionar la cantidad óptima de dicho polímero de adsorción a superficie capaz de obtener el rendimiento más alto. Preferiblemente, dicha superficie tiene menor polaridad que la polaridad de la muestra de fluido. Preferiblemente, dicha operación de fluido es una PCR.

En otro aspecto, la invención abarca un método para seleccionar la cantidad de un polímero de adsorción a superficie que se añade a una operación de fluido, que comprende las etapas de: (a) proporcionar un aparato que contiene o consiste esencialmente en una superficie; (b) añadir una muestra de fluido que contiene un material orgánico y un

ES 2 267 828 T3

polímero de adsorción a superficie a dicho aparato, donde dicho polímero de adsorción a superficie es capaz de unirse no covalentemente a dicha superficie; (c) realizar una o más operaciones de fluido en el mismo dicho aparato; y (d) seleccionar la cantidad óptima de dicho polímero de adsorción a superficie para disminuir la adsorción o la contaminación al máximo. Opcionalmente, dicha contaminación de las operaciones de fluido posteriores da como resultado la presencia de dNTPs no deseados, debido a la adsorción a una superficie. Preferiblemente, dicha superficie tiene una polaridad menor que la polaridad de dicha muestra de fluido. Preferiblemente, dicha operación de fluido es una microsecuenciación, y dicha contaminación o adsorción se detecta por la presencia de artefactos de secuenciación.

En otro aspecto, la invención abarca un kit, que contiene: (a) una muestra de fluido para llevar a cabo una operación de fluido; (b) un polímero de adsorción a superficie en una solución acuosa; y (c) una nota que recomienda la cantidad de dicho polímero de adsorción a superficie que debería añadirse a la muestra de fluido. Opcionalmente, dicho kit contiene también un aparato que consiste esencialmente en una superficie. Opcionalmente, dicho polímero de adsorción a superficie está contenido en la mezcla de reacción. Preferiblemente, la cantidad recomendada de dicho polímero de adsorción a superficie que debe añadirse a la muestra de fluido se selecciona utilizando uno de los métodos de la presente invención. Preferiblemente, dicho kit es un kit de genotipaje.

Todavía en otro aspecto, la invención abarca una mezcla de reacción para realizar operaciones de fluido, donde dicha mezcla de reacción contiene un polímero de adsorción a superficie de la presente invención, y donde la cantidad de dicho polímero de adsorción a superficie que está contenido en dicha mezcla de reacción se selecciona utilizando los métodos de la presente invención. Preferiblemente, la mezcla de reacción es una mezcla de reacción de PCR, una mezcla de LCR, una mezcla de reacción de extensión de cebador o una mezcla de reacción de genotipaje (por ejemplo, una mezcla de microsecuenciación (MIS)).

En las realizaciones preferidas, la invención abarca un método de mantener o regenerar dinámicamente la cubierta de polímero adsorbido sobre la superficie de un microcanal, que comprende: (a) proporcionar un canal dispuesto en un sustrato; (b) introducir en dicho canal al menos dos zonas de muestra de fluido, donde cada una de dichas dos zonas de muestra de fluido contiene una muestra de fluido de interés; y (c) proporcionar al menos una zona de separación de fluidos, localizada entre dos de dichas zonas de muestra de fluido, donde dicha al menos una zona de separación de fluidos o al menos una zona de muestra de fluido, contiene un polímero de adsorción a superficie capaz de unirse no covalentemente a una superficie de dicho canal. Opcionalmente, al menos una zona de muestra de fluido contiene un polímero de adsorción a superficie. Opcionalmente, al menos una zona de separación de fluidos contiene un polímero de adsorción a superficie. Opcionalmente, al menos dos zonas de muestra de fluido están sustancialmente libres de dicho polímero de adsorción a superficie. Opcionalmente, al menos una zona de separación de fluidos y al menos una zona de muestra de fluido contienen un polímero de adsorción a superficie. Opcionalmente, cada una de dichas zonas de muestra de fluido contiene un polímero de adsorción a superficie. Opcionalmente, cada zona de separación de fluidos contiene un polímero de adsorción a superficie. Opcionalmente, cada zona de separación de fluidos y cada zona de muestra de fluido contiene un polímero de adsorción a superficie. Opcionalmente, al menos cualquier número entero entre 1 y 100 de zonas de muestra de fluido se proporcionan en un canal, donde cada número entero puede estar específicamente incluido o excluido de las realizaciones de la presente invención. Opcionalmente, al menos una zona de muestra de fluido y dicha al menos una zona de separación de fluidos están fluyendo en el canal.

En otros aspectos, la invención abarca un método para tratar la superficie de un microcanal, que comprende: (a) proporcionar un canal dispuesto en un sustrato; (b) introducir en dicho canal una primera zona de fluido, donde dicha primera zona de fluido contiene un polímero de adsorción a superficie capaz de unirse no covalentemente a la superficie de dicho canal; y (c) introducir secuencialmente en dicho canal una segunda zona de fluido que contiene una muestra de fluido de interés, donde dicha segunda zona de fluido está sustancialmente libre de dicho polímero de adsorción a superficie cuando se introduce en dicho canal. La superficie se refiere a la interfaz entre el microcanal y la zona de fluido.

En todavía otros aspectos, la invención abarca un método para mantener o regenerar dinámicamente la cubierta de polímero adsorbida sobre la superficie de un microcanal, que comprende: (a) proporcionar un canal dispuesto en un sustrato; y (b) introducir en dicho canal al menos dos zonas de muestra de fluido, donde cada una de dichas al menos dos zonas de muestra de fluido, contiene un polímero de adsorción a superficie capaz de unirse no covalentemente a la superficie de dicho canal.

En las realizaciones preferidas de la invención, se proporcionan al menos 2 zonas de fluido o zonas de muestra de fluido en un canal individual. En las realizaciones particularmente preferidas, se proporcionan al menos cualquier número entero entre 5 y 1000 de zonas de fluido o zonas de muestra de fluido, en un canal individual. Preferiblemente, las zonas de fluido o zonas de muestra de fluido adyacentes se separan por al menos una zona de separación de fluidos.

Cuando las muestras de fluido y el polímero de adsorción a superficie van a ser proporcionados en presencia las unas del otro, pueden introducirse las muestras de fluido y las soluciones de polímero en un aparato de la invención, bien como una mezcla, o bien separadamente; las muestras y los polímeros introducidos separadamente, pueden mezclarse en el aparato.

En las realizaciones preferidas, la solución de polímero fluye a través del canal. Preferiblemente, como se describirá más adelante, la solución de polímero se hace fluir a través del canal en forma de flujo continuo. En los métodos más preferidos, el movimiento de un fluido tal como una solución, una zona de muestra de fluido o una zona de separación

ES 2 267 828 T3

de fluidos, en un canal, se efectúa mediante gradiente de presión. Opcionalmente, el movimiento de dicha solución se efectúa mediante un sistema electro-osmótico, electrocinético, electro-hidrodinámico o de gradiente de temperatura.

5 En más aspectos, la invención se refiere a un método para realizar una operación de fluido en un aparato, que comprende: (a) introducir una solución que contiene un polímero de adsorción a superficie en el aparato, de tal forma que el polímero se adsorba no covalentemente sobre la superficie del aparato; (b) introducir una muestra de fluido en dicho aparato; y (c) llevar a cabo una operación de fluido en dicho aparato. Preferiblemente, dicho aparato es una placa de microtitulación o un aparato de microfluidos.

10 La invención también abarca microcanales y dispositivos de microfluidos que contienen canales tratados según los métodos de la invención. Específicamente, la invención se refiere a un canal o a un dispositivo de microfluidica que contiene un sustrato y al menos un canal dispuesto en dicho sustrato, donde el canal ha adsorbido no covalentemente un polímero de adsorción a superficie según la invención. Preferiblemente, el canal tiene una anchura entre alrededor de 1 μm y alrededor de 3 mm. Preferiblemente, dicho sustrato consiste esencialmente en silicio, cuarzo, cristal, 15 cerámica o plástico tal como, por ejemplo, poliestireno, polipropileno, metacrilato de polimetilo, cloruro de polivinilo, polietileno, policarbonato, polisulfona, fluoropolímeros, poliamidas, polidimetilsiloxanos, poliuretano, polisulfona, politetrafluoroetileno, y elastómeros.

20 Los dispositivos de microfluidica de la invención pueden además contener medios para crear un gradiente de presión a lo largo de dicho canal, afectando de esta forma al movimiento del fluido en dicho canal, y/o medios de regulación de la temperatura, para controlar la temperatura del fluido en dicho canal.

25 Los métodos de la invención además comprenden realizar al menos una operación de fluido en dicho canal y/o dicho dispositivo. Los métodos de la invención son particularmente adecuados para realizar operaciones de fluido secuenciales. Los métodos de la invención pueden comprender realizar al menos cualquier número entero entre 2 y 1000 operaciones de fluido en un canal o aparato.

30 En otro aspecto, la invención abarca la utilización de un polímero de adsorción a superficie en una muestra de fluido para realizar una operación de fluido en un aparato. Opcionalmente, dicha etapa de realización de una operación de fluido comprende realizar una operación seleccionada de un grupo que consiste en una reacción, incubación, dilución, titulación, purificación, detección y ensayo de cribado de fármaco, ensayos de unión, y ensayos de mediciones (por ejemplo, mediciones de cinética).

35 En más realizaciones preferidas de los métodos, sistemas y aparatos de la invención, una *muestra de fluido* o *muestra de fluido de interés* contiene al menos un analito de ensayo o un reactivo. Más preferiblemente, una muestra de fluido contiene un *material orgánico*. Preferiblemente, dicho material orgánico es una *biomolécula*, donde dicha biomolécula puede seleccionarse de un grupo que consiste en ácidos nucleicos (por ejemplo, DNA, RNA, polinucleótidos, oligonucleótidos, nucleótidos, dNTPs tales como dATP, dTTP, dCTP, dGTP, y ddNTPs, tales como ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP), aminoácidos (por ejemplo polipéptidos, péptidos, aminoácidos tales como aspartato, glutamato, lisi- 40 na, arginina, histidina, alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, metionina, triptófano, prolina, serina, treonina, asparagina, glutamina, glicina, cisteína y tirosina), lípidos, compuestos químicos, y más específicamente receptores o anticuerpos y sus ligandos, células y factores de crecimiento, inhibidores de crecimiento, enzimas y sustratos. Dichas biomoléculas pueden contener mezclas complejas de moléculas grandes y pequeñas de diferentes polaridades (por ejemplo, moléculas de ácidos nucleicos y proteínas, dNTPs, ddNTPs, marcadores fluorescentes, *etc.*), que pueden tener una potente afinidad por los sustratos sólidos. Cualquier número de biomoléculas puede incluirse o excluirse como especie individual de la invención. En otros aspectos, una muestra de fluido puede contener una mezcla de reacción, tal como una mezcla de reacción de PCR, una mezcla de LCR, una mezcla de reacción de extensión de cebador o una mezcla de reacción de genotipaje (por ejemplo, mezcla de microsecuenciación (MIS)), cualquiera de las cuales puede incluirse o excluirse como especie de la invención. 50

Los métodos, sistemas y aparatos de la invención pueden utilizarse ventajosamente de acuerdo con un amplio rango de *operaciones de fluido*, algunas de las cuales se describen aquí más adelante. En algunos aspectos, la etapa de realización de una operación de fluido puede comprender realizar una operación de fluido seleccionada de un grupo que consiste en una reacción, incubación, dilución, titulación, purificación, detección, ensayo de mezcla y cribado de fármaco, cualquiera de las cuales puede incluirse o excluirse como especie de la invención. En las realizaciones preferidas de la invención, la operación de fluido comprende realizar una *reacción bioquímica*. Más específicamente, una reacción bioquímica puede comprender una reacción de extensión de cebador, ciclado de temperatura, reacción de 55 amplificación de ácido nucleico, o purificación enzimática, cualquiera de las cuales puede incluirse o excluirse como especie de la invención. Las reacciones de ciclado de temperatura particularmente preferidas incluyen las reacciones de PCR o MIS. Cualquier número o combinación de operaciones de fluido puede realizarse según los métodos de la invención. En un aspecto, se utiliza un aparato para una única operación de fluido, mientras que en otros aspectos, se realizan al menos 2 operaciones de fluido secuenciales en un canal o aparato de la invención. Preferiblemente, dichas operaciones de fluido secuenciales se realizan en el mismo canal o aparato de la invención. En una realización preferida, la invención se dirige a operaciones de fluido en volúmenes de menos de cualquier número entero entre 20 65 y 0,1 μl . Cualquier número entero puede ser específicamente incluido o excluido de las realizaciones de la presente invención.

Las *superficies* preferidas que forman un aparato de la invención, están hechas de o consisten esencialmente en cristal, cuarzo, silicio, metales o plásticos, cualquiera de los cuales puede incluirse o excluirse como especie de la invención. Preferiblemente dicho plástico es polimérico, y, más preferiblemente, dicho plástico polimérico es un polímero de varias polaridades. La superficie puede ser polar, no polar, hidrófila o hidrófoba. Las superficies preferidas son superficies hidrófobas polares, superficies hidrófobas no polares, superficies hidrófilas polares, y superficies hidrófilas no polares, cualquiera de las cuales puede incluirse o excluirse como especie de la invención. Todavía más preferiblemente, el polímero se selecciona del grupo que consiste en poliestireno, polipropileno, metacrilato de polimetilo, cloruro de polivinilo, polietileno, policarbonato, polisulfona, fluoropolímeros, poliamidas, polidimetilsiloxanos, poliuretano, polisulfona, politetrafluoroetileno, y elastómeros, cualquiera de los cuales puede incluirse o excluirse como especie de la invención. Como aquí se utiliza, el término *sustrato* se refiere a la superficie estructural bajo un recubrimiento o cubierta (por ejemplo, una cubierta de polímero). En la presente invención, pueden disponerse microcanales en un sustrato o los aparatos pueden estar hechos de un sustrato. En una realización preferida, el término *aparato* se utiliza aquí de forma intercambiable con *dispositivo* o *recipiente*. Los *aparatos* de la invención se utilizan para almacenamiento, dispensación o reacción de muestras de fluido. Dichos aparatos comprenden tanto dispositivos y recipientes tales como canales dispuestos en un sustrato, o tubos de ensayo, placas de multipocillos, pipetas, puntas de pipeta, placas de microtitulación, pocillos de reacción, microcanales, aparatos de microfluidos, capilares y tubos de ensayo de microcentrífuga, placas de multipocillo, puntas de pipeta, placas de microtitulación, pocillos de reacción, tubos de microcentrífuga, microcanales y similares que contienen dicha superficie, cualquiera de las cuales puede incluirse o excluirse como especie de la invención. Preferiblemente, dicho canal es un microcanal. Los microcanales de la invención, incluyendo los microcanales dispuestos en los dispositivos de microfluidos de la invención, tienen preferiblemente una anchura de entre alrededor de 1 μm y alrededor de 3 mm.

En ciertos aspectos, la superficie de dichos dispositivos, recipientes o aparatos, es una superficie no tratada; preferiblemente una superficie no silanizada cuando se utiliza un sustrato de silicio. Dicha superficie puede ser hidrófoba o hidrófila. En otros aspectos, la superficie puede ser pretratada antes del tratamiento con un polímero según la invención.

La invención también se refiere a dispositivos de microfluido que comprenden pocillos de reacción, y a operaciones de fluido llevadas a cabo en un pocillo de reacción. En una realización, la invención comprende hacer fluir una muestra de fluido a través de, o realizar una operación de fluido en, un canal tratado según los métodos de la invención, y realizar una reacción bioquímica en un pocillo de reacción tratado según los métodos de la invención. Preferiblemente, dicho pocillo de reacción está en una placa de microtitulación. Más preferiblemente, dichas placas de microtitulación son placas de microtitulación de polipropileno. Las placas de microtitulación de la invención preferiblemente son placas de microtitulación de alta densidad, tales como las placas de microtitulación que tienen 96, 384, 1536 o más pocillos.

En realizaciones particularmente preferidas de la invención, el *polímero de adsorción a superficie* en un polímero soluble en agua o un polímero soluble en líquido no polar; en otras realizaciones preferidas el polímero de adsorción a superficie es un polímero no cargado. Preferiblemente, el polímero es un polímero de adsorción a sílice. En más realizaciones preferidas, el polímero tiene un peso molecular de al menos 1×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 1×10^3 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 ó 5×10^6 daltons. Más preferiblemente, el polímero tiene un peso molecular de al menos 1×10^6 daltons. El polímero puede estar en una solución acuosa o no acuosa. En una realización más preferida, el polímero de adsorción a superficie tiene una mayor afinidad por la superficie que las biomoléculas de la muestra de fluido. Más preferiblemente, la energía de adsorción total por una única molécula de polímero alcanza al menos una o más unidades $k_B T$.

Además de los métodos y aparatos de la invención, la invención también abarca composiciones que contienen los polímeros de adsorción a superficie de la invención. Incluidas, por ejemplo, como se describirá aquí más adelante, están las composiciones que contienen un polímero de adsorción a superficie según la invención y una muestra de fluido de interés, donde el polímero de adsorción a superficie no es uno de los reactivos. Estas composiciones pueden, por ejemplo, prepararse y proporcionarse posteriormente como una mezcla, a un aparato de la invención.

La invención además comprende la utilización de un polímero de adsorción a superficie, en particular para realizar una operación de fluido en un microcanal o un aparato de plástico, donde el polímero de adsorción a superficie no es uno de los reactivos de la operación de fluido, o donde dicho polímero de adsorción a superficie no tiene efecto activador o inhibidor sobre los reactivos, o donde dicho polímero de adsorción a superficie no es necesario para que ocurra la reacción. El polímero de adsorción a superficie puede utilizarse como un aditivo en una mezcla que contiene una muestra, por ejemplo sobre la cual se va a realizar una operación de fluido. Preferiblemente, dicha operación de fluido es una operación seleccionada del grupo que consiste en una etapa de mezclado, una reacción, una incubación, una dilución, una titulación, una detección, un ensayo de cribado de fármaco, un ensayo de unión, y un ensayo de mediciones (por ejemplo, medición de cinética). Más preferiblemente, la operación de fluido es una reacción bioquímica; más preferiblemente, la reacción bioquímica incluye ciclado de temperatura.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una representación de la interacción de las cadenas de polímero en dos regímenes diferentes, con el entrecruzamiento entre ellas como función de la concentración de polímero.

La Figura 2 muestra un homopolímero de adsorción a superficie adsorbido sobre un sustrato sólido en una conformación de cola-asa-tren.

La Figura 3 muestra la conformación de un homopolímero adsorbido sobre una superficie de un canal.

La Figura 4 muestra la concentración de polímero (c), como función de la distancia del polímero (x) desde la superficie sobre la cual está adsorbido. Los polímeros adsorbidos forman una capa que está hecha de una región proximal, una central y una distal, que tienen diferentes sensibilidades a los detalles de las interacciones polímero-superficie.

La Figura 5 muestra el efecto de la adición de un copolímero sobre la intensidad de la señal específica obtenida después de un proceso de genotipaje llevado a cabo como se describe en el Ejemplo 1.

La Figura 6 muestra el efecto de la adición de un copolímero sobre la especificidad de la señal obtenida después de un proceso de genotipaje llevado a cabo como se describe en el Ejemplo 1.

Descripción detallada

Las operaciones de fluido, particularmente las reacciones biológicas, requieren frecuentemente etapas sucesivas en el mismo aparato, en pequeños volúmenes, para maximizar la eficiencia y minimizar el coste. Por ejemplo, el genotipaje mediante extensión de base única requiere tres reacciones biológicas sucesivas [es decir, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), purificación enzimática y microsecuenciación (MIS)]. Así, es eficiente y beneficioso llevar a cabo dos o más reacciones sucesivas en el mismo aparato. En tales casos, debe asegurarse que no haya contaminación entre las reacciones debida a la adsorción, y que las biomoléculas de las reacciones previas no contaminen las reacciones posteriores debido a la adsorción no deseada. Sin embargo, esto puede ser difícil de conseguir, debido a la elevada adsorción de las biomoléculas residuales sobre las superficies de los aparatos.

De este modo, la invención proporciona métodos para disminuir la adsorción de materiales orgánicos sobre varias superficies utilizando polímeros de adsorción a superficie. Específicamente, los métodos para realizar operaciones de fluidos, que incluyen la adición de polímeros de adsorción a superficie que se unen no covalentemente a una superficie, previniendo así la adsorción no deseada de moléculas orgánicas sobre dicha superficie. La invención también proporciona aparatos y sistemas (por ejemplo, kits) que contienen polímeros de adsorción a superficie. Además, la presente invención proporciona un método para tratar la superficie de canales de microfluidos, en el que las superficies de microfluídica se recubren para la desactivación, y en el que este recubrimiento puede regenerarse fácilmente. Los polímeros de adsorción a superficie de la invención son estables a las temperaturas y condiciones requeridas para las reacciones biológicas, especialmente en aplicaciones que incluyen ciclados de temperatura o polimerización de polinucleótidos o polipéptidos.

El método de desactivación de superficie de la invención, también proporciona un medio para el recubrimiento dinámico de una superficie con un polímero de adsorción a superficie. Preferiblemente, la superficie no ha sido pretratada para reducir la adsorción de materiales orgánicos sobre la superficie. El método de recubrimiento dinámico permite a una superficie regenerarse tan frecuentemente como sea necesario, aumentando la vida de un aparato que contiene la superficie, y aumentar la reproducibilidad lote a lote de cualquier superficie de la invención. Este método también evita la necesidad de un pretratamiento especial de la superficie.

Como aquí se utiliza, el término *sustrato* se refiere a la superficie estructural bajo una cubierta o recubrimiento (por ejemplo, una cubierta de polímero). Un sustrato puede ser silicio, cuarzo, cristal, cerámica o plástico (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, metacrilato de polimetilo, cloruro de polivinilo, polietileno, policarbonato, polisulfona, fluoropolímeros, poliamidas, polimetilsiloxanos, poliuretano, polisulfona, politetrafluoroetileno, y elastómeros). Preferiblemente, un sustrato plástico contiene poliestireno. En la presente invención, los microcanales pueden disponerse en un sustrato o los dispositivos pueden estar hechos de un sustrato. Preferiblemente, el sustrato es un plástico de polaridad menor que la polaridad de la muestra de fluido acuosa.

Como aquí se utiliza, el término aparato incluye los términos *dispositivo* y *recipiente*, que se utilizan de forma intercambiable con *aparato* a lo largo de toda la solicitud. Un aparato se refiere a cualquier elemento, herramienta, o componente diseñado para un uso o propósito específico. Dichos usos incluyen almacenamiento, dispensación o reacción de muestras, preferiblemente muestras de fluido. Ejemplos de aparatos incluyen, pero no se limitan a, microcanales, aparatos de microfluidos, capilares, tubos de ensayo, placas de multipocillo, pipetas, puntas de pipeta, placas de microtitulación, pocillos de reacción y tubos de microcentrifuga.

Como aquí se utiliza, la expresión *placa de microtitulación* se refiere a una placa de multipocillo utilizada para almacenamiento y/o reacción de muestras de fluido o para realizar operaciones de fluido. Típicamente, las placas están hechas de sustratos tales como silicio, cuarzo, cristal, cerámica o plástico, y contienen 96, 384, 1536, o más pocillos. Las mismas placas de microtitulación pueden utilizarse para realizar operaciones de fluido sucesivas. Preferiblemente, dichas operaciones de fluido son reacciones bioquímicas, tales como ciclados de temperatura (por ejemplo, PCR), purificación enzimáticas, reacción de extensión de cebador (por ejemplo, MIS).

Como aquí se utiliza, el término *canal* abarca el término microcanal. También, como aquí se utiliza, un *sustrato de microfluídica* se refiere a un sustrato sólido en el que se dispone un microcanal. Un dispositivo de microfluídica comprende un sustrato de microfluídica, que típicamente contiene más de un microcanal, y opcionalmente comprende otros componentes o características relacionadas con la realización de operaciones de fluido, tales como reservorios,

ES 2 267 828 T3

puertos de entrada/salida, así como aparatos de detección, medios de almacenamiento de reactivos y de distribución, medios de regulación de la temperatura, etc.

5 Basada en el nuevo método de desactivación, la invención también proporciona métodos de conducir operaciones de fluidos, particularmente reacciones químicas y bioquímicas, y particularmente operaciones de fluidos que comprenden manipulaciones de fluidos que contienen biomoléculas.

10 Una *operación de fluido*, como aquí se utiliza, se refiere a cualquier manipulación de un fluido que implique el movimiento de fluidos o la realización de tareas en fase líquida. Las operaciones de fluidos incluyen, pero no se limitan a, reacciones, incubaciones, separaciones, diluciones, titulaciones, mezclas, purificaciones, detecciones, ensayos de cribado de fármaco, ensayos de unión, ensayos de mediciones (por ejemplo mediciones de cinética), así como cualquier operación que incluye generalmente un gran número de manipulaciones sucesivas, y cualquier manipulación de fluido en la que el fluido contiene un analito de ensayo, reactivo o biomolécula, particularmente cuando el analito de ensayo o el reactivo es una biomolécula.

15 Como aquí se utiliza, una *reacción química* o *reacción bioquímica* se refiere a un proceso en el que una o más sustancias se transforman químicamente o bioquímicamente en una o más sustancias diferentes (por ejemplo: reactivo + reactivo(s) - opcionalmente cualquier catalizador(es) → producto(s)). Una reacción bioquímica es típicamente una reacción mediada por, o que incluye, una biomolécula.

20 Una *mezcla de reacción* se refiere a una mezcla única que contiene los componentes necesarios para que una reacción química o bioquímica tenga lugar. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, mezclas de PCR y mezclas de MIS.

25 Como aquí se utiliza, una *muestra de fluido* o *muestra de fluido de interés*, abarca pero no se limita a, cualquier molécula sobre la cual se va a realizar una operación de fluido, abarcando cualquier biomolécula o molécula química. Una muestra de fluido o muestra de fluido de interés incluye pero no se limita a, un analito de ensayo o un reactivo. La expresión *analito de ensayo* abarca una sustancia que es medida en un procedimiento analítico, que puede incluir productos químicos así como biomoléculas. Un *reactivo* se refiere a un reactivo en una reacción química o bioquímica.

30 Como aquí se utiliza, una *biomolécula* se refiere a una molécula orgánica que es sintetizada por un organismo vivo, y sus derivados, variantes y fragmentos. Las biomoléculas preferidas son macromoléculas. Otras biomoléculas preferidas comprenden, pero no se limitan a, ácidos nucleicos (por ejemplo, DNA, RNA, polinucleótidos, oligonucleótidos, nucleótidos, dNTPs tales como dATP, dTTP, dCTP, dGTP, y ddNTPs tales como ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP), aminoácidos (por ejemplo proteínas, polipéptidos, péptidos, aminoácidos tales como aspartato, glutamato, lisina, arginina, histidina, alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, metionina, triptófano, prolina, serina, treonina, asparagina, glutamina, glicina, cisteína y tirosina) y lípidos. Cualquier género o especie de la invención puede incluirse o excluirse de las realizaciones de la invención.

40 En un primer aspecto de la invención, se proporciona un polímero de adsorción a superficie no cargado, soluble en agua, para modificaciones de la superficie de tubos de ensayo, placas de multipocillo, pipetas, puntas de pipeta, placas de microtitulación, pocillos de reacción, microcanales, aparatos de microfluidos, capilares y tubos de microcentrífuga, *etc.*, particularmente para utilizar en dispositivos de microfluidos y dispositivos de plástico tales como placas de microtitulación. Preferiblemente, la solubilidad del polímero, en contraste con la BSA, no cambia dramáticamente con el intervalo de temperatura importante para las reacciones biológicas (es decir, 37-94°C). La modificación de la superficie de los canales en los dispositivos de microfluidos hace a estos microdispositivos adecuados para las reacciones químicas o bioquímicas. El peso molecular de los polímeros de adsorción a superficie puede ser importante para la estabilidad de la capa de polímero adsorbido. Aunque pueden elegirse polímeros de cualquier peso molecular, los polímeros preferiblemente tienen un peso molecular de más de 1×10^6 daltons, lo que mejora la estabilidad de la capa de polímeros adsorbidos a temperaturas elevadas. Los polímeros que tienen un peso molecular de alrededor de 1×10^6 daltons y superiores, son particularmente útiles para aplicaciones biológicas, particularmente reacciones que incluyen ciclado de temperatura. Los polímeros se describen mejor aquí.

55 Como aquí se utiliza, el término *polímero* se refiere a una molécula compuesta de subunidades monoméricas más pequeñas enlazadas juntas covalentemente. El término *polímero* abarca el término homopolímero, que se refiere a un polímero hecho de un solo tipo de monómero, así como al término copolímero, que se refiere a un polímero hecho de dos o más tipos de monómero.

60 El polímero puede introducirse en una superficie como una solución de polímero, preferiblemente como un aditivo en una muestra de fluido, por ejemplo, una muestra de reacción. El polímero puede introducirse solo en un disolvente, o en combinación con, por ejemplo, una biomolécula, producto químico o célula. La concentración útil de polímero para las modificaciones de la superficie está preferiblemente en el intervalo entre alrededor de 0,001% y alrededor de 5% (peso/volumen). Una concentración preferida está alrededor de 0,1% (peso/volumen). Como se describe mejor aquí en la sección titulada "Polímeros y Soluciones", se apreciará que la concentración de polímero, la longitud del polímero y la viscosidad de la solución que contiene el polímero, pueden adaptarse para adecuarse a diferentes canales y operaciones de fluidos.

Los polímeros de la invención tienen varias ventajas sobre los métodos de desactivación de superficie utilizadas previamente, por ejemplo son solubles en agua en un intervalo de temperatura importante para las reacciones biológicas, mientras que la BSA se desnaturaliza y se vuelve menos polar (más hidrófoba) a temperaturas elevadas (>-60°C); no están cargadas; y son químicamente moléculas más simples que la BSA, lo que disminuye la probabilidad de interacciones inespecíficas entre la superficie modificada y los reactivos.

Los aparatos, dispositivos y recipientes, más específicamente los sustratos de los que están hechos, pueden tener cualquier forma, ejemplos de los cuales se describen mejor aquí. Por ejemplo, los plásticos pueden utilizarse para hacer canales tubulares, tales como en los capilares colocados a voluntad en cualquier sitio. Los canales tubulares o los canales generalmente dispuestos en una capa fina de sustrato se utilizan por ejemplo en dispositivos de almacenamiento líquido o distribución, para utilizar con sistemas de microfluídica, tales como los pipetadores de capilares, los capilares utilizados para transferir muestras de fluido a un microcanal o a un dispositivo de microfluidos, o dispositivos de almacenamiento separados que contienen canales de almacenamiento y/o reservorios de fluido, incluyendo dispositivos como los descritos para introducir muestras de fluido en un microcanal en la Publicación de Patente Internacional N° WO 00/21666. Aunque los microcanales pueden utilizarse para realizar una amplia variedad de operaciones de fluidos, se apreciará que los polímeros y métodos relacionados con la desactivación de las superficies de los canales son especialmente ventajosos para operaciones de fluidos que incluyen ciclado de temperatura, tales como la PCR y la extensión de cebador de nucleótido único, así como la manipulación general de proteínas, particularmente cuando las proteínas van a ser sometidas a una o más temperaturas diferentes. En aspectos preferidos, los dispositivos de microfluidos contendrán entonces un medio de regulación de la temperatura, particularmente un medio para el ciclado de la temperatura de los contenidos de un canal. Preferiblemente, los dispositivos de microfluído tendrán un medio de movimiento del fluido, que incluye la creación de un gradiente de presión a través de uno o más canales. Los dispositivos de microfluidos, incluyendo los medios relacionados de regulación de la temperatura, los medios de movimiento de fluidos, así como las operaciones de fluidos se describen mejor aquí.

Se proporcionan varios métodos diferentes para adsorber un polímero sobre una superficie. Se presentan aquí más descripciones concernientes a los principios de la adsorción de polímeros. En un ejemplo, la solución de polímero se añade a la muestra de fluido antes de añadir la muestra de fluido al dispositivo de la invención. En otro ejemplo, una solución de polímero, en presencia o ausencia de una muestra de fluido, tal como una que contiene un analito de ensayo o un reactivo, se hace fluir a través de un canal de tal forma que el polímero se adsorba a la superficie del canal. Preferiblemente, el movimiento de la solución de polímero se efectúa mediante la creación de un gradiente de presión, tal como el que puede proporcionarse con una jeringa, una bomba peristáltica y/o gas presurizado. Una vez que el canal está recubierto con el polímero, cualquier número de muestras de fluido pueden hacerse pasar a través del canal secuencialmente. Se describen mejor aquí los medios para inyectar la solución de polímero, los fluidos que están sometidos a las operaciones de fluido, y los medios de movimiento de fluidos. También se describen mejor aquí los dispositivos de microfluidos que pueden utilizarse según los métodos de la invención. Se apreciará que pueden utilizarse una variedad de sustratos de canales, geometrías de canales, y componentes para el almacenamiento, manejo, inyección y/o detección de muestras de fluido, según los métodos de la invención.

Cualquier superficie que ha sido tratada con un polímero según la invención, puede regenerarse con una solución fresca de polímero de adsorción a superficie. El proceso de recubrimiento descrito anteriormente puede repetirse a cualquier tiempo deseado, haciendo fluir una solución de polímero a través del canal. La solución de polímero puede hacerse fluir a través del canal al mismo tiempo (es decir, en presencia de) una muestra de fluido de interés, o puede hacerse fluir a través del canal antes de la introducción de más muestras. En realizaciones particularmente preferidas, la invención incluye un método de recubrimiento dinámico. El método de recubrimiento dinámico incluye regenerar la superficie del canal a intervalos regulares, para mantener una calidad de superficie consistente cuando un canal se utiliza repetidamente. Esto es especialmente valioso para aplicaciones de microfluidos en las que se introducen muchas muestras secuencialmente en un canal.

Como aquí se utiliza, una muestra de fluido individual inyectada en un canal forma lo que se denomina como una zona de *muestra de fluido*. Pueden inyectarse secuencialmente varias zonas de muestra de fluido, por ejemplo. En ciertas realizaciones, es preferible separar las zonas de muestra de fluido, para prevenir la mezcla de los contenidos de la zona, proporcionando una zona de separación de fluidos entre las zonas de muestra de fluido.

En un primer ejemplo de los métodos de la invención, se proporcionan secuencialmente una, dos o más zonas de muestra de fluido a un canal. En dicha realización, el polímero de adsorción a superficie se proporciona en la zona de muestra de fluido. El polímero de adsorción a superficie puede proporcionarse en cada zona de muestra de fluido, o solo en ciertas zonas de muestra de fluido o a intervalos adecuados.

En otras realizaciones, el polímero de adsorción a superficie se proporciona en una, o en dos o más zonas de muestra de fluido, pero no en una(s) zona(s) de separación de fluidos. En otra realización, el polímero de adsorción a superficie se proporciona en una, dos o más zonas de separación de fluidos, pero no en la(s) zona(s) de muestra de fluido. En otra realización, el polímero se proporciona en al menos una zona de separación de fluidos, pero está esencialmente ausente al menos de una zona de muestra de fluido. En todavía otra realización, el polímero se proporciona en al menos una zona de separación de fluidos y en al menos una zona de muestra de fluido.

El polímero de adsorción a superficie puede incluirse con una muestra de fluido, e introducirse en un canal como una mezcla. Alternativamente, una solución de polímero de adsorción a superficie y una muestra de fluido pueden

introducirse en un canal común a través de puertos de entrada separados, o introducirse simultáneamente a través de un puerto común. El polímero de adsorción a superficie puede utilizarse como un aditivo en una mezcla de reacción. Después de la inyección, la solución puede hacerse fluir a través del canal, preferiblemente en un modo de flujo continuo, de tal forma que la solución de polímero de adsorción a superficie regenerará la superficie del canal.

5 La concentración del polímero de adsorción a superficie puede optimizarse según una operación de fluido específica, o preferiblemente una reacción bioquímica específica. En general, la concentración de polímero debería minimizarse de tal forma que la viscosidad del medio fluido en el canal no aumente dramáticamente, y que la cantidad de polímero de adsorción a superficie utilizada no sea excesiva. Para seleccionar la concentración óptima de polímero, pueden realizarse reacciones bioquímicas en un dispositivo de microfluidos, con concentraciones variables de polímero. Por ejemplo, utilizando un protocolo como el mostrado en el Ejemplo 2, una concentración óptima de polímero puede seleccionarse fácilmente, determinando las concentraciones de polímero que proporcionan un producto de calidad o rendimiento adecuados.

15 La invención también proporciona métodos de llevar a cabo varias manipulaciones de fluidos, en un canal recubierto con un polímero de adsorción a superficie de la invención. En los métodos de recubrimiento dinámico, la realización de operaciones de fluidos, particularmente las reacciones bioquímicas, incluyen proporcionar un fluido que contiene un analito de ensayo o un reactivo, preferiblemente una biomolécula, una mezcla de reacción o una proteína, a un canal, en presencia de un polímero de adsorción a superficie. Cuando se llevan a cabo operaciones de fluidos secuenciales en el mismo canal, el polímero de adsorción a superficie no tiene que añadirse a cada operación de fluido o a cada unidad de fluido, pero puede añadirse solo a cada segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta o veintava operación de fluido, por ejemplo.

25 Por lo tanto, pueden llevarse a cabo una amplia variedad de operaciones de fluido. Los métodos para llevar a cabo operaciones de fluidos incluyen llevar a cabo reacciones, incubaciones, separaciones, diluciones, titulaciones, purificaciones, detecciones, ensayos de cribado de fármacos, mezclas, ensayos de unión, ensayos de medición (por ejemplo, mediciones de cinética), así como cualquier operación que incluya generalmente un gran número de manipulaciones sucesivas, y cualquier manipulación de fluido en la que la muestra de fluido contenga un analito de ensayo o un reactivo, particularmente cuando el analito de ensayo o el reactivo es una biomolécula, y más preferiblemente cuando el analito de ensayo o el reactivo es un ácido nucleico o un aminoácido.

1. *Polímeros y Soluciones*

35 La invención proporciona un polímero de adsorción a superficie no cargado, soluble en agua, para modificaciones de la superficie de canales, tales como canales de capilares colocados a voluntad en cualquier sitio, y en dispositivos de microfluídica. Preferiblemente, el polímero tiene una solubilidad que no cambia dramáticamente dentro de un intervalo de temperatura relevante para las reacciones biológicas (por ejemplo, entre alrededor de 20-100°C o más preferiblemente entre alrededor de 37-94°C). Preferiblemente, se especifica un polímero de adsorción a sílice.

40 La síntesis de polímeros puede llevarse a cabo según los métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de métodos de síntesis de polímeros adecuados se describen en Odian, *Principles of Polymerization*, 3ª Edición (John Wiley, NY, 1991).

45 Los copolímeros de bloque de PPG y PEG (copolímeros de bloque PPG-PEG-PPG y PEG-PPG-PEG), o EO y PO, están disponibles comercialmente. Los copolímeros de bloque (EO-PO-EO y PO-EO-PO) SYNPERONIC, PLURONIC® y PLURONIC®R, están disponibles por ejemplo de BASF, Ludwigshafen, Alemania.

50 Como aquí se discute, se proporcionan varios métodos diferentes para adsorber un polímero sobre una superficie. En un ejemplo, una solución de polímero, en presencia o ausencia de una muestra de fluido, se hace fluir a través de un canal, de tal forma que el polímero se adsorba a la superficie del canal. La concentración de polímero es minimizada típicamente de tal forma que la viscosidad del medio fluido en el canal no aumente dramáticamente, y que la cantidad del polímero de adsorción a superficie utilizada no sea excesiva. En el caso en el que la solución de polímero contenga un analito de ensayo o un reactivo, se apreciará que deben tenerse en consideración la influencia de la viscosidad de las soluciones de polímero sobre la cinética de cualquier posible reacción biológica. Preferiblemente, la viscosidad de la solución de polímero se selecciona de tal forma que no afecte a la reacción biológica.

Propiedades del polímero

60 Una molécula de polímero (tal como PDMA, DNA, etc.), se comporta como un espiral al azar, con su radio de giro R_g proporcional a la raíz cuadrada de la longitud de contorno de la cadena L (o número de monómeros N): $L=N.l$ y $R_g \sim L^{1/2}.l^{1/2}$ ó $R \sim N^{1/2}.l$, donde l es la longitud de un monómero. Consecuentemente, una molécula de polímero parece mucho menor en tamaño que si estuviera completamente estirada.

65 Una solución de polímero, en general, a una temperatura dada y en un disolvente dado, puede caracterizarse por la concentración de masa del polímero C , su masa molecular media M_w y por la viscosidad de la solución del polímero η .

ES 2 267 828 T3

Con respecto a la concentración de la solución del polímero, uno puede reconocer tres diferentes regímenes: (a) diluido; (b) semi-diluido; y (c) concentrado. En el régimen diluido, las cadenas de polímero se aíslan una de otra, en buenos disolventes en los que son preferibles las interacciones polímero/disolvente. Según aumenta la concentración de una solución de polímero por encima de una concentración crítica (C^*), las cadenas de polímero se vuelven complicadas. Los regímenes diluido ($C < C^*$) y semi-diluido ($C > C^*$), con el entrecruzamiento entre ellas ($C \sim C^*$), se muestran en la Figura 1. Claramente, el dintel (concentración crítica), no es agudo, pero se define como una región de entrecruzamiento entre los dos regímenes. A partir de argumentos de escalada, se espera que C^* sea comparable con la concentración local dentro de una única espiral de polímero.

En un buen disolvente esto implica:

$$C^* \sim N/R_g^3 = a^{-3}N^{1-3\gamma} = a^{-3}N^{-4/5} \quad (1)$$

donde N es el número de monómeros en una espiral de polímero, R_g^3 es el volumen de una espiral de polímero y α es la longitud de persistencia del polímero. La longitud de persistencia de una molécula de polímero define su flexibilidad. El significado físico de la longitud de persistencia es que una memoria de una dirección de cadena se retiene solo sobre escalas de longitud más cortas que l (la memoria de una dirección de cadena se pierde sobre escalas de longitud mayores que l). En términos más prácticos, la concentración del dintel superpuesto se relaciona con la viscosidad intrínseca de una solución de polímero como:

$$C^* = 1,5/[\eta] \quad (2)$$

La viscosidad intrínseca de una solución de polímero se obtiene extrapolando una viscosidad reducida $\eta_{red} = (\eta - \eta_s)/\eta_s$ a concentración de polímero cero (Sun S.F., Physical Chemistry of Macromolecules, Wiley-Interscience, John Wiley and sons, Inc. New York, 1994). La viscosidad intrínseca de una solución de polímero está también relacionada con el peso molecular del polímero a través de la relación de Mark-Houwink: $[\eta] = KM_w^\alpha$, donde K y α son los coeficientes de Mark-Houwink.

Para $C < C^*$, la solución de polímero puede verse como un sistema diluido de espirales de polímero. Las espirales de polímero se comportan como esferas duras. Esto viene del hecho de que cuando dos espirales se fuerzan a superponerse en un buen disolvente, cada contacto polímero/polímero trae una energía de orden $k_B T$ (donde k_B es la constante de Boltzman, y T es la temperatura). Como deben ocurrir muchos contactos entre las espirales de polímero superpuestas, la energía de superposición global es de varios $k_B T$, volviéndose la exponencial de Boltzman muy pequeña y, consecuentemente, las espirales de polímero no se superponen unas a otras.

En el régimen semi-diluido ($C > C^*$), las espirales de polímero se superponen unas con otras, y las soluciones de polímero se comportan como una red dinámica. Todas las propiedades termodinámicas (por ejemplo, energías locales, entropías, etc.), de dichas soluciones son controladas solo por la concentración de la solución C y no por la longitud de una cadena de polímero N . La escala de longitud importante de tales redes dinámicas es una distancia media entre diferentes cadenas de polímero (un tamaño de malla medio). El tamaño de malla dinámica S de una solución de polímero puede derivarse a partir de argumentos de escalada para $C \sim C^*$ y es inversamente proporcional a la concentración de la solución del polímero C^0 (solo cuando $C > C^*$):

$$S \sim R_g(C^*/C)^{3/4} \quad (3)$$

Los coeficientes de difusión de las moléculas están relacionados con su tamaño, la viscosidad del medio en el que difunden y la temperatura, a través de la relación de Einstein-Stokes:

$$D = k_B T / 6\pi\eta R \quad (4)$$

donde D es un coeficiente de difusión molecular, η es la viscosidad de una solución de polímero y R es el radio molecular. Es evidente que los coeficientes de difusión de las moléculas biológicas disminuirán con un aumento en la viscosidad de la solución. La viscosidad de las soluciones de polímeros η en el régimen diluido ($C < C^*$) depende linealmente de la concentración de polímero ($\eta \sim C$), pero su dependencia se vuelve no lineal (es decir $\eta \sim C^\alpha$, donde $\alpha > 1$ en los regímenes semi-diluidos ($C > C^*$). Así, la difusión de los reactivos biológicos puede afectarse dramáticamente con un pequeño cambio en la concentración de polímero en los regímenes semi-diluidos ($C > C^*$).

$$D = k_B T / 6\pi C^\alpha R \quad (5)$$

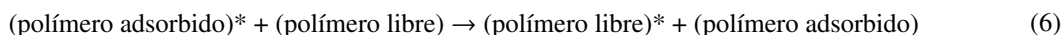
65 Adsorción del polímero

Preferiblemente, la concentración bruta de una solución de polímero utilizada para modificación de superficies que contiene una mezcla de reactivos está por debajo del dintel superpuesto de concentración C^* . El dintel superpuesto de

concentración disminuye con un aumento en el tamaño del polímero, lo que sugiere que cuando se utilizan polímeros grandes ($M_w > 10^6$) para modificaciones de superficie, deben emplearse soluciones de polímero de baja concentración ($C_{\text{bulk}} < 1\%$).

5 La adsorción de polímero sobre superficies ocurre si la interacción entre el polímero y la superficie es más favorable que la del disolvente con la superficie. Así, incluso los polímeros que son altamente solubles en un disolvente (por ejemplo, en agua), pueden adsorberse sobre un sustrato sólido, si el sustrato sólido “prefiere” interactuar con el polímero en vez de con las moléculas de disolvente. Una forma simple de predecir si un polímero disuelto en un disolvente dado va a adsorberse sobre una superficie, es medir la tensión de superficie de un disolvente puro γ_s (por ejemplo agua), y de un polímero puro γ_p . Cuando $\gamma_s > \gamma_p$, se espera que el polímero se adsorba sobre la superficie cuando se disuelva en el disolvente particular. Hay dos factores principales que determinan la adsorción del polímero sobre una superficie. Un primer factor es una interacción (una energía que favorece la adsorción del polímero) sólida sustrato/monómero (la parte más pequeña de un polímero). Un segundo factor es la reducción de los estados conformacionales del polímero a los del sustrato (disminución de la entropía de la cadena). Esto es debido a la impenetrabilidad del sustrato para monómeros, y es la energía que intenta mantener al polímero alejado de la superficie. Además, las interacciones revulsivas monómero/monómero en un buen disolvente favorecen el alejamiento del polímero de una superficie (es decir, las interacciones de volumen excluido tienden a aumentar el grosor de las capas de polímero adsorbido en buenos disolventes). La fuerza de la adsorción del polímero es así dada por la relación de las fuerzas atractivas y repulsivas.

20 Las capas de polímero adsorbido son estables cuando están construidas a partir de polímeros grandes. Por ejemplo, las interacciones polímero/superficie son relativamente débiles (una fracción de unidad $k_B T$) en las capas de polímero adsorbido. Sin embargo, debido al gran número de segmentos que interactúan con una superficie, que pueden ser más del 10% del número total de segmentos/monómeros en un polímero, la energía total de adsorción por una única molécula de polímero puede ser muy grande, alcanzando varias unidades $k_B T$, haciendo así la adsorción del polímero virtualmente irreversible, particularmente cuando se emplean polímeros largos. Además, los polímeros largos adsorbidos sobre superficies tienen más grados de libertad que los cortos, lo que da como resultado coberturas de superficie más estables. Sin embargo, se ha demostrado en experimentos (Thies, C., J. Phys. Chem. 70 (1976) 3783, y Cohen-Stuart, J. *et al.*, J. Polymer Sci. (Phys.), 18 (1980) 559), que los polímeros adsorbidos sobre superficies pueden intercambiarse con polímeros en solución bruta. La primera observación mostraba que los polímeros cortos adsorbidos sobre una superficie pueden ser reemplazados por polímeros grandes si están presentes en solución bruta, y también sugiere que las capas de polímeros adsorbidos hechas de polímeros grandes son más estables que las construidas a partir de polímeros cortos. Consecuentemente, Phefferkorn, E., *et al.*, (J. Polymer Sci. (Phys.), 23 (1985) 1997) mostraron que el intercambio entre cadenas de polímeros adsorbidas sobre una superficie y cadenas idénticas en la solución bruta, está gobernado por una cinética de segundo orden:



40 lo que sugiere que la tasa de de-adsorción es proporcional a la concentración de cadenas de polímero sobre la superficie C^* y en la solución bruta C ($-dC^*/dt = kC^*C$, donde k es una constante).

Una propiedad significativa de una capa de polímero adsorbido es la potente interacción de repulsión entre moléculas de polímero vecinas. Esto significa que cuando el número de polímeros sobre una superficie aumenta, la energía de atracción entre una superficie (con polímeros) y el polímero adsorbido disminuye. En otras palabras, la “calidad” de la superficie está siendo cambiada por los polímeros adsorbidos, de tal modo que la calidad de la superficie no es la misma para el primer polímero que se adsorbe sobre una superficie y para la molécula de polímero n^{a} . Existe no es una cobertura (concentración, C_e) finita (equilibrio) para una superficie, por cadenas de polímero. Cuando se adsorben más polímeros sobre una superficie que la que está dada por la cobertura de equilibrio, la energía libre de estas moléculas se vuelve mayor que la energía libre de los polímeros en solución bruta, y se de-adsorben rápidamente. En otras palabras, hay una fuerza restauradora que mantiene la cobertura de equilibrio constante. La condición de cobertura de equilibrio casi constante se denomina la condición de saturación. La condición de saturación hace que las moléculas de polímero puedan escapar de una capa adsorbida solo cuando los polímeros de una solución bruta los reemplazan inmediatamente, para mantener constante C_e .

55 El polímero único adsorbido sobre un sustrato sólido se describe en términos de conformación de cola-asa-tren, representada en la Figura 2. Los segmentos de polímero que pertenecen a los trenes se pegan a una superficie, mientras que los segmentos de las colas y las asas están en solución. La conformación de un polímero adsorbido no se altera sobre una longitud del orden del grosor (D) de la capa adsorbida. Sobre escalas de mucha más longitud, el polímero se rompe en burbujas de polímero no correlacionadas, como se muestra en la Figura 3.

60 Los polímeros adsorbidos forman una capa que está formada por tres regiones: proximal (muy sensible a los detalles de las interacciones polímero-sólido), central (esta capa es similar a sí misma, es decir la dependencia concentración versus distancia (normal a la superficie), está gobernada por una ley de poder) y distal (controlada por unas pocas asas y colas), como se muestra en la Figura 4. La capa de polímero (Figura 4) que se forma sobre una superficie previene las interacciones y, consecuentemente, la adsorción de las moléculas biológicas con/a una superficie a través de una repulsión estérica (entrópica).

El lector apreciará que el peso molecular medio del polímero puede variar, dependiendo de las aplicaciones desarrolladas para el microcanal. En ciertas realizaciones, las soluciones de polímero tienen un peso molecular medio de al menos 1×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 ó 5×10^6 daltons. En las realizaciones preferidas, el peso molecular de los polímeros de adsorción a superficie es superior a 1×10^6 daltons, mejorando así la estabilidad del polímero adsorbido, debido al aumento en la entropía (aleatoriedad) de la cadena sobre la superficie, comparada con las moléculas de polímero cortas ($<1 \times 10^6$ daltons). El aumento de la estabilidad de las capas de polímero adsorbido construidos a partir de polímeros largos, es importante para protocolos con temperatura cambiante/ciclada (por ejemplo, reacciones de PCR y MIS). En general, los polímeros pueden de-adsorberse de una superficie cuando aumenta la temperatura debido a un aumento en la energía térmica (aleatorización) del sistema.

Como se describe mejor aquí, la molécula de adsorción a superficie, preferiblemente un polímero listado aquí, puede proporcionarse junto con una muestra, un analito de ensayo, o preferiblemente con una biomolécula, y preferiblemente como un aditivo a una mezcla de reacción. En otras realizaciones, la molécula de adsorción a superficie se proporciona en una solución esencialmente en ausencia de una muestra particular, un analito de ensayo, una biomolécula o una mezcla de reacción, preferiblemente para regenerar una superficie entre analitos de ensayo en el mismo microcanal. Una solución de polímero generalmente también comprenderá una solución de tampón adecuada, pero esto no es un requisito.

Preferiblemente, la concentración de este polímero en solución para modificaciones de superficie, está en el intervalo de entre alrededor de 0,001% y alrededor de 5% (peso/volumen).

La calidad de la adsorción a superficie de un polímero puede determinarse según métodos bien conocidos. La cobertura de la superficie total por un polímero (número de monómeros/cm² de superficie), y el grosor de la capa de polímero adsorbido puede probarse fácilmente mediante mediciones hidrodinámicas (de Gennes, P.G., *Advances in Colloid and Interface Sci.* 27:189-209 (1987)), o mediante elipsometría (Asma, R., Bashara, N., *Ellipsometry and Polarized Light*, North Holland, 1977; Charmet, J.C., de Gennes, P.G., *J. Opt. Soc. Am.* 73: 1777 (1983)).

En experimentos hidrodinámicos, una partícula coloidal de radio R que se mueve en la capa de polímero con una velocidad V, encontrará una fuerza de fricción ($6\pi\eta(R+e_H)V$), donde e_H es un grosor hemodinámico de la capa de polímero adsorbido. En experimentos elipsométricos, la reflectancia residual de una luz polarizada en plano en el ángulo Brewster depende de la cobertura de la superficie total (es decir, el coeficiente de reflectancia desaparece cuando no hay polímero adsorbido sobre una superficie). Con elipsometría, es posible determinar el grosor de la película en el intervalo de 1-1000 Angströms. Técnicas más elaboradas para estudios de capas de polímeros emplean, por ejemplo, ondas evanescentes (Allain, C., *et al.*, *Phys. Rev. Lett.* 49: 1694 (1982)), o la dispersión de neutrones (Barnett, K. *et al.*, *The effects of Polymers on Dispersion Stability*, Tadros, J., ed., Academic Press, 1982). Adicionalmente, las propiedades viscosas y elásticas de las capas de polímero adsorbidas sobre superficies pueden estudiarse mediante aparatos de fuerza de superficie (SFA) [Israelachvili, J.N. *et al.*, *Faraday Trans. I*, 74:975 (1978); Klein, J. *et al.*, *Nature* 300: 429 (1982); Klein, J., *et al.*, *Nature* 308: 836 (1984); y Dhiniwala, A., *et al.*, *Macromolecules* 30: 1079-1085 (1997)].

2. Adsorción de polímero en modo dinámico

En una realización, un canal se pone en contacto con una solución de polímero antes de ponerse en contacto el canal con un analito de ensayo o un reactivo. Por ejemplo, una solución de polímero se hace fluir a través de un canal de tal forma que el polímero se adsorba a la superficie del canal. Preferiblemente, la solución se hace fluir mediante la creación de un gradiente de presión a lo largo del canal, tal como la que puede crearse a través del uso de una presión o vacío basado en una jeringa de inyección u otro medio de liberación de fluido adecuado. Alternativamente, un canal, particularmente un canal tal como los de los capilares colocados a voluntad en cualquier sitio, puede colocarse directamente dentro de una solución de polímero; la solución de polímero penetrará entonces en el canal por capilaridad, o puede introducirse en el canal mediante un gradiente de presión.

Una vez que el canal está recubierto con el polímero, puede introducirse en el canal una solución que contiene una muestra de fluido de interés, por ejemplo como parte de una operación de fluido deseada.

Cualquier superficie adecuada sobre la que se ha adsorbido una cubierta de polímero puede regenerarse o mantenerse con una cubierta de polímero de adsorción a superficie nueva según la invención. El proceso de recubrimiento descrito anteriormente puede repetirse a los tiempos deseados, haciendo fluir una solución de polímero a través del canal. Así, en realizaciones particularmente preferidas, la invención implica un método de recubrimiento dinámico. Usando el método de recubrimiento dinámico, una superficie de un canal puede regenerarse o mantenerse durante el uso, para proporcionar una calidad de superficie consistente cuando un canal se utiliza múltiples veces, es decir, realizando operaciones de fluidos secuenciales en un canal, también denominadas en *serie*.

En una realización, el polímero de adsorción a superficie se utiliza como aditivo para un fluido que contiene una muestra de fluido de interés. Un polímero de adsorción a superficie se añade a cada volumen de líquido introducido en el canal, o cada 2°, 3°, 4°, 5°, 6°, 8°, 10°, 20°, 50° ó 100° fluido. Por ejemplo, en un proceso ejemplar de la invención, el polímero de adsorción a superficie se añade a una mezcla de PCR, a una mezcla de purificación de exonucleasa/fosfatasa alcalina de gamba (EXO/SAP), y a una mezcla de microsecuenciación (MIS). El polímero de adsorción a superficie se adsorbe sobre una superficie y forma una capa de polímero en una interfaz sólido/líquido. La

concentración del polímero en la capa adsorbida sobre una superficie alcanza un valor de equilibrio. La concentración de polímero para modificaciones de superficie estará típicamente en el intervalo de desde alrededor de 0,001% hasta alrededor de 5% (peso/volumen). Preferiblemente, la concentración de polímero está en el intervalo entre alrededor de 0,01% y alrededor de 1% (peso/volumen). Sin embargo, se apreciará que la concentración de equilibrio del polímero adsorbido depende, entre otros factores, de la temperatura y del material de la superficie del canal, y que la concentración del polímero en solución puede así optimizarse mejor según la aplicación particular.

Como se describió anteriormente, un volumen de fluido introducido en un canal puede denominarse como zona de fluido, como en el caso de inyección en un canal secuencialmente. Las zonas de fluido pueden contener o consistir en cualquier fluido adecuado, incluyendo, pero no limitándose a, por ejemplo, agua o solución de tampón. Una zona de fluido puede también contener una muestra. Las zonas de fluido, particularmente las zonas de fluido que contienen muestras (*zonas de muestra de fluido*), pueden separarse mediante *zonas de separación de fluidos*, para disminuir la difusión de las muestras, o pueden simplemente introducirse una después de otra, de tal forma que tenga lugar alguna difusión. En realizaciones preferidas, las operaciones de fluido se llevan a cabo secuencialmente en un canal.

Preferiblemente, al menos 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 100, 200 ó 200 zonas de fluido secuenciales se proporcionan en un canal. El polímero de adsorción a superficie puede así proporcionarse en al menos una zona de fluido que contiene una muestra, o en al menos una zona de separación de fluidos. Preferiblemente, el polímero de adsorción a superficie está presente en al menos 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 100, 200 ó 1000 muestras o zonas de muestra de fluido, o en al menos 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 100, 200 ó 1000 zonas de separación de fluidos. En otras realizaciones, el polímero de adsorción a superficie se proporciona en al menos 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 100, 200 ó 1000 zonas de separación de fluidos, y está ausente de al menos una, o todas, de las zonas de muestra de fluido. Alternativamente, el polímero de adsorción a superficie se proporciona en ambas, una zona de muestra de fluido y una zona de separación de fluidos. Preferiblemente, el polímero de adsorción a superficie está presente en al menos 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 100, 200 ó 1000 zonas de muestra de fluido y en al menos 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 100, 200 ó 1000 zonas de separación de fluidos. Preferiblemente, el polímero de adsorción a superficie está presente en todas las zonas de separación de fluidos.

Se apreciará que un canal puede ser pretratado con una solución de polímero (por ejemplo, un canal se pone en contacto con una solución de polímero antes de ponerse en contacto el canal con un analito de ensayo o un reactivo). Alternativamente, las operaciones de fluidos que comprenden muestras de fluido a las que se ha añadido polímero pueden llevarse a cabo sin pretratamiento del canal con la solución del polímero.

En un ejemplo, los canales (varios cientos con tamaño en el intervalo de μ) de un dispositivo de microfluidos de silicio se rellenan con una solución de PDMA ($\sim 10 \mu\text{l}$) de concentración optimizada (por ejemplo, 0,1% presente), y se equilibran durante 10 minutos. Posteriormente, las zonas de muestra de fluido alternantes, que contienen PDMA (0,1% peso/volumen), y las zonas de separación de fluidos no polares, se impulsan a través del dispositivo. Cada zona de muestra de fluido contiene componentes biológicos (es decir, muestras de proteína, mezclas de reacción de PCR, EXO/SAP o MIS) y PDMA. Así, la superficie de un dispositivo de microfluidos se pre-recubre antes de que las muestras que contienen los componentes biológicos entren en el sistema, y entonces la PDMA se proporciona en cada zona de fluido que contiene una muestra biológica, para regenerar la superficie del canal para cada reacción.

Se apreciará que el polímero de adsorción a superficie puede introducirse en el canal por cualquier medio adecuado. El polímero puede introducirse como una mezcla con una muestra, o separadamente a través de puertos de entrada comunes o separados.

3. Dispositivos de microfluidos

El sustrato de microfluídica puede tomar múltiples formas. El sustrato puede ser una capa de sustrato fina rodeando un canal, como en los sustratos tubulares, tal como los capilares de polímero o de sílice fundido actualmente disponibles. En otras realizaciones, los sustratos están en un sustrato plano, en los que se disponen uno o múltiples canales. Típicamente, se fabrican hendiduras en el sustrato plano, y se cierran con un elemento de cubierta o un segundo sustrato que contiene hendiduras complementarias. En realizaciones preferidas, los dispositivos de microfluidos contienen tales sistemas de microcanales integrados, en los que múltiples canales están dispuestos en un único sustrato de microfluídica.

Los sustratos pueden ser de cualquier material adecuado. Los materiales de sustrato preferidos son sustratos basados en sílice, tales como sílice, silicio, cristal, cuarzo. Los materiales de sustrato adecuados también incluyen metales, así como polímeros tales como plásticos, incluyendo poliestireno, polipropileno, metacrilato de polimetilo, cloruro de polivinilo, polietileno, policarbonato, polisulfona, fluoropolímeros, poliamidas, polimetilsiloxanos, poliuretano, polisulfona, politetrafluoroetileno (TeflónTM), y elastómeros, por ejemplo. Otros sustratos adecuados son conocidos en la técnica, y también pueden utilizarse. Los sustratos pueden tener superficies no modificadas, o pueden estar tratadas de tal forma que se modifiquen las propiedades de la superficie; por ejemplo, puede llevarse a cabo una etapa de silanización en sustratos de silicio antes de su uso en operaciones de fluidos.

Los sustratos con microcanales dispuestos en ellos pueden utilizarse en una variedad de aplicaciones, como se describe mejor aquí. Por ejemplo, pueden utilizarse microcanales para el movimiento de fluidos dentro de un canal de reacción, para el movimiento de fluidos hacia un canal de reacción o cámara en un dispositivo de microfluidos, en una

muestra o medio de distribución de reactivo (por ejemplo, para el movimiento de fluidos de o desde un dispositivo), o para el almacenamiento de fluidos para utilizarse en un dispositivo (por ejemplo, un dispositivo de microfluídica).

5 Un ejemplo de un dispositivo de microfluídica que puede utilizarse según la presente invención se muestra en el Documento WO 0107159.

10 Los canales pueden tener cualquier geometría adecuada, y pueden estar dispuestos en un dispositivo de microfluidos en cualquier formato adecuado. Los canales también pueden tener cualquiera de una variedad de diferentes formas de sección, incluyendo canales tubulares, canales rectangulares, canales romboidales, canales hemisféricos o similares, o incluso formas más arbitrarias, tales como las que pueden resultar de técnicas de fabricación menos precisas, por ejemplo, la ablación por láser. Típicamente, la forma de un canal capilar variará dependiendo del tipo de sustrato utilizado y del método de fabricación. Por ejemplo, en capilares típicos de sílice fundido, el canal capilar puede ser tubular. En sistemas que emplean sustratos planos, por otra parte, los canales tendrán típicamente una forma de sección romboidal, rectangular o hemisférica, dependiendo del material de sustrato y el método de fabricación de los canales.

15 Una variedad de técnicas de fabricación son bien conocidas en la técnica de producir sistemas de canales microfabricados. Por ejemplo, cuando tales dispositivos utilizan sustratos encontrados comúnmente en la industria de los semiconductores, son fácilmente aplicables los métodos de fabricación regularmente empleados en esas industrias, por ejemplo fotolitografía, atacado químico húmedo, deposición de vapor química, pulverización por bombardeo iónico, electroformación, etc. Similarmente, están también fácilmente disponibles métodos para fabricar tales dispositivos en sustratos poliméricos, incluyendo moldeo por inyección, impresión en seco, ablación por láser, técnicas de LIGA y similares. Otras técnicas de fabricación útiles incluyen técnicas de laminación o capas, utilizadas para proporcionar estructuras de microescala intermedias, para definir elementos de un dispositivo de microescala particular. Las técnicas están también descritas en Sorba K. Ghandi, VLSI Principles: Silicon and Gallium Arsenide, NY, Wiley.

20 Típicamente, los canales tendrán una dimensión de sección interna, por ejemplo anchura, profundidad, o diámetro, de entre alrededor de 1 μm y alrededor de 3 mm, teniendo la mayoría de los canales una dimensión de sección de desde alrededor de 10 μm hasta alrededor de 1000 μm .

30 En aspectos particularmente preferidos, se utilizan sustratos de microfluído planos, que emplean múltiples canales integrados. Los dispositivos de microfluidos planos generalmente emplean una red de canales integrados fabricada en la superficie de un sustrato plano. Un segundo sustrato, que puede o no tener allí formados canales complementarios, se coloca sobre la superficie del primero para cubrir y sellar los canales, definiendo así los canales.

35 Los canales pueden disponerse de tal forma que los canales se comuniquen en una o más intersecciones, como en realizaciones en los que los reservorios de fluidos o los canales de alimentación comunican con una operación de fluido, o reacción, o canal primarios, como en la Patente de EE. UU. N° 5.858.195. Alternativamente, los canales pueden disponerse de tal forma que no se comuniquen con otros canales. Los canales pueden estar dispuestos esencialmente en una línea recta, o tener giros, tal como en los canales de serpentina. En ciertas realizaciones, un gran número de canales se disponen en paralelo, para llevar a cabo un gran número de análisis paralelos simultáneamente.

40 Un dispositivo de microfluídica puede contener también pocillos de reacción. Por ejemplo, una muestra de fluido puede hacerse fluir a través de un canal tratado según la invención hasta un pocillo de reacción, y después se lleva a cabo una reacción en el pocillo de reacción. El líquido puede entonces hacerse fluir más lejos, por ejemplo hacia una salida, otra cámara de reacción, reservorio de almacenamiento, etc.

45 Como aquí se utiliza, un sistema de movimiento de fluidos es un sistema para mover o hacer fluir fluidos a través de un microcanal. Los sistemas de movimiento de fluidos conocidos incluyen sistemas basados en presión o vacío, sistemas de electrocinética, electro-osmótica y electro-hidrodinámica (Documento WO 98/45481 y Patente de EE. UU. N° 6.046.056), así como medios de movimiento de gradiente de calor (Patente de EE. UU. N° 6.057.149). En realizaciones preferidas, se utilizan medios de movimiento de fluidos basados en presión o vacío, que pueden ser efectuados por un amplio rango de mecanismos, incluyendo el uso de microbombas, microválvulas y jeringas. Los medios de movimiento de fluidos pueden efectuar uno o varios movimientos de fluidos sucesivos, o pueden efectuar el movimiento de fluidos en flujo continuo a través de un canal.

50 Debido a la estabilidad de la cubierta de polímero a temperaturas elevadas y en condiciones de temperatura cambiantes, la invención también se lleva a cabo ventajosamente en dispositivos de microfluídica que tienen un medio de regulación de la temperatura que es capaz de calentar y/o enfriar los contenidos de un canal.

55 Opcionalmente, el dispositivo también puede contener un amplio rango de componentes adicionales, tales como medios de interfaz (por ejemplo, jeringa) para asistir en la introducción de una muestra fluida en un canal, otro dispositivo de microfluído, reservorio, almacenamiento de fluidos, dispositivo de distribución, etc. Un ejemplo de un aparato para introducir muestras fluidas en un microcanal se describe en la Publicación de Patente Internacional N° WO 00/21666. Los dispositivos pueden opcionalmente tener uno o más reservorios para el almacenamiento de componentes fluidos tales como reactivos, analitos de ensayo, etc. El dispositivo puede incluir una zona de detección en la que puede monitorizarse una señal de una muestra o una reacción bioquímica, y opcionalmente medios de detección para medir la señal.

4. Operaciones de fluidos

Los métodos de la invención, y los canales cubiertos de polímero y los dispositivos de microfluidos que contienen los canales pueden utilizarse ventajosamente en un amplio intervalo de operaciones de fluidos.

Las operaciones de fluidos incluyen, entre otras operaciones, mezclar, llevar a cabo reacciones, incubaciones, separaciones, diluciones, titulaciones, purificaciones, detecciones, mezclas, ensayos de unión, ensayos de mediciones (por ejemplo mediciones de cinética) y ensayos de cribado de fármacos. Las operaciones de fluidos también incluyen generalmente someter a un fluido a una o varias temperaturas. Las operaciones de fluidos también incluyen operaciones que implican generalmente un gran número de manipulaciones sucesivas. Las operaciones de fluidos también incluyen cualquier manipulación de fluidos en la que el fluido contiene una muestra, tal como un analito de ensayo o un reactivo, particularmente cuando el analito de ensayo o el reactivo es una biomolécula, y más preferiblemente cuando el analito de ensayo o el reactivo es un ácido nucleico o un aminoácido. Varios ejemplos de operaciones de fluidos que pueden llevarse a cabo en microcanales se describen en la Publicación de Patente Internacional N° WO 98/45481. Los ejemplos preferidos de operaciones de fluidos también incluyen la manipulación de proteínas en un canal, tal como en el campo de la proteómica, aplicaciones ejemplares de la cual se presentan en el Documento WO 0107159.

En un ejemplo, los dispositivos de microfluidos se utilizan para realizar manipulaciones de fluidos de reactivos, tal como para la combinación de reactivos para una mezcla de reacción, las porciones de reactivos en diferentes composiciones. En un aspecto, pueden realizarse diluciones de muestras o reactivos en pequeños volúmenes, particularmente diluciones realizadas de forma seriada. En otro ejemplo, pueden realizarse titulaciones, tal como la titulación de un ensayo para la normalización del ensayo. Por ejemplo, los diversos componentes de un ensayo pueden titularse para definir el intervalo dinámico en el que los componentes individuales están en el intervalo que permite obtener resultados cuantitativos. No limitados a los reactivos y a los analitos de ensayo, los dispositivos de microfluidos pueden también utilizarse para la manipulación de células, como se describe en la Publicación de Patente Internacional N° WO 99/67639. Los canales y los dispositivos de microfluidos pueden también utilizarse en ensayos de cribado de fármacos, que generalmente implican la mezcla de varios componentes, la incubación y el análisis de un resultado en una etapa de detección. Se apreciará que puede utilizarse cualquier reactivo o analito de ensayo deseado; los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, ácidos nucleicos, aminoácidos, lípidos, compuestos químicos, y más específicamente receptores o anticuerpos y sus ligandos, células y factores de crecimiento y factores inhibidores, y enzimas y sustratos. Los dispositivos de microfluidos pueden también utilizarse para la detección de cualquier analito de ensayo deseado, como en los ensayos diagnósticos. Por ejemplo, un analito de ensayo tal como una muestra de ácido nucleico o proteína, puede hacerse pasar a través de un canal en el que un aparato de detección determina la presencia o ausencia de una señal particular. Un dispositivo de microfluidos puede además contener un canal o medios para la separación de los componentes, tal como mediante electroforesis. En ciertas realizaciones, se proporciona un polímero de adsorción a superficie en presencia de una matriz de separación. En otras realizaciones, el polímero de adsorción a superficie se proporciona en una solución, esencialmente en ausencia de una matriz de separación. El polímero de adsorción a superficie puede también proporcionarse en presencia o ausencia de dicho canal de partículas libres (por ejemplo silicio), al que el polímero de adsorción a superficie es capaz de unirse.

También se apreciará que los canales y los dispositivos de microfluidos de la invención son ventajosos para muchos tipos de reacciones bioquímicas. Particularmente porque los recubrimientos de polímeros de adsorción a superficie de la invención son estables a las elevadas temperaturas necesarias para muchas reacciones, y porque los recubrimientos son estables a través del intervalo de temperaturas encontradas en las reacciones de termociclación, la invención es muy adecuada para reacciones tales como la amplificación de ácidos nucleicos y las reacciones de extensión de cebador, tales como la secuenciación o varios tipos de genotipaje. Los dispositivos y procesos según la invención hacen posible llevar a cabo, en flujo continuo, protocolos bioquímicos que incluyen una etapa con ciclado térmico. La invención es particularmente muy adecuada para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que es ampliamente utilizada en análisis genético.

La invención, que puede utilizarse en análisis genético, puede utilizarse también, sin embargo, para numerosos protocolos en el terreno de la bioquímica y la biología molecular. Así, en una realización preferida, la invención comprende un método de conducir una reacción bioquímica, en la que se forma o se proporciona una mezcla de reacción en un canal recubierto con un polímero de adsorción a superficie, y se lleva a cabo una termociclación en dicha mezcla de reacción. Ejemplos de protocolos preferidos que requieren ciclado de temperatura y que se derivan de la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), incluyen RT-PCR, PCR específica de alelo, y TaqMan PCR [Molecular Cloning to Genetic Engineering, White, B.A. Ed., en *Methods in Molecular Biology* 67: Humana Press, Totowa (1997), y la publicación titulada "PCR Methods and Applications", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1991)]. También son conocidas técnicas de LCR (Reacción en Cadena de la Ligasa), tales como LCR, Gap LCR, RT-LCR, Asymmetric Gap LCR (RT-AGLCR), Marshall R.I. *et al.* (*PCR Methods and Applications* 4:80-84, 1994, el Ensayo de Ligación de Oligonucleótidos (OLA) y PCR-OLA [Nikiforov, T., *Anal Biochem* 227(1):201-9 (1995)], [Marshall, R.I., *PCR Methods Appl.* 4(2):80-4 (1994)], [Nickerson, D.A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(22):8923-7 (1990)]. También se conocen las reacciones de secuenciación cíclica que utilizan clones o reacciones de PCR, así como reacciones de microsencuenciación (extensión de cebador de nucleótido único) (Cohen, D., Publicación de Patente Internacional N° WO 91/02087).

El ejemplo mejor conocido de una reacción de ciclado de temperatura que puede llevarse a cabo es la amplificación de ácidos nucleicos. Un método preferido en la técnica es la PCR, que incluye la utilización de una hebra de una mues-

tra de secuencia de ácido nucleico, para generar complementos de la hebra, complementos que servirán posteriormente como moldes de ácido nucleico para posteriores reacciones de ciclado. Generalmente, dos secuencias de cebadores complementarias a diferentes extremos del fragmento de ácido nucleico diana que se va a generar, se permiten hibridarse, o reasociarse, con la muestra de ácido nucleico. Cuando se incuban en presencia de una enzima polimerasa y trifosfatos de nucleósidos, los cebadores se extienden a lo largo de la secuencia diana en la dirección del cebador opuesto. Los cebadores extendidos son después disociados del molde de ácido nucleico elevando la temperatura, y el proceso se repite.

Otras reacciones preferidas para llevarse a cabo según la invención son las reacciones de secuenciación. Se conocen varias técnicas diferentes para la secuenciación de ácidos nucleicos, incluyendo el método de terminación de cadena dideoxi de Sanger (Sanger *et al.*, PNAS USA 74:5463-5467 (1977)), la secuenciación mediante hibridación (Drmanac *et al.*, Patente de EE. UU. N° 5.202.231), y el método de degradación química de Maxam-Gilbert. La secuenciación en un microcanal se describe en la Publicación de Patente Internacional N° WO 98/45481.

15 5. Adsorción de Polímeros sobre Superficies Plásticas

En una realización, la invención proporciona un método de disminuir la adsorción de materiales orgánicos sobre la superficie de los aparatos de plástico, que comprende: (a) añadir a una muestra fluida un polímero contenido en una solución acuosa; y (b) realizar una o más operaciones de fluidos en dicho aparato de plástico. Alternativamente, los métodos de la presente invención pueden aplicarse para disminuir la adsorción de materiales orgánicos sobre cualquier otra interfaz polar/no polar (por ejemplo, interfaces agua/aceite o agua/aire).

Los métodos de la invención son especialmente útiles cuando se realizan operaciones de fluidos en pequeños volúmenes. Cuando se trabaja con volúmenes pequeños, la frecuencia de interacción de moléculas orgánicas con la interfaz (por ejemplo, la interfaz líquido/sólido entre la superficie de un dispositivo de plástico y la mezcla de reacción, la interfaz líquido/líquido entre el aceite y una mezcla de reacción, o una interfaz agua/aire), se vuelve no insignificante, como consecuencia de la disminución de la distancia que las moléculas tienen para alcanzar la interfaz. Las escalas de frecuencia de interacción con volúmenes, para una geometría esférica, como $V^{1/3}$ y, al mismo tiempo, la razón interfaz a volumen (IVR) aumenta con la disminución de volumen ($IVR \sim V^1$). Consecuentemente, la probabilidad de la adsorción de moléculas orgánicas aumenta dramáticamente cuando se trabaja en pequeños volúmenes. Así, el método de la presente invención se dirige preferiblemente a realizar operaciones de fluidos en volúmenes de menos de un número entero comprendido entre 20 y $0,1 \mu\text{l}$.

La disminución de la adsorción de materiales orgánicos sobre la superficie de aparatos de plástico utilizando el método de la invención, puede dirigirse a aumentar el rendimiento de las reacciones bioquímicas. La cantidad óptima de polímero que debería añadirse a una mezcla de reacción dada de un volumen dado, puede determinarse por un método que comprende las etapas de (i) añadir a la mezcla de reacción diferentes cantidades de dicho polímero contenido en una solución acuosa; (ii) realizar la reacción en un dispositivo de plástico, y (iii) determinar la cantidad de polímero que debería añadirse para obtener el máximo rendimiento.

La disminución de la adsorción de materiales orgánicos sobre la superficie de dispositivos de plástico utilizando el método de la invención, también puede dirigirse a disminuir la contaminación de operaciones de fluido posteriores por moléculas orgánicas procedentes de la primera operación de fluidos. La cantidad óptima de polímero que debería añadirse a una muestra de fluido dada de un volumen dado, puede determinarse mediante un método que comprende: (a) añadir a la primera muestra de fluido diferentes cantidades de dicho polímero contenido en una solución acuosa; (b) realizar las sucesivas operaciones de fluidos en un dispositivo de plástico, y (c) determinar la cantidad de polímero que debería añadirse para obtener la mínima contaminación de las sucesivas operaciones de fluido por moléculas orgánicas procedentes de la primera operación de fluidos. En una realización preferida de la invención, dicha contaminación contiene la presencia no deseada de trifosfatos de desoxinucleótidos (dNTPs).

Los métodos de la invención pueden utilizarse para disminuir la adsorción de un amplio rango de moléculas orgánicas sobre la superficie de los dispositivos de plástico. Por ejemplo, las moléculas orgánicas comprenden ácidos nucleicos, aminoácidos, lípidos y moléculas químicas. Los métodos de la invención pueden utilizarse según un amplio rango de operaciones de fluidos realizadas en dispositivos de plástico, incluyendo, pero no limitándose a reacciones, incubaciones, diluciones, titulaciones, purificaciones, detecciones, mezclas, ensayos de unión, ensayos de mediciones (por ejemplo, mediciones de cinética) y ensayos de cribado de fármacos. Cualquier número o combinación de operaciones de fluidos puede realizarse según los métodos de la invención. Más específicamente, las sucesivas operaciones de fluidos pueden comprender realizar un proceso de genotipaje que consiste en reacción en cadena de la polimerasa (PCR), purificación enzimática utilizando fosfatasa alcalina de gamba (SAP) y microsecuenciación (MIS). Particularmente preferida como primera operación de fluidos es la PCR.

Los métodos de la invención pueden utilizarse para realizar operaciones de fluidos en una amplia variedad de dispositivos de plástico. Tales dispositivos incluyen, pero no se limitan a, tubos de ensayo, placas de multipocillo, placas de microtitulación, puntas de pipeta, pocillos de reacción y tubos de microcentrífuga. Tales dispositivos pueden estar hechos de, por ejemplo, siliconas (p.ej. polidimetilsiloxanos), polimetilmetacrilato, poliuretano, polivinilcloruro, poliestireno, polisulfona, policarbonato, politetrafluoroetileno, polipropileno, polietileno, polimetilpenteno, polietileno, fluoropolímeros y elastómeros. En una realización preferida, el método de la presente invención se dirige a realizar operaciones de fluidos en placas de microtitulación, que son utilizadas comúnmente en una variedad de procedimien-

tos biológicos. En general, una reacción biológica se lleva a cabo en un pocillo de una placa de microtitulación. Sin embargo, algunos procesos requieren reacciones sucesivas, y es por lo tanto eficaz y beneficioso disminuir la adsorción de materiales orgánicos sobre la superficie de los pocillos de las placas de microtitulación, para realizar dos o más reacciones sucesivas en el mismo pocillo de una única placa de microtitulación. En realizaciones particularmente preferidas, los métodos de la presente invención se dirigen a operaciones de fluidos sucesivas realizadas en placas de microtitulación de alta densidad, por ejemplo placas de 96, 384, 1536 o más pocillos.

La invención también se refiere a kits para realizar operaciones de fluidos en dispositivos de plástico, utilizando los métodos de la presente invención. Tales kits comprenden (a) una composición acuosa que contiene un polímero como el que se describe aquí; (b) reactivos para realizar operaciones de fluidos; y (c) una nota recomendando la cantidad de dicha composición que debería añadirse a los reactivos. Alternativamente, el polímero puede estar contenido en los reactivos. El kit puede dirigirse a realizar una única operación de fluidos o a un proceso que comprende varias operaciones de fluidos. La composición que contiene dicho polímero puede añadirse a todos los reactivos, o al menos a un reactivo, para realizar cualquiera de las operaciones de fluidos. En realizaciones particularmente preferidas, el kit que utiliza el método de la presente invención es un kit para realizar PCR, o para realizar un proceso que comprende una reacción de PCR. Todavía más preferiblemente, el kit que utiliza los métodos de la presente invención es un kit para realizar procesos de genotipaje.

Aunque las realizaciones preferidas de la invención han sido ilustradas y descritas, se apreciará que pueden realizarse varios cambios por cualquier experto en la técnica, sin apartarse del ámbito de la invención, como se define en las reivindicaciones anejas.

Ejemplos

Ejemplo de referencia 1

Preparación de un polímero de adsorción a superficie

Un polímero preferido, PDMA, se sintetizó según el siguiente protocolo. Se disolvieron 2,8 g de N,N-dimetilacrilamida en 30 ml de agua MiliQ, y se desgasaron durante 2 horas con nitrógeno. Posteriormente, una pareja redox que consiste en metabisulfito sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 0,451 ml, concentración de 2,5 g/l) y persulfato amónico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$, 0,451 ml, concentración de 20 g/l) se añadió a solución de acrilamida. La solución se dejó polimerizar durante 3 horas bajo agitación permanente. (Viovy, J.-L., Hourdet, D., Sudor, J., Patente Francesa N° 98 16676; J. Sudor *et al.*, *Electrophoresis*, 2001, 22:720-28). La polidimetilacrilamida (PDMA) polimerizada se purificó mediante ultrafiltración (Milipore, EE. UU.) con una membrana que tenía un corte de peso molecular de 100.000 daltons. La PDMA purificada se secó en congelación durante la noche.

Ejemplo de referencia 2

Conducción de una reacción biológica: PCR

Sustratos de microfluidos de silicio que tenían canales dispuestos en ellos, se enjuagaron con agua caliente (~90°C) antes de su utilización. Cada canal (con un volumen de 10 μl) se enjuagó con 1 ml de agua mediante una jeringa de polipropileno de 5 ml. Los sustratos se secaron después utilizando la jeringa para impulsar aire a través de los canales.

Se utilizó una micropipeta de 10 μl para rellenar los canales con mezcla de PCR. La punta del cono de la pipeta se colocó a la entrada de los canales y se inyectaron 10 μl de mezcla dentro de los canales.

Los canales que iban a ser recubiertos con PDMA recibieron una mezcla de PCR que contenía MgCl_2 (2 mM), nucleótidos dATP, dGTP, dCTP, dTTP (200 μM cada uno), cebadores directo e inverso (300 nM cada uno), TaqGold (Perkin Elmer) (0,04 U/ μl), DNA (1 ng/ μl), PDMA (0,1%) y H_2O .

Los canales que iban a ser recubiertos con BSA recibieron una mezcla de PCR que contenía MgCl_2 (2 mM), nucleótidos dATP, dGTP, dCTP, dTTP (200 μM cada uno), cebadores directo e inverso (300 nM cada uno), TaqGold (Perkin Elmer) (0,04 U/ μl), DNA (1 ng/ μl), BSA (0,5%) y H_2O .

Se utilizó una lámina de aluminio adhesiva para sellar los canales, para prevenir la evaporación durante el termociclado. La lámina se puso solo en la cara superior del chip. La cara inferior del chip se dejó "limpia", para proporcionar la mejor transferencia térmica durante el termociclado.

Una vez sellado, el chip se colocó sobre un bloque plano en un termociclador Tetrad (MJ Research). Se puso una minúscula gota de aceite entre el chip y el bloque plano, para proporcionar un mejor contacto térmico y, como consecuencia, una mejor transferencia de calor.

El chip con la mezcla de PCR se sometió a ciclado, después de la preactivación de la Taq polimerasa (94°C durante 10 minutos), durante 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 60 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C.

ES 2 267 828 T3

La mezcla se recuperó después de los canales, y el resultado se analizó mediante electroforesis en gel (gel de agarosa), y mediante cuantificación del DNA de doble cadena con la tinción fluorescente PicoGreen intercalada.

Ejemplo 1

5

Microsecuenciación en una Placa de Microtitulación

El protocolo descrito a continuación permite realizar un procedimiento de genotipaje en una placa de microtitulación de 384 pocillos, sin cambiar de pocillo.

10

Microsecuenciación

Se preparó una mezcla de PCR con el co-polímero de bloque Synperonic P105 (concentración final de 0,5%), 2 μ l de DNA (1 ng/ μ l), 2 μ l de TaqGold (0,02 U/ μ l) y 2 μ l de cebadores de PCR (300 nM). Se preparó una mezcla de purificación con 4 μ l de SAP (0,4 U/ μ l) y 4 μ l de EXO (0,2 U/ μ l). Se preparó una mezcla de MIS con 8 μ l de Thermostaq (0,05 U/ μ l), 8 μ l de oligonucleótidos de MIS (0,5 μ M) y 8 μ l de ddNTPS marcados (9 nM).

15

Se añadieron 2 μ l de mezcla de PCR al pocillo de una placa de microtitulación. La placa de microtitulación, después de preactivación de la Taq polimerasa (94°C durante 10 minutos), se sometió a ciclado durante 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 60 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C. Se realizó una etapa de elongación al final del ciclado (72°C durante 7 minutos). Se añadieron 2 μ l de mezcla de purificación al mismo pocillo, y la placa de microtitulación se incubó durante 30 minutos a 37°C y durante 10 minutos a 94°C. Finalmente, se añadieron 4 μ l de mezcla de MIS al mismo pocillo, y la placa de microtitulación se incubó durante 1 minuto a 94°C, y se sometió a ciclado durante 20 ciclos de 15 segundos a 55°C, 5 segundos a 72°C y 10 segundos a 94°C.

25

Análisis de los Datos de Genotipaje

Utilizando el programa propiedad de Genset, se analizó la señal fluorescente del procedimiento de microsecuenciación. Sin embargo, un problema comúnmente encontrado en el procedimiento de genotipaje es la adsorción de desoxinucleótidos (dNTPs), sobre la superficie de las placas de microtitulación, particularmente durante el proceso de genotipaje. La adsorción de los dNTPs añadidos durante la primera etapa del procedimiento de genotipaje (por ejemplo, PCR), sobre la superficie de una placa de microtitulación, los hace menos accesibles a la fosfatasa alcalina de gamba (SAP), durante las etapas posteriores (por ejemplo, purificación enzimática), y los dNTPs adsorbidos no se desfosforilan. Como los dNTPs se liberan de la superficie de la placa de microtitulación a temperatura elevada (por ejemplo, durante la desnaturalización de las enzimas EXO y SAP o durante el ciclado de temperatura de las reacciones de MIS), éstos contaminan dramáticamente la tercera etapa del proceso de genotipaje (es decir, MIS). Como resultado, el producto oligonucleótido de MIS puede extenderse más de una base (dNTPs); así, los ddNTPs SNP específicos marcados fluorescentemente pueden incorporarse incorrectamente al producto oligonucleótido, varias bases aguas abajo del lugar SNP de interés, creando señales no específicas (Véanse Figuras 5 y 6).

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método de disminuir la adsorción de un material orgánico a una superficie, que comprende las etapas de:

- a) proporcionar una mezcla de fluido que contiene un material orgánico;
- b) añadir una cantidad efectiva de un polímero de adsorción a superficie a dicha muestra de fluido, donde dicho polímero de adsorción a superficie es un co-polímero de bloque que contiene óxidos de polipropileno y óxidos de polietileno;
- c) poner en contacto dicha muestra de fluido que contiene dicho material orgánico y dicho polímero de adsorción a superficie; y
- d) realizar una operación de fluidos;

donde dicho polímero de adsorción a superficie:

- (i) se une no covalentemente a dicha superficie
- (ii) reduce la cantidad de adsorción de dicho material orgánico a dicha superficie; y
- (iii) no es uno de los reactivos de dicha operación de fluidos, o se añade en exceso respecto de la cantidad normalmente añadida a dicha muestra de fluido.

2. Un método según la reivindicación 1, en el que el peso molecular de dicho polímero de adsorción a superficie es de al menos 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 ó 5×10^6 daltons.

3. Un método según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicho polímero de adsorción a superficie comprende un polímero seleccionado de: poliestireno, polipropileno, metacrilato de polimetilo, cloruro de polivinilo, penteno de polimetilo, polietileno, policarbonato, polisulfona, fluoropolímeros, poliamidas, siliconas, y elastómeros.

4. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que:

- a) dicha muestra de fluido es una solución acuosa; o
- b) dicha muestra de fluido es una solución no acuosa; o
- c) dicha operación de fluido es una reacción de PCR o una reacción de extensión de cebador; o
- d) dicho material orgánico contiene dNTPs; o
- e) dicho polímero de adsorción a superficie tiene un peso molecular de al menos 1×10^5 daltons; o
- f) dicha superficie es parte de una placa de microtitulación; o
- g) dicha superficie es parte de un canal; o
- h) dicha operación de fluido se realiza en un dispositivo de microfluídica; o
- i) dicho material orgánico es ácidos nucleicos, dNTPs, ddNTPs, aminoácidos, proteínas, lípidos, o compuestos químicos.

5. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho material orgánico se selecciona de: ácidos nucleicos, aminoácidos, lípidos, marcadores fluorescentes, receptores, anticuerpos, ligandos de receptores, ligandos de anticuerpos, células, factores de crecimiento, inhibidores de crecimiento, enzimas, y sustratos de enzimas.

6. Un método de determinar la cantidad de un polímero de adsorción a superficie para ser añadido a una operación de fluidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende las etapas de:

- a) proporcionar un aparato que contiene una superficie;
- b) añadir una muestra de fluido y un polímero de adsorción a superficie a dicho aparato, donde dicho polímero de adsorción a superficie es un co-polímero de bloque que contiene óxidos de polipropileno y óxidos de polietileno;
- c) realizar una o más operaciones de fluidos en el mismo dicho aparato; y

ES 2 267 828 T3

d) determinar la cantidad óptima de dicho polímero de adsorción a superficie capaz de obtener el máximo rendimiento de reacción o la mínima cantidad de adsorción de dicho material orgánico a dicha superficie.

5 7. Un método según la reivindicación 6, en el que el peso molecular de dicho polímero de adsorción a superficie es de al menos 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 ó 5×10^6 daltons.

8. Un método de mantener o regenerar dinámicamente una cubierta de polímero adsorbido sobre una superficie de un microcanal, que comprende las etapas de:

- 10 a) proporcionar un canal dispuesto en un sustrato
- b) introducir en dicho canal al menos dos muestras de fluido, creando así dos zonas de muestra de fluido, donde cada una de dichas al menos dos muestras de fluido contienen una muestra de interés; y
- 15 c) proporcionar al menos una zona de separación de fluidos localizada entre dos de dichas zonas de muestra de fluido;

donde:

- 20 (i) al menos una zona de muestra de fluido contiene un polímero de adsorción a superficie, o
- (ii) al menos una zona de separación contiene un polímero de adsorción a superficie, o
- 25 (iii) al menos una zona de separación y al menos una zona de muestra de fluido contiene un polímero de adsorción a superficie, o
- (iv) cada una de dichas zonas de muestra de fluido contiene un polímero de adsorción a superficie, o
- (v) cada zona de separación contiene un polímero de adsorción a superficie, o
- 30 (vi) cada zona de separación y cada zona de muestra de fluido contiene un polímero de adsorción a superficie;

donde dicho polímero de adsorción a superficie es un co-polímero de bloque que contiene óxidos de polipropileno y óxidos de polietileno.

35 9. Un método según la reivindicación 8, en el que:

- a) al menos una primera zona de muestra de fluido contiene dicho polímero de adsorción a superficie, que es capaz de unirse no covalentemente a una superficie de dicho canal; o
- 40 b) al menos una zona de separación de fluidos está localizada entre dos zonas de muestra de fluido que contienen una muestra de interés.

45 10. Un método según las reivindicaciones 8 ó 9, en el que el peso molecular de dicho polímero de adsorción a superficie es de al menos 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , ó 5×10^6 daltons.

50

55

60

65

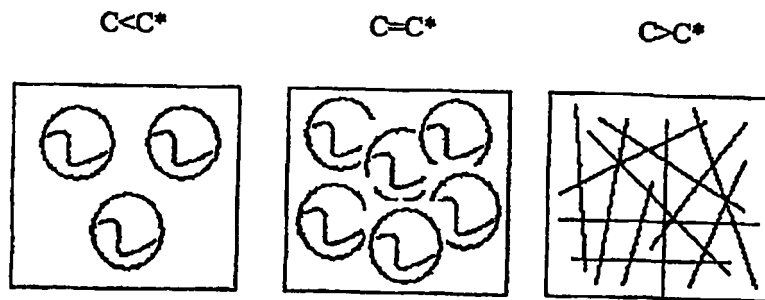


FIG 1

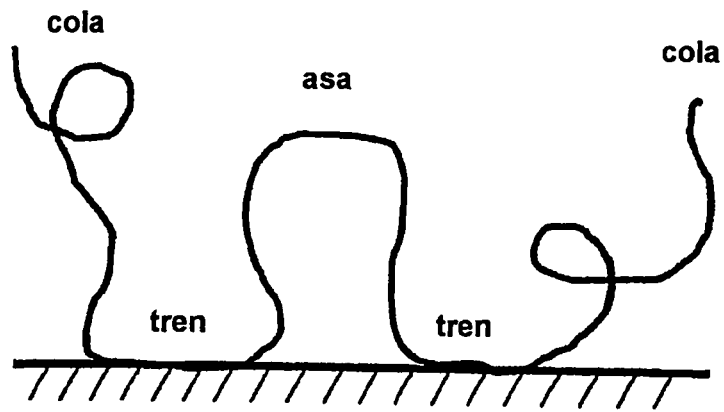


FIG 2

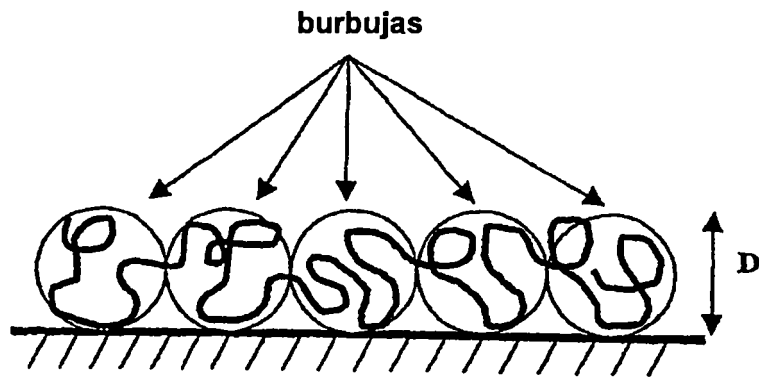


FIG 3

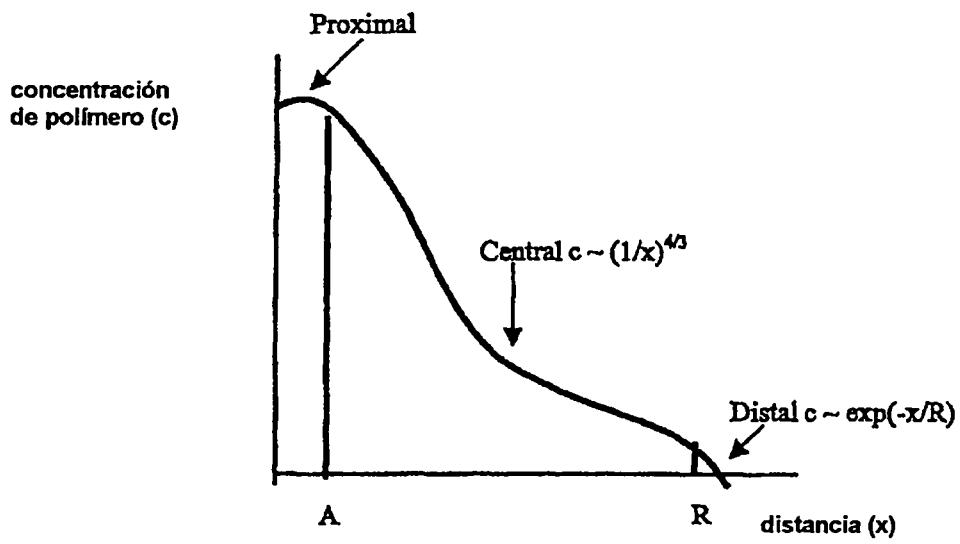


FIG 4

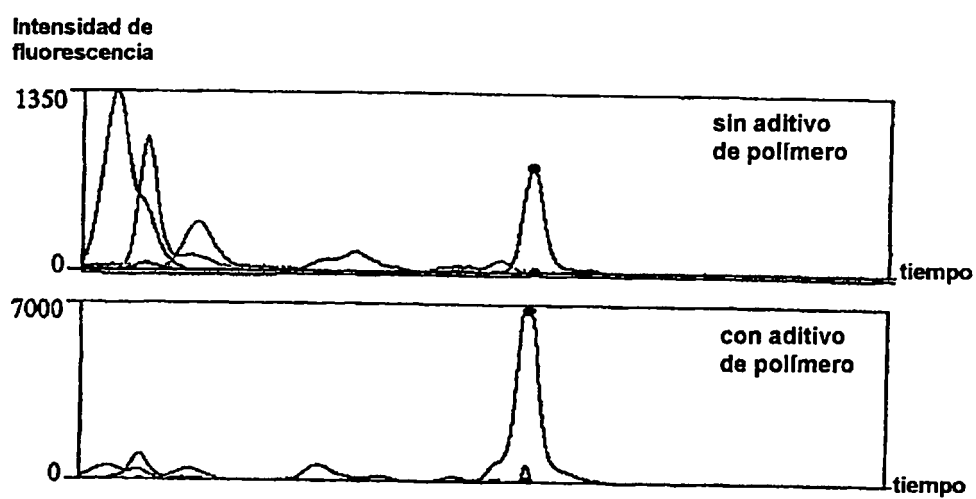


FIG 5

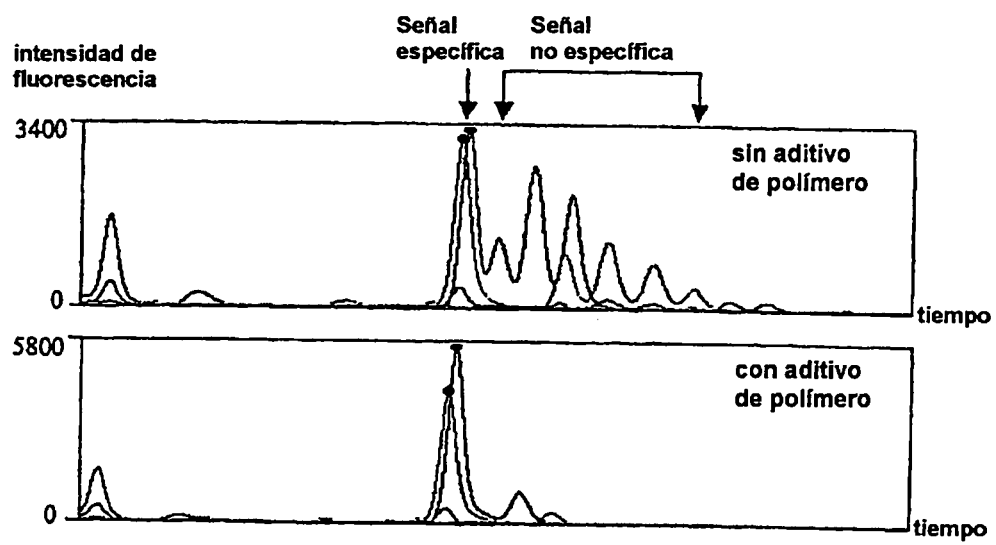


FIG 6