(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 272 306**

(51) Int. Cl.:
B01L 3/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **00951631 .1**
(86) Fecha de presentación : **21.06.2000**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1187678**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **20.03.2002**

(54) Título: **Dispositivo de puesta en práctica de una tarjeta de análisis, tarjeta de análisis y procedimiento que los pone en práctica.**

(30) Prioridad: **22.06.1999 FR 99 08117**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2007

(73) Titular/es: **Biomerieux S.A.**
Chemin de l'Orme, 6
69280 Marcy L'Etoile, FR

(72) Inventor/es: **Colin, Bruno;**
Dachaud, Jacques;
Privat, Marie y
Paris, Cécile

(74) Agente: **González Palmero, Fe**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Dispositivo de puesta en práctica de una tarjeta de análisis, tarjeta de análisis y procedimiento que los pone en práctica.

La presente invención se refiere a un dispositivo de puesta en práctica de una tarjeta de análisis en cuyo interior se realizan cadenas de reacción y transferencias de fluidos bajo el efecto de medios de control internos de la tarjeta; dicha tarjeta comprende al menos dos cadenas de reacción en paralelo, estando constituida cada cadena por al menos dos transferencias de fluidos en serie. La invención se refiere igualmente a una tarjeta de análisis y al procedimiento que pone en práctica el dispositivo y la tarjeta.

La invención se refiere igualmente a un sistema de transferencia de un flujo de fluido entre dos dispositivos o tarjetas, así como a un procedimiento de transferencia de un flujo de fluido entre dos dispositivos o tarjetas, tales como los descritos anteriormente.

Más concretamente, la invención se refiere a un dispositivo o consumible, constituido, por ejemplo por una tarjeta, que permite llevar a cabo una reacción o al menos dos reacciones de manera paralela en su interior, que está constituido por una superficie superior y una superficie inferior unidas una a la otra por un borde. Cada una de las reacciones, aisladas físicamente la una de la otra, se efectúa en al menos un canal independiente en el que puede generarse un flujo de fluido por medios de transferencia.

El estado de la técnica está constituido por el documento US-A-4.585.623 que tiene como objeto un aparato para realizar rápidamente en un lugar único ensayos químicos o inmunoquímicos. Este aparato comprende un cuerpo de plástico moldeado que puede miniaturizarse y que presenta varios tubos que contienen reactivos, conteniendo un tubo la muestra y alojando un tupo de menor tamaño la reacción. Al estar asociado cada tubo a un pistón, es posible introducir el aparato en un autómata programable.

Este aparato es relativamente voluminoso aún cuando la miniaturización sea posible, puesto que ha de preverse la posición de dicho aparato así como diferentes bielas que van a permitir accionar los pistones. Además, con un aparato de este tipo sólo puede efectuarse una única reacción, si han de realizarse varias reacciones, habrán de preverse varios aparatos, así como el tiempo para cargarlos con los reactivos y las muestras adecuadas.

El documento WO-A-97/27324 se refiere a un casete para llevar a cabo en paralelo reacciones, que comprende una abertura de entrada y una abertura de salida para la transferencia de la o las muestras a introducir en el casete. Determinadas zonas del casete son de una construcción particular (cámara de Bursapak, válvula de pistón, válvula de bola), permitiendo, bajo la acción de una fuerza exterior continua, mantener cerrado un canal.

No obstante, esta construcción comprende numerosos inconvenientes. Los dos inconvenientes principales residen, por una parte, en los riesgos de contaminación interna del casete debido al hecho de que se almacena a presión atmosférica antes de su utilización y, por otra parte, en los medios que accionan el casete en el nivel de las cámaras de Bursapak, las válvulas de pistón y las válvulas de bola, que necesitan una presencia constante, en tiempo e intensidad, para mantener los canales en cuestión en posición cerrada. Esta contaminación o el no mantenimiento en posición cerrada de dichos canales pueden llevar a errores posteriores en el momento de la utilización del casete. En resumen, dicho mantenimiento en posición cerrada necesita un equipo pesado y costoso que hace que el coste de utilización de tales casetes sea prohibitivo.

El documento US-A-5863801 describe una tarjeta de análisis con varias cadenas de reacción que comprende una pluralidad de válvulas.

Las cadenas de reacción permiten obtener una reacción de una única y misma naturaleza en las diferentes cadenas de reacción. Así, puede utilizarse una tarjeta de análisis de este tipo para comparar los resultados obtenidos en los testigos positivos y negativos, al ser similares las condiciones de reacción. Por el contrario, un dispositivo de este tipo no permite intercambios entre las cadenas de reacción. Además, esta tarjeta de análisis únicamente comprende una cámara de reacción por cadena de reacción, estando el resto de compartimientos destinados al almacenamiento de los reactivos. Por consiguiente, al no producirse ninguna reacción en el nivel de los compartimientos de almacenamiento, no pueden obtenerse varias reacciones en una misma cadena de reacción.

Según la presente invención, el dispositivo propuesto soluciona el conjunto de problemas enumerados anteriormente proponiendo un consumible o una tarjeta de análisis fiable poco costoso de fabricar y particularmente simple de utilizar, ya que las válvulas una vez accionadas no necesitan una acción exterior para mantenerse en esta posición.

Con este fin, la presente invención se refiere a un dispositivo de puesta en práctica de una tarjeta de análisis según la presente invención, que comprende al menos un accionador por cadena de reacción de la tarjeta, y todos los accionadores se encuentran a una distancia constante entre sí, y, preferiblemente, los accionadores, soportados por una misma rampa, son equidistantes, el dispositivo comprende medios de avance de la tarjeta con respecto a los accionadores, y/o comprende medios de avance de dichos accionadores con respecto a dicha tarjeta, y cada accionador puede accionarse independientemente de los otros.

Según una variante de realización, las acciones de los accionadores sobre la tarjeta se efectúan de manera sensiblemente perpendicular:

- a la superficie de dicha tarjeta, en la que actúan los accionadores, y/o
- a los movimientos de la tarjeta y del accionador, uno con respecto al otro.

También se describe un dispositivo en el que se monta el conjunto de accionadores sobre una única rampa y cada accionador puede accionarse independientemente de los otros.

Según una variante de realización, la rampa es sensiblemente rectilínea, sensiblemente perpendicular a los movimientos de los accionadores, descritos anteriormente, y/o sensiblemente perpendicular a los movimientos de la tarjeta y/o del dispositivo con respecto a la tarjeta.

La presente invención se refiere igualmente a una tarjeta de análisis en cuyo interior se realizan cadenas de reacción y se realizan transferencias de fluidos bajo el efecto de medios de control internos de la tarjeta, dicha tarjeta comprende:

- al menos dos cadenas de reacción en paralelo, estando constituida cada cadena por al menos dos transferencias de fluidos en serie,
- al menos dos válvulas por cadena de reacción, permitiendo las válvulas controlar las transferencias de fluidos en serie en el interior de un canal, de un nivel (A, B, C) inicial hacia un nivel (B, C, D) subsiguiente, correspondiendo cada nivel a al menos un tratamiento;

cada válvula está constituida por al menos un medio que puede deformarse por un accionador y conlleva directa o indirectamente el cierre de dicho canal, tal como una película flexible que recubre toda o parte de la cara superior y/o inferior de la tarjeta de análisis, y una traslación de la posición de dos válvulas que pertenecen a dos cadenas de reacción diferentes y que permiten la transferencia de fluidos de un primer nivel (A ó B) hacia un segundo nivel (B ó C) permite obtener la posición de dos válvulas subsiguientes que pertenecen a esas dos cadenas de reacción diferentes y que permiten la transferencia de fluidos del segundo nivel (B ó C) hacia un tercer nivel (C ó D), de manera que:

- la distancia entre dos válvulas que pertenecen a esas dos cadenas de reacción es constante, sea cual sea el nivel (A, B, C) inicial a partir del cual se efectúa la transferencia de fluidos controlada por dichas válvulas;
- la distancia entre las dos válvulas que pertenecen a una misma cadena de reacción es constante de una cadena de reacción a la otra.

La presente invención se refiere igualmente a una tarjeta de análisis según la reivindicación 1 puesta en práctica por el dispositivo anterior.

Según un modo de realización, la implantación de los medios de control de una misma cadena de reacción es sensiblemente rectilínea, y la implantación de los medios de control de transferencias de fluidos, asociados a una posición de la rampa, definida anteriormente, es idéntica a la implantación de los medios de control asociados a otra posición de dicha rampa.

En el caso en que la cadena de reacción comprenda al menos un compartimiento de salida, un compartimiento de llegada, un canal de fluido que une los dos compartimientos, una válvula que ejerce la función de medio de control ubicado sobre dicho canal de fluido, permitiendo dicha válvula controlar sobre dicho canal un flujo de fluido generado por un medio de transferencia, la disposición de las válvulas en la tarjeta de análisis permite el paso de dicho flujo de fluido entre el compartimiento de salida y el compartimiento de llegada simultáneamente en el conjunto de las cadenas de reacción.

Según un modo de realización, las válvulas se disponen según un eje sensiblemente rectilíneo y a una distancia constante las unas de las otras, preferiblemente, las válvulas son equidistantes.

Según un modo de realización, el eje es perpendicular a un lado de la tarjeta de análisis.

Según un modo de realización, cada válvula está constituida por al menos un medio que puede deformarse y conlleva directa o indirectamente el cierre del canal, tal como una película flexible que recubre toda o parte de la cara superior y/o inferior de la tarjeta de análisis.

Según un modo de realización, al menos uno de los compartimentos está asociado a al menos un volumen tampón, y el volumen tampón está situado sobre la cara opuesta de la tarjeta de análisis con respecto al compartimiento al que se asocia.

Según un modo de realización, cada compartimiento que contiene al menos un reactivo, que debe ponerse en contacto con la muestra o una alícuota de esta muestra, comprende medios de mantenimiento de posición de una

pastilla, constituida por un aglomerado del o de los reactivos, estando el medio de mantenimiento de posición a una distancia del fondo de dicho compartimiento.

La invención se refiere finalmente a un procedimiento que pone en práctica el dispositivo y la tarjeta anteriormente mencionados, que consiste en efectuar las etapas siguientes:

- generar una variación de presión en el interior de dicha tarjeta con respecto al exterior, y preferiblemente una depresión,
- introducir al menos una muestra a analizar en la tarjeta,
- hacer transitar cada muestra o alícuota de muestra con vistas al análisis, y
- sacar de dicha tarjeta, o conservar en la misma, una parte de cada muestra introducida.

Según una variante, el análisis consiste en efectuar las operaciones siguientes:

- desnaturalización de ADN y/o ARN,
- captura de ADN y/o ARN sobre partículas magnéticas,
- amplificación de dichos ADN y/o ARN, y
- lectura de cada muestra o alícuota de muestra con vistas a saber si ha tenido lugar la amplificación.

Según una variante, el análisis consiste en efectuar previamente una extracción, por lisis celular de las células contenidas en una muestra recogida.

Según una variante, el análisis consiste en efectuar, antes de la desnaturalización y después de la extracción, una purificación de la muestra extraída.

Según una variante, el análisis consiste en analizar, tras la amplificación, la naturaleza de los transcritos por hibridación sobre un biochip.

Según una variante y durante el análisis, la tarjeta funciona en posición inclinada o vertical.

Preferiblemente, la tarjeta de análisis se desplaza durante las diferentes etapas y/u operaciones de manera secuencial.

Todavía preferiblemente, la tarjeta se desplaza siguiendo dos ejes perpendiculares para enfrentar las válvulas y los medios de accionamiento de las válvulas.

Las figuras adjuntas a la memoria se dan a título indicativo y no tienen en ningún momento un carácter limitativo en cuanto al alcance de las reivindicaciones. Estas figuras permitirán comprender mejor la presente invención:

la figura 1 presenta una vista frontal de una tarjeta de análisis según la invención.

La figura 2 representa una vista frontal idéntica a la figura 1, pero que constituye el nivel de desnaturalización de los ADN y/o ARN obtenidos en la extracción, y eventualmente en la purificación.

La figura 3 representa un vista frontal idéntica a la figura 1, pero poniendo en evidencia el segundo nivel de la tarjeta, que constituye el nivel de captura de los ADN y/o ARN por las partículas magnéticas y su lavado.

La figura 4 representa una vista frontal idéntica a la figura 1, pero poniendo en evidencia el tercer nivel de la tarjeta, que constituye el nivel de amplificación de dichos ADN y/o ARN.

Finalmente, la figura 5 representa una vista frontal idéntica a la figura 1, pero poniendo en evidencia el cuarto nivel de la tarjeta, que constituye el nivel de lectura de la realización de la amplificación y de transferencia de una parte de la muestra hacia otras funciones, tales como la fragmentación, el marcado, la hibridación sobre chip biológico o biochip y la lectura para el análisis final.

La presente invención descrita en las figuras está destinada particularmente a permitir un análisis de una muestra en biología molecular. Se refiere a una tarjeta 1 que comprende un borde 2 que delimita dos superficies planas paralelas una con respecto a la otra, sin referencia en las figuras.

En la figura 1 se observa que la parte superior de dicha tarjeta 1 está constituida por una pista 3 que comprende sobre toda su longitud un determinado número de señales 4 ópticas. Igualmente, se observa sobre los lados de la tarjeta 1, es decir en el nivel del borde 2, la presencia de un determinado número de orificios. Sobre la parte izquierda, existe

un orificio 5 de entrada de una muestra a analizar. Sobre la parte derecha de dicha tarjeta, se señala igualmente la presencia de tres orificios de los cuales uno, referencia 65, ejerce la función de salida de una parte de la muestra a analizar. En realidad, la tarjeta 1, una vez utilizada, contiene siempre una parte de la muestra analizada. Sólo la parte restante va a poder salir para efectuar otros análisis.

De manera más precisa, dicha tarjeta 1 representada en esta figura 1 se sitúa entre una etapa inicial en la que las células biológicas se destruyen en el nivel de sus membranas con el fin de extraer el ADN y/o el ARN que contienen, también puede tener lugar eventualmente una purificación, y una etapa final en las que se someten a prueba los ácidos nucleicos sobre biochips de ADN o ARN por hibridación y detección.

Un procedimiento de extracción de este tipo, según la etapa inicial, puede estar descrito, por ejemplo, en las solicitudes de patente FR97/12164 presentada el 23 de septiembre de 1997 y FR98/09583 presentada el 23 de julio de 1998 por el solicitante. Para que la extracción sea más eficaz, también es posible efectuar una purificación de la muestra, según la solicitud de patente FR98/04878 presentada el 18 de abril de 1998 por el solicitante.

Según la etapa final, los ácidos nucleicos se tratan a continuación, por fragmentación y/o marcado, para poder detectarse sobre un biochip. Esto se describe de manera adecuada en la solicitud de patente FR98/07870 presentada el 17 de junio de 1998.

La tarjeta permite, según la invención, analizar el ADN y/o el ARN extraído según los procedimientos mencionados anteriormente. Así, en esta figura 1 se indica que, de manera sensible, tal como se representa a la derecha, existen cuatro niveles A a D en el interior de la tarjeta 1. Por supuesto, estos niveles no son limitativos, es decir, es posible tener más compartimientos o más válvulas u otros elementos, en función de un análisis complementario que se desee realizar. En esta figura, la muestra a analizar se trata desde arriba hacia abajo, esto no es limitativo.

Así, la parte A de la tarjeta 1 constituye el primer nivel en el que el ADN y/o el ARN se desnaturalizan, es decir, que las dos hebras de ADN se separan entre sí y/o que la hebra de ARN se "limpia", es decir, que se eliminan las estructuras secundarias.

En una segunda etapa, la parte B de la tarjeta 1 constituye el segundo nivel, que es un nivel de captura, es decir, que los ADN y/o ARN se capturan por partículas magnéticas imantadas en sí mismas. Estas partículas magnéticas no están representadas en estas figuras. En el nivel de ese segundo nivel, también puede efectuarse un lavado para eliminar las sustancias que no se han capturado por las partículas magnéticas imantadas y que por tanto no interesan. Al final de esta etapa se efectúa una precipitación con sales de los ADN y/o ARN con respecto a las partículas magnéticas mediante, por ejemplo, una acción química; después las partículas magnéticas se imantan a continuación solas, lo cual permite liberar los ácidos nucleicos que pasan al tercer nivel.

Ese tercer nivel está dividido en dos etapas distintas, que se realizan según dos compartimientos situados uno al lado del otro. En el primer compartimiento se efectúa una mezcla con las sustancias necesarias para la amplificación, sustancias bien conocidas por el experto en la técnica, tal como oligonucleótidos, cebadores y otras, y un segundo compartimiento en el que existe una enzima que permite amplificar la mezcla de ácidos nucleicos diana con los cebadores y los oligonucleótidos, etc.

Cuando la amplificación se realiza en la parte C, los transcritos se transfieren a la parte D en la que se efectúa una lectura en presencia, eventualmente, de un marcador. Esta lectura, en función del resultado positivo o negativo, conllevará la transferencia o no de una parte de la muestra biológica recuperada, abajo del todo de esta tarjeta 1, a través de la salida 65 hacia otra tarjeta o una prolongación de esta misma tarjeta.

Por otra parte, conviene señalar que la etapa inicial de extracción de ADN e incluso de purificación puede efectuarse sobre una tarjeta complementaria y/u otro aparato, o bien sobre una prolongación de esta misma tarjeta 1. La transferencia de una tarjeta de análisis hacia otra tarjeta de análisis se describe en la solicitud de patente FR98/11383 presentada el 8 de septiembre de 1998 por el solicitante.

Cuando la muestra ha salido parcialmente en el nivel de la salida 65, ésta se recupera con el fin de permitir el tratamiento de los ADN y/o ARN para que puedan ponerse en contacto con un biochip, tal como se explica en la solicitud de patente FR98/07870 presentada el 17 de junio de 1998 por el solicitante.

Las figuras 2 a 5 muestran de manera más precisa, y en un contexto aislado, cada nivel A a D.

El nivel A se representa de manera adecuada en la figura 2. Se señala que en el nivel de la entrada 5 de la muestra a analizar, existe un canal 6 de entrada en el que la muestra líquida puede penetrar según F1.

Conviene indicar desde este momento que, en estas figuras, el conjunto de trazos representados en líneas continuas se sitúa sobre la cara anterior de la tarjeta 1, mientras que los trazos discontinuos representan elementos situados en la cara posterior de la tarjeta 1. Sin embargo, es posible considerar de hecho efectuar orificios de paso para determinados elementos tales como los compartimientos, este es el caso, por ejemplo, para los compartimientos 39 y 59 de aislamiento térmico, tal como se expondrá más adelante.

El flujo F1 líquido de la muestra penetrará entonces en el interior de la tarjeta 1 en cuanto la válvula 7 de entrada se abra. En la solicitud de patente FR98/11383 presentada el 8 de septiembre de 1998 por el demandante, ya mencionada anteriormente, se describe una válvula de este tipo. Una vez pasada la válvula 7, el canal 6 se prolonga hasta un separador 8 de la muestra, separador 8 que ejerce la función de descargador y de distribuidor de la muestra entre el conjunto de cadenas de reacción. En el modo de realización representado en estas figuras, se señala que existen tres cadenas de reacción. Por supuesto, es necesario que la distribución del líquido sea equilibrada entre cada cadena de reacción. Para hacerlo, la configuración del conjunto de canales 9 de transferencia primaria del primer nivel de la tarjeta 1, situado entre el separador 8 y cada compartimiento 10 de desnaturalización del primer nivel, responde a un determinado número de criterios que se exponen de manera adecuada en la solicitud de patente FR99/03035 presentada el 9 de marzo de 1999, tal como se representa bien, por ejemplo, en la figura 1 de esta solicitud. Esto se aplicará igualmente más adelante para los otros niveles B y C, tendiendo el nivel D un compartimiento 60 de convergencia.

Cada canal 9 de transferencia primaria desemboca entonces en un compartimiento 10 de desnaturalización, tendiendo éste una posición que facilita el vertido del líquido en su interior por simple gravedad, al tiempo que se utiliza la capilaridad mediante un medio 11 de drenaje que ya ha sido objeto de descripción en las solicitudes de patente FR99/03034 y FR99/03035, presentadas el mismo día 9 de marzo de 1999 por el solicitante.

Por tanto, la muestra a analizar se guía entonces con el fin de que caiga en el fondo del compartimiento 10. Ese compartimiento 10 está asociado a un aparato que permite romper las burbujas 12 que siempre pueden crearse en el momento del paso de una muestra biológica por los pequeños canales 6, 9, etc.

Este aparato 12 comprende un orificio 13 de comunicación que une el aparato 12 a dos volúmenes 15 tampón situados a ambos lados del compartimiento 10. La comunicación entre el orificio 13 y los volúmenes 15 tampón se efectúa mediante un canal 14 de comunicación. El aparato para romper las burbujas 12, el orificio 13 de comunicación, el canal 14 de comunicación y el volumen 15 tampón ya se han descrito adecuadamente en la solicitud de patente FR99/03035 ya mencionada anteriormente.

La única diferencia reside en la ubicación de los volúmenes 15 tampón con respecto al compartimiento 10. Por otra parte, se señala en esta figura que, entre dos compartimientos 10 adyacentes, existen dos volúmenes 15 tampón, pero igualmente entre los dos volúmenes 15 tampón adyacentes, un compartimiento 39 de aislamiento térmico del primer nivel. Esta configuración permite tener entre dos compartimientos 10 adyacentes tres volúmenes de aire que ejercen la función de aislantes térmicos, dado que en ese primer nivel se efectúa una desnaturalización del ADN y/o el ARN que necesita una elevación en temperatura que va de 90 a 100ºC. Esto permite evitar calentamientos demasiado importantes en el nivel de las muestras líquidas y biológicas que pudieran no solamente desnaturalizar, sino destruir, los ácidos nucleicos que se desean analizar.

Al ser el volumen de los compartimientos 10 muy importante, se observa la presencia en el centro de cada compartimiento 10 de un pasador 16 que garantiza la dotación de rigidez a una película flexible situada sobre la cara anterior de la tarjeta 1, y que permite delimitar la red de canalizaciones y de compartimientos. Este dispositivo ya se ha descrito en la solicitud de patente mencionada anteriormente FR 99/03035.

La tarjeta 1 funciona sensiblemente en una posición vertical, la muestra a analizar que se ha introducido en cada compartimiento 10 debe ubicarse en la parte baja de ese compartimiento 10. En este nivel existe un canal de transferencia secundaria del primer nivel con la referencia 17. Ese canal permite transferir las alícuotas de la muestra del primer nivel A hacia el segundo nivel B a través de una válvula 18 de acceso a ese segundo nivel. El líquido se evacúa según F2.

En la figura 3, se representa de manera explícita el segundo nivel B, en el que se encuentra la válvula 18 y la muestra a analizar, en forma de alícuotas en tres partes, que se introduce según F2. Después de esta válvula 18, existe una canal 19 de transferencia primaria del segundo nivel B que permite el tránsito de la muestra biológica desde la válvula 19 hacia el compartimiento 20 de captura. En este nivel se encuentran las mismas características que en el primer nivel, es decir, un medio 21 de drenaje, un aparato 22 para romper las burbujas, un orificio 23 de comunicación, orificio de comunicación que permite unir, a través de una canal 24 de comunicación, el aparato 22 con dos volúmenes 25 tampón.

Se observa, por el contrario, que no existe ningún pasador para conferir rigidez en el centro del compartimiento 20, sino tres pasadores 26 pequeños que forman un triángulo sensiblemente isósceles. Esta configuración es particularmente interesante ya que en este nivel, cuando todavía no se ha utilizado la tarjeta 1, existe una pastilla que está circunscrita geográficamente entre estos pasadores 26, pastilla que no se representa en esas figuras. En efecto, esta pastilla está constituida por partículas magnéticas aglomeradas que van a utilizarse más tarde en el procedimiento.

El objetivo de esta configuración es permitir un vertido de cada alícuota de la muestra a analizar en el interior del compartimiento 20 sin que las partículas magnéticas se disuelvan inmediatamente y lleguen así a llenar desde el principio los canales subyacentes. Por supuesto, dicha tarjeta está en posición sensiblemente vertical o inclinada como ocurría en el caso anterior y como ocurrirá en siguiente caso.

En realidad, para que la pastilla de partículas magnéticas se disuelva, es necesario que el nivel de líquido sea suficientemente elevado para alcanzar el primer pasador 26. Esto retrasa la disolución de las partículas magnéticas, lo cual es particularmente ventajoso.

Se señala igualmente en la parte inferior la presencia de dos canales que permiten dirigir la muestra biológica o cualquier otro líquido que llegara a transitar por el compartimiento 20. Se trata, para cada compartimiento 20, de una válvula 28 situada a la izquierda y de una válvula 68 situada a la derecha. La válvula 28 permite el acceso al tercer nivel mediante un canal de transferencia secundaria del segundo nivel con la referencia 27. En efecto, el segundo circuito está constituido por un canal 64 individual de salida de líquido, sea cual sea, situado en el compartimiento 20, ese canal termina en el nivel de una válvula 68 de salida del segundo nivel que se une en sí misma a un canal 69 colectivo de salida de este segundo nivel B.

En realidad, el conjunto de canales 64 desembocan todos en este canal 69 que es colectivo y todos pueden estar abiertos o cerrados independientemente por válvulas 68 soportadas por cada canal 64. El canal 69 desemboca en una salida 70 que permite la evacuación según F7 de cualquier líquido situado en el compartimiento 20. El objetivo de este segundo circuito 64, 68, 69 y 70 es permitir efectuar, por una parte, una puesta en vacío del conjunto de los primeros y segundos niveles, lo que permite, después de haber creado el vacío, volver a cerrar el conjunto de válvulas 68 y, por otra parte, el tránsito sin otra energía del líquido, sea cual sea, es decir, de la muestra biológica que va a someterse a prueba o del líquido de lavado. Además, este circuito permite efectuar igualmente un lavado, que se utiliza en ese circuito con referencia 64 y 68 a 70. Así, cuando las partículas magnéticas se disuelven en la muestra a analizar, las partículas magnéticas van a poder fijar, sobre su periferia, los ácidos nucleicos. Tales partículas magnéticas se han descrito, por ejemplo, en las solicitudes de patente WO-A-97/45202 presentada con fecha de prioridad del 24 de mayo de 1996 y PCT/FR99/00011 presentada con fecha de prioridad del 6 de enero de 1998 por el solicitante.

Cuando los ácidos nucleicos se fijan sobre las partículas magnéticas, es posible, por imantación sensiblemente perpendicular al plano de la tarjeta 1, inmovilizar las partículas magnéticas así asociadas a los ácidos nucleicos sobre las paredes de la tarjeta 1 o de la película flexible y efectuar un aclarado, simplemente por introducción de un líquido ya sea por la abertura 5 de entrada mencionada anteriormente, aunque eventual y preferiblemente por la entrada 61 de un fluido inerte que permite el lavado del conjunto de los niveles A y B, efectuándose la evacuación del fluido, por supuesto, en el nivel de la salida 70 según F7. De hecho, es preferible la introducción de un fluido inerte según F6 en el nivel de la entrada 61, puesto que se trata de una red en asociación con el canal 62 de entrada del fluido inerte y de la válvula 63 de entrada de un fluido inerte que es completamente independiente de la red de entrada de la muestra a analizar, lo cual es una garantía de seguridad de cara al análisis posterior a realizar.

Ha de observarse que el canal 62 desemboca en el separador 8 de la muestra, lo que va a permitir el conjunto de esta limpieza en los niveles A y B.

Por medio de la válvula 28, el líquido a analizar va a transferirse a continuación según F3 hacia el tercero C, lo cual se representa adecuadamente en la figura 4. Así, las tres alícuotas de la muestra a analizar pasan según F3 a través de la válvula 28 abierta y se dirigen hacia el compartimiento 30 a través del canal 29 de transferencia primaria del tercer nivel C de dicha tarjeta.

Se señala en el tercer nivel C la presencia de un número de compartimientos dos veces superior, ya que cada línea de reacción comprende en serie dos pequeños compartimientos con referencias 30 y 40, cuyas funciones se describirán más adelante. El compartimiento 30 es idéntico al compartimiento 40. Ambos comprenden características semejantes a los compartimientos descritos anteriormente con referencias 10 y 20. Se observa, por ejemplo, la presencia de medios 31 y 41 de drenaje, aparatos 32 y 42 para romper burbujas, orificios 33 y 43 de comunicación, canales 34 y 44 de comunicación situados entre el aparato 32 ó 42 y dos compartimientos 35 y 45 tampón para cada canal 34 y 44. Estas disposiciones son semejantes a los compartimientos anteriores.

De manera interna a los compartimientos 30 ó 40, se señala la presencia de pasadores 36 y 46, que son semejantes al segundo nivel B y a los pasadores 26, es decir, que para cada compartimiento 30 ó 40 existen tres pasadores 36 ó 46, formando estos pasadores los vértices de un triángulo isósceles que puede contener una pastilla de producto que se aclarará más adelante.

Entre los dos compartimientos 30 y 40 de cada línea de reacción existe un canal 37 de transferencia intermedia del tercer nivel C. A lo largo de este canal se dispone una válvula 38 que permite el acceso al segundo compartimiento 40 del tercer nivel C. En realidad, y como en el caso anterior, el canal 37 une la parte inferior del primer compartimiento 30 a la parte sensiblemente superior del segundo compartimiento 40. En la parte inferior del compartimiento 40 existe un canal 47 de transferencia secundaria del tercer nivel C de la tarjeta 1. Este canal 47 desemboca en una válvula 48 que permite el acceso al cuarto nivel D. En este nivel, la muestra a analizar sale según F4.

Tal como se ha mencionado anteriormente, cada compartimiento 30 y 40 comprende en su interior una pastilla de producto, tendiendo el conjunto de compartimientos 30 y 40 como función amplificar los ADN y/o ARN que se han extraído, desnaturalizado y capturado en las etapas anteriores. Para hacerlo, el primer compartimiento 30 comprende en el interior de sus pasadores, una pastilla que contiene productos que permiten la amplificación, tales como oligonucleótidos o cebadores de amplificación eventualmente dotados de promotores, etc. En ese nivel, la mezcla se efectúa por dilución cuando el líquido sube al compartimiento 30 y entra en contacto con esta pastilla tal como se describió

anteriormente en el segundo nivel B con las partículas magnéticas. Este es también el caso en el nivel del segundo compartimiento 40 en el que los pasadores 46 contienen otra pastilla que encierra la enzima que va a permitir activar la reacción de amplificación.

Ha de señalarse que en el nivel del tercer nivel C, no están presentes los compartimientos 39 y 59 de aislamiento térmico. Éstos se han descrito para los niveles primero y segundo. La razón es que en el nivel de esta amplificación no hay que aplicar una temperatura importante, si se utiliza, por ejemplo, una técnica de amplificación mediada por transcripción, tal como la TMA. Por supuesto, podría utilizarse cualquier otra técnica de amplificación como la PCR, a la que puede ser necesario añadir igualmente, y a la manera de los niveles A y B, esos compartimientos 39 y 59 de aislamiento térmico descritos anteriormente.

El nivel D, que constituye el cuarto nivel, se representa adecuadamente en la figura 5. Se señala de nuevo la presencia de la válvula 48 y la llegada del líquido según F4. En este nivel existe un pequeño canal 49 de transferencia primaria del cuarto nivel D. Este canal 49 desemboca en el compartimiento 50 de lectura mediante un medio 51 de drenaje. Se observa que la estructura de este compartimiento es diferente de los compartimientos 10, 20, 30 y 40 anteriores.

Se señala la presencia, perpendicularmente al canal 49 de transferencia, de un canal 57 de transferencia secundaria del cuarto nivel D. Al estar el canal de transferencia primaria en posición sensiblemente vertical o inclinada, el líquido que se desplaza según F4, tendrá tendencia por simple gravedad a dar preferencia al paso desde la válvula 48 hacia el compartimiento 50. Así pues, en ese momento no habrá transferencia de fluido en el nivel del canal 57. El compartimiento 50 de lectura va a llenarse entonces hasta un punto superior de dicho compartimiento 50 en el que existe un aislador 56 que está constituido por un canal zigzagueante y que comprende un determinado número de alargamientos que impiden al líquido, que llena el compartimiento 50, desplazarse más allá del aislador 56. Así, el aislador 56 desemboca en un compartimiento de convergencia, también designado compartimiento 60 final, situado abajo del todo de la tarjeta y que se encuentra casi sobre toda la longitud de dicha tarjeta 1. Cuando el aislador 56 efectúa su papel, el líquido que llega según F4 habrá llenado completamente el compartimiento 50 y el resto de la muestra pasará a continuación por el canal 57 de transferencia secundaria mencionado anteriormente. Entonces, el compartimiento 50 se utilizará a continuación para efectuar una lectura, es decir, para revelar si la amplificación se ha efectuado bien en la etapa anterior, es decir, en el nivel C.

El conjunto de alícuotas de muestra que pasa por los canales 57 se encuentra en el compartimiento 60 de convergencia. El compartimiento 60 final, a la manera de los compartimientos mencionados anteriormente y con las referencias 10, 20, 30 y 40 pero no 50, comprende igualmente un aparato 52 para romper las burbujas representado a la izquierda de esta figura. Este compartimiento comprende igualmente un orificio 53 de comunicación que permite la comunicación entre el aparato 52 y el conjunto de los volúmenes 55 tampón. Se observa que hay cinco volúmenes 55 tampón, situados por detrás del plano de la tarjeta, mientras que el aislador 56 está en ese plano. El conjunto de volúmenes 55 tampón se une al orificio 53 mediante un canal 54 de comunicación.

El compartimiento 60 de convergencia es bastante voluminoso, de ahí la presencia de un determinado número de pasadores 58 para conferir rigidez de la película flexible, película que no se representa en las figuras.

En el extremo derecho del compartimiento 60 de convergencia existe un canal 66 llamado canal de salida de una parte de la muestra a analizar que va a dirigirse o bien hacia otra parte de la tarjeta 1, o bien hacia otra tarjeta tal como se representa en la figura. Así, el canal 66 vuelve a subir y desemboca en una válvula 67 de salida en comunicación a su vez con una salida 65, por la que puede salir una parte de la muestra a analizar según F5.

Referencias

1. Tarjeta
2. Borde de la tarjeta 1
3. Pista de la tarjeta 1
4. Señal óptica
5. Entrada de la muestra a analizar
6. Canal de entrada de la muestra a analizar
7. Válvula de entrada de la muestra a analizar
8. Separador de la muestra
9. Canal de transferencia primaria del primer nivel de la tarjeta 1

10. Compartimiento de desnaturalización o de primer nivel
11. Medio de drenaje
12. Aparato para romper las burbujas
13. Orificio de comunicación entre el aparato 12 y al menos un volumen 15 tampón
14. Canal de comunicación entre el aparato 12 y al menos un volumen 15 tampón
15. Volumen tampón
16. Pasador para conferir rigidez a la película flexible
17. Canal de transferencia secundaria del primer nivel de la tarjeta 1
18. Válvula de acceso al segundo nivel
19. Canal de transferencia primaria del segundo nivel de la tarjeta 1
20. Compartimiento de captura o de segundo nivel
21. Medio de drenaje
22. Aparato para romper las burbujas
23. Orificio de comunicación entre el aparato 22 y al menos un volumen 25 tampón
24. Canal de comunicación entre el aparato 22 y al menos un volumen 25 tampón
25. Volumen tampón
26. Pasador
27. Canal de transferencia secundaria del segundo nivel de la tarjeta 1
28. Válvula de acceso al tercer nivel
29. Canal de transferencia primaria del tercer nivel de la tarjeta 1
30. Primer compartimiento de amplificación del tercer nivel
31. Medio de drenaje
32. Aparato para romper las burbujas
33. Orificio de comunicación entre el aparato 32 y al menos un volumen 35 tampón
34. Canal de comunicación entre el aparato 32 y al menos un volumen 35 tampón
35. Volumen tampón
36. Pasador
37. Canal de transferencia intermediaria del tercer nivel de la tarjeta 1
38. Válvula de acceso al segundo compartimiento 40 del tercer nivel
39. Compartimiento de aislamiento térmico del primer nivel
30. Segundo compartimiento de amplificación del tercer nivel
41. Medio de drenaje
42. Aparato para romper las burbujas
43. Orificio de comunicación entre el aparato 42 y al menos un volumen 45 tampón

44. Canal de comunicación entre el aparato 42 y al menos un volumen 45 tampón
45. Volumen tampón
46. Pasador
47. Canal de transferencia secundaria del tercer nivel de la tarjeta 1
48. Válvula de acceso al cuarto nivel
49. Canal de transferencia primaria del cuarto nivel
50. Compartimiento de lectura y de transferencia del cuarto nivel
51. Medio de drenaje
52. Aparato para romper las burbujas
53. Orificio de comunicación entre el aparato 52 y al menos un volumen 55 tampón
54. Canal de comunicación entre el aparato 52 y al menos un volumen 55 tampón
55. Volumen tampón
56. Aislador del compartimiento 50
57. Canal de transferencia secundaria del cuarto nivel de la tarjeta 1
58. Pasador para conferir rigidez a la película flexible
59. Compartimiento de aislamiento térmico del segundo nivel
60. Compartimiento de convergencia o final
61. Entrada de un fluido inerte para desplazar la muestra a analizar o lavar
62. Canal de entrada de un fluido inerte
63. Válvula de entrada de un fluido inerte
64. Canal individual de salida del segundo nivel de la tarjeta 1
65. Salida de una parte de la muestra a analizar
66. Canal de salida de una parte de la muestra a analizar
67. Válvula de salida de la tarjeta 1
68. Válvula de salida del segundo nivel de la tarjeta 1
69. Canal común de salida del segundo nivel de la tarjeta 1
70. Salida asociada al canal 69 común

A. Parte de la tarjeta que constituye el primer nivel de desnaturalización
B. Parte de la tarjeta que constituye el segundo nivel de captura
C. Parte de la tarjeta que constituye el tercer nivel de amplificación
D. Parte de la tarjeta que constituye el cuarto nivel de lectura y de transferencia

F1. Entrada de la muestra a analizar
F2. Transferencias de alícuotas de la muestra entre los niveles primero y segundo
F3. Transferencias de alícuotas de la muestra entre los niveles segundo y tercero

F4. Transferencias de alícuotas de la muestra entre los niveles tercero y cuarto

F5. Transferencias de alícuotas de la muestra entre los niveles cuarto y quinto

F6. Entrada de un fluido inerte para desplazar la muestra a analizar o lavar

F7. Salida de una partir de la muestra a analizar.

REIVINDICACIONES

1. Tarjeta de análisis en cuyo interior se realizan cadenas de reacción y transferencias de fluidos bajo el efecto de medios de control internos de la tarjeta (1); dicha tarjeta comprende:

- al menos dos cadenas de reacción en paralelo, estando constituida cada cadena por al menos dos transferencias de fluidos en serie,

- al menos dos válvulas por cadena de reacción, permitiendo las válvulas controlar las transferencias de fluidos en serie en el interior de un canal, de un nivel (A, B, C) inicial hacia un nivel (B, C, D) subsiguiente, correspondiendo cada nivel a al menos un tratamiento;

cada válvula está constituida por al menos un medio que puede deformarse por un accionador y conlleva directa o indirectamente el cierre de dicho canal, tal como una película flexible que recubre toda o parte de la cara superior y/o inferior de la tarjeta de análisis, y una traslación de la posición de dos válvulas que pertenecen a dos cadenas de reacción diferentes y que permiten la transferencia de fluidos de un primer nivel (A ó B) hacia un segundo nivel (B ó C) permite obtener la posición de dos válvulas subsiguientes que pertenecen a estas dos cadenas de reacción diferentes y que permiten la transferencia de fluidos del segundo nivel (B ó C) hacia un tercer nivel (C ó D), de manera que:

- la distancia entre dos válvulas que pertenecen a estas dos cadenas de reacción es constante, sea cual sea el nivel (A, B, C) inicial a partir del cual se efectúa la transferencia de fluidos controlada por dichas válvulas;

- la distancia entre las dos válvulas que pertenecen a una misma cadena de reacción es constante de una cadena de reacción a la otra.

2. Tarjeta según la reivindicación 1, **caracterizada** porque cada cadena de reacción comprende al menos un compartimiento de salida, un compartimiento de llegada, un canal de fluido que une los dos compartimientos, permitiendo la válvula ubicada sobre dicho canal de fluido controlar sobre dicho canal un flujo de fluido generado por un medio de transferencia, y porque la disposición de las válvulas sobre la tarjeta (1) de análisis permite el paso de dicho flujo de fluido entre el compartimiento de salida y el compartimiento de llegada simultáneamente en el conjunto de las cadenas de reacción.

3. Tarjeta de análisis según la reivindicación 2, **caracterizada** porque las válvulas se disponen según un eje sensiblemente rectilíneo y de manera equidistante las unas respecto a las otras.

4. Tarjeta de análisis según la reivindicación 3, **caracterizada** porque el eje sensiblemente rectilíneo es perpendicular a un lado de la tarjeta (1) de análisis.

5. Tarjeta de análisis según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, **caracterizada** porque al menos uno de los compartimientos está asociado a al menos un volumen tampón, y porque el volumen tampón está situado sobre la cara opuesta de la tarjeta de análisis con respecto al compartimiento al que se asocia.

6. Tarjeta de análisis según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada** porque cada compartimiento que contiene al menos un reactivo, que debe ponerse en contacto con la muestra o una alícuota de esa muestra, comprende medios de mantenimiento de posición de una pastilla, constituida por un aglomerado del o de los reactivos, estando el medio de mantenimiento de posición a una distancia del fondo de dicho compartimiento.

7. Tarjeta de análisis según la reivindicación 6, **caracterizada** porque en el centro de todos o parte de los compartimientos, existen pequeños pasadores (26) para conferir rigidez que constituyen los medios de mantenimiento de posición, preferiblemente tres, formando conjuntamente un triángulo sensiblemente isósceles.

8. Tarjeta de análisis según la reivindicación 7, **caracterizada** porque estos pasadores (26) circunscriben geográficamente una pastilla que contiene partículas, preferiblemente partículas magnéticas.

9. Dispositivo de puesta en práctica de una tarjeta (1) de análisis según una de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende al menos un accionador por cadena de reacción de la tarjeta (1), y todos los accionadores se encuentran a una distancia constante entre sí y, preferiblemente, los accionadores, soportados por una misma rampa, son equidistantes, el dispositivo comprende medios de avance de la tarjeta (1) con respecto a los accionadores, y/o comprende medios de avance de dichos accionadores con respecto a dicha tarjeta (1), y cada accionador puede accionarse independientemente de los otros.

10. Dispositivo según la reivindicación 9, **caracterizado** porque las acciones de los accionadores sobre la tarjeta (1) se efectúan de manera sensiblemente perpendicular:

- a la superficie de dicha tarjeta (1), en la que actúan los accionadores, y/o

- a los movimientos de la tarjeta (1) y del accionador, uno con respecto al otro.

11. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10, **caracterizado** porque el conjunto de los accionadores se monta sobre una única rampa, y porque la rampa es sensiblemente rectilínea, sensiblemente perpendicular a los movimientos de los accionadores y/o sensiblemente perpendicular a los movimientos de la tarjeta y/o del dispositivo con respecto a la tarjeta.

12. Procedimiento de puesta en práctica de la tarjeta (1) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y del dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, **caracterizado** porque consiste en efectuar las etapas siguientes:

- generar una variación de presión en el interior de dicha tarjeta (1) con respecto al exterior, y preferiblemente una depresión,
- introducir al menos una muestra a analizar en la tarjeta (1),
- hacer transitar cada muestra o alícuota de muestra con vistas al análisis, y
- sacar de dicha tarjeta (1), o conservar en la misma, una parte de cada muestra introducida.

13. Procedimiento según la reivindicación 12, **caracterizado** porque el análisis consiste en efectuar las operaciones siguientes:

- desnaturalización de ADN y/o ARN,
- captura de ADN y/o ARN sobre partículas magnéticas,
- amplificación de dichos ADN y/o ARN, y
- lectura de cada muestra o alícuota de muestra con vistas a saber si ha tenido lugar la amplificación.

14. Procedimiento según la reivindicación 13, **caracterizado** porque el análisis consiste en efectuar previamente una extracción por lisis celular de las células contenidas en una muestra recogida.

15. Procedimiento según la reivindicación 14, **caracterizado** porque el análisis consiste en efectuar, antes de la desnaturalización y después de la extracción, una purificación de la muestra extraída.

16. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, **caracterizado** porque el análisis consiste en analizar, tras la amplificación, la naturaleza de los transcritos por hibridación sobre un biochip.

17. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, **caracterizado** porque, durante el análisis, la tarjeta funciona en posición inclinada o vertical.

18. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 17, **caracterizado** porque la tarjeta de análisis se desplaza durante las diferentes etapas y/u operaciones de manera secuencial.

19. Procedimiento según la reivindicación 18, **caracterizado** porque la tarjeta se desplaza siguiendo dos ejes perpendiculares para enfrentar las válvulas y los medios de accionamiento de las válvulas.

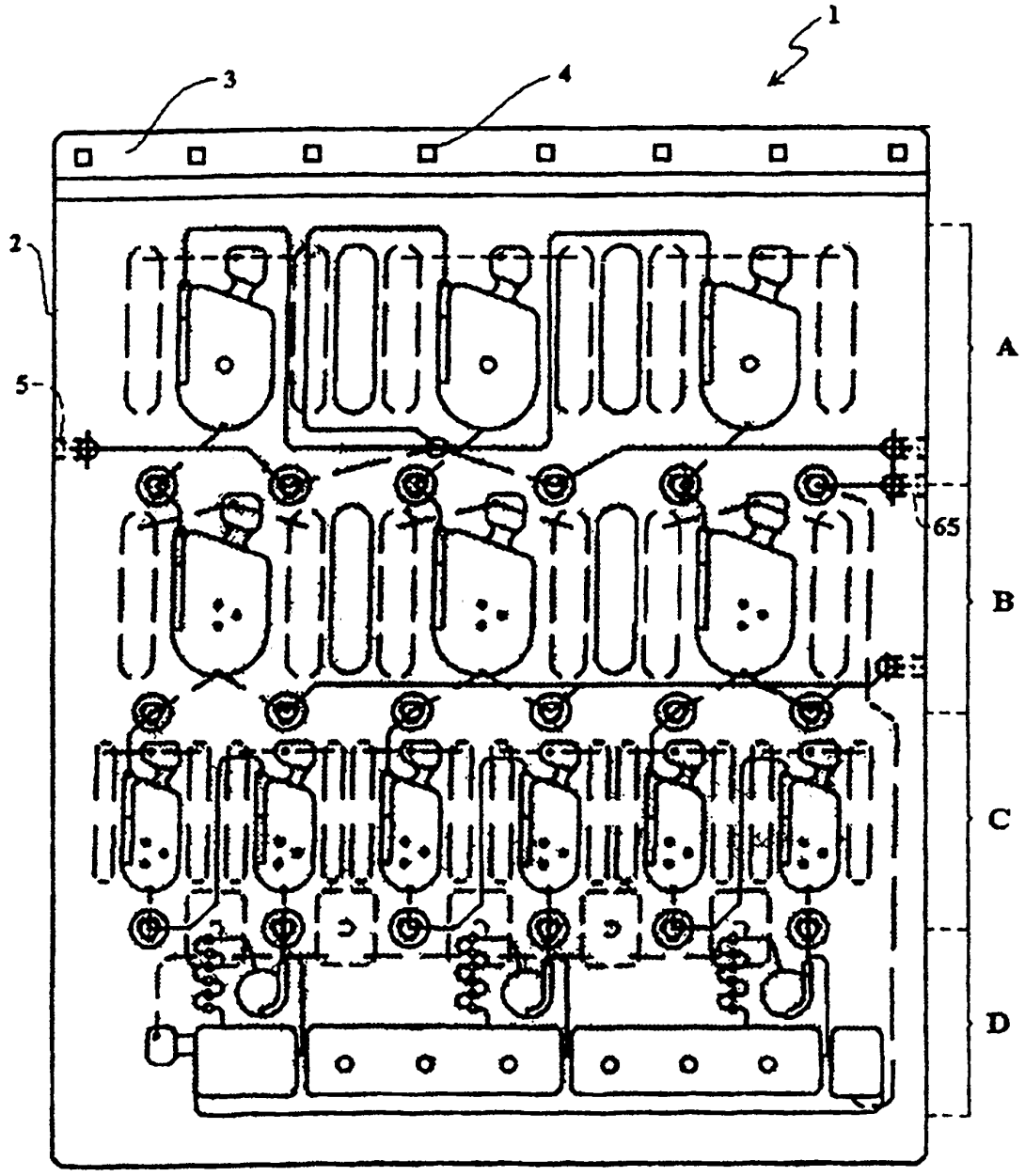


Fig. 1

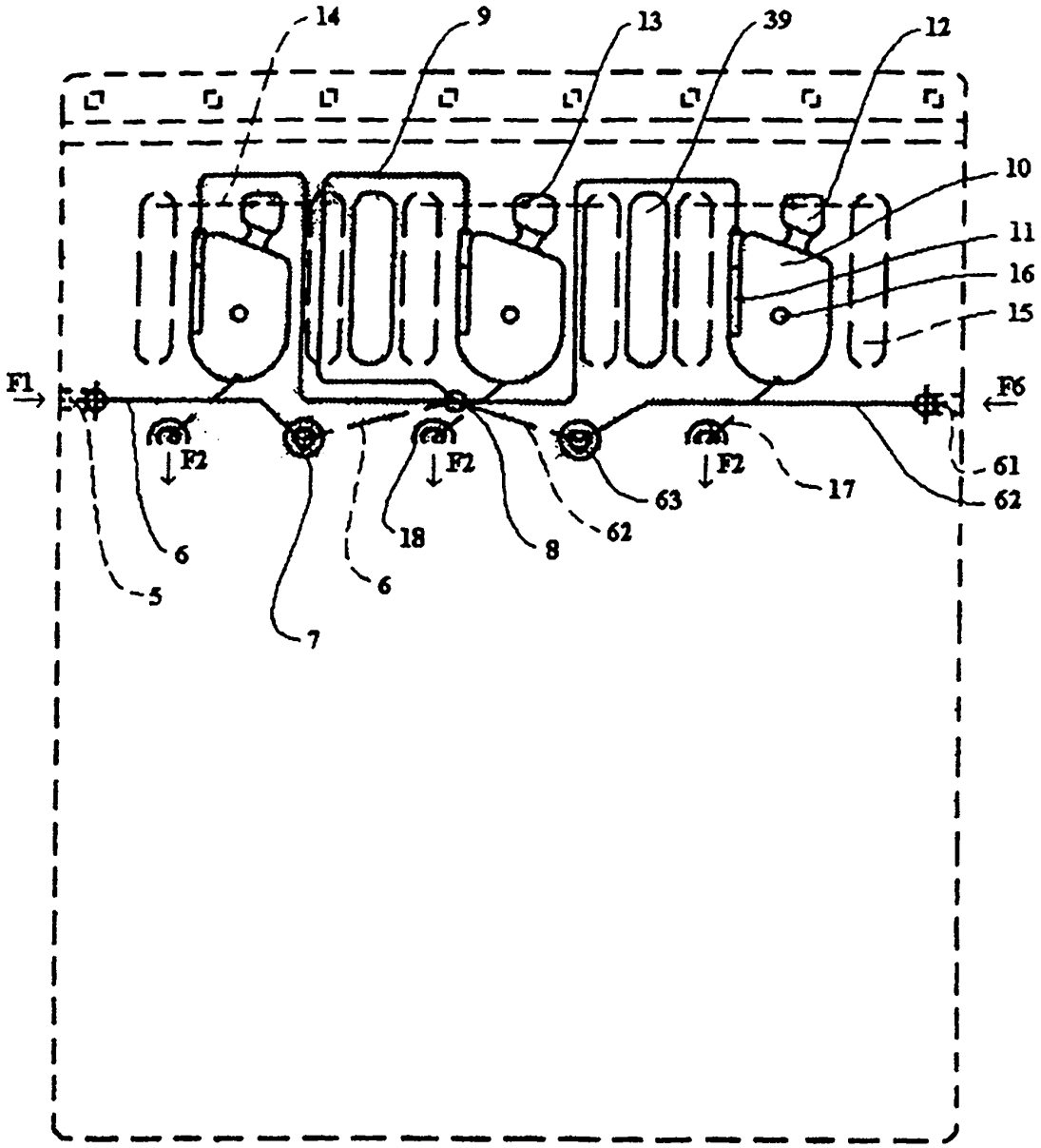


Fig. 2

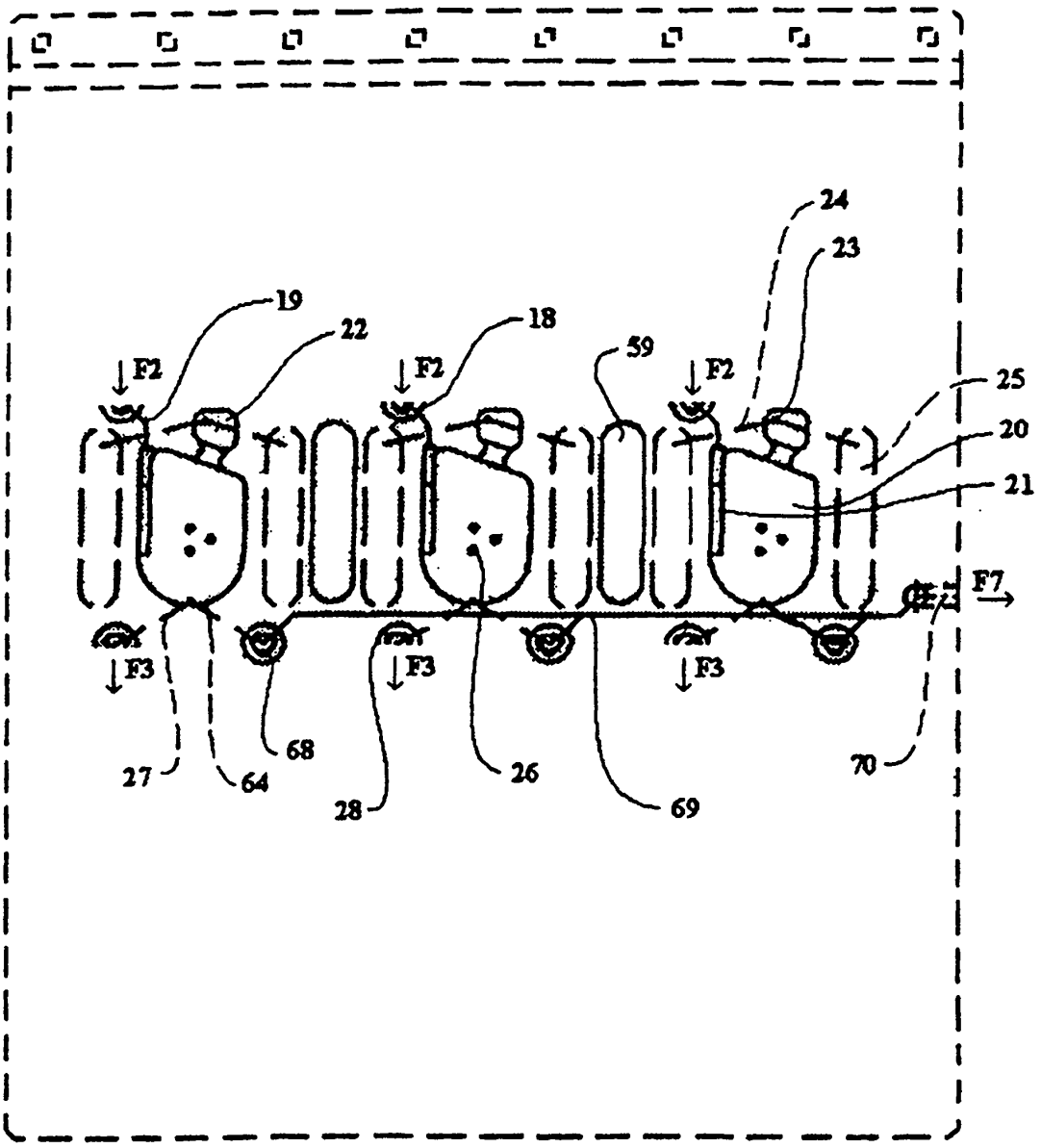


Fig. 3

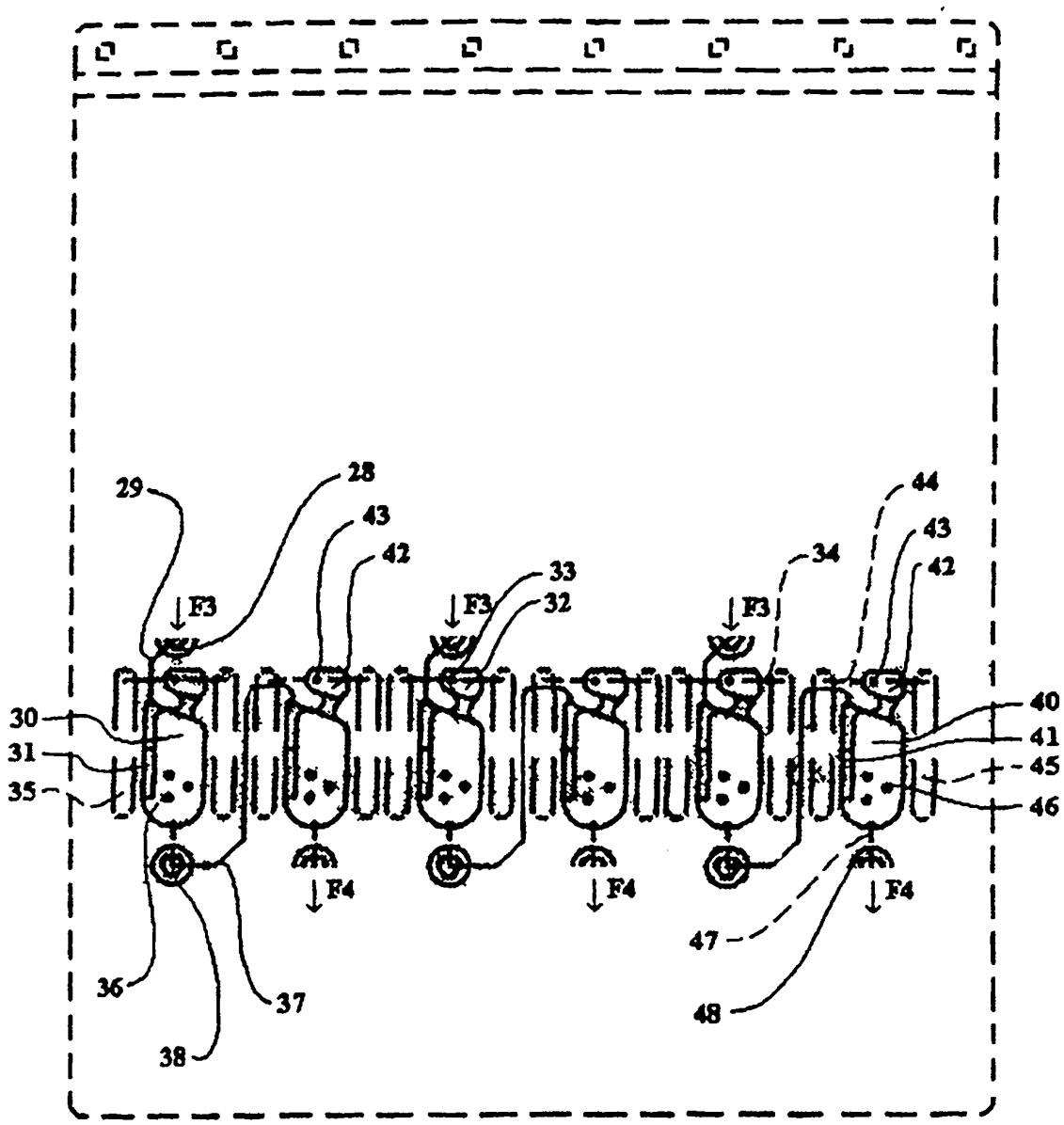

29
28
43
42
33
32
34
44
43
42
F3
F3
F3
30
31
35
40
41
45
46
F4
F4
F4
36
37
38
47
48

Fig. 4

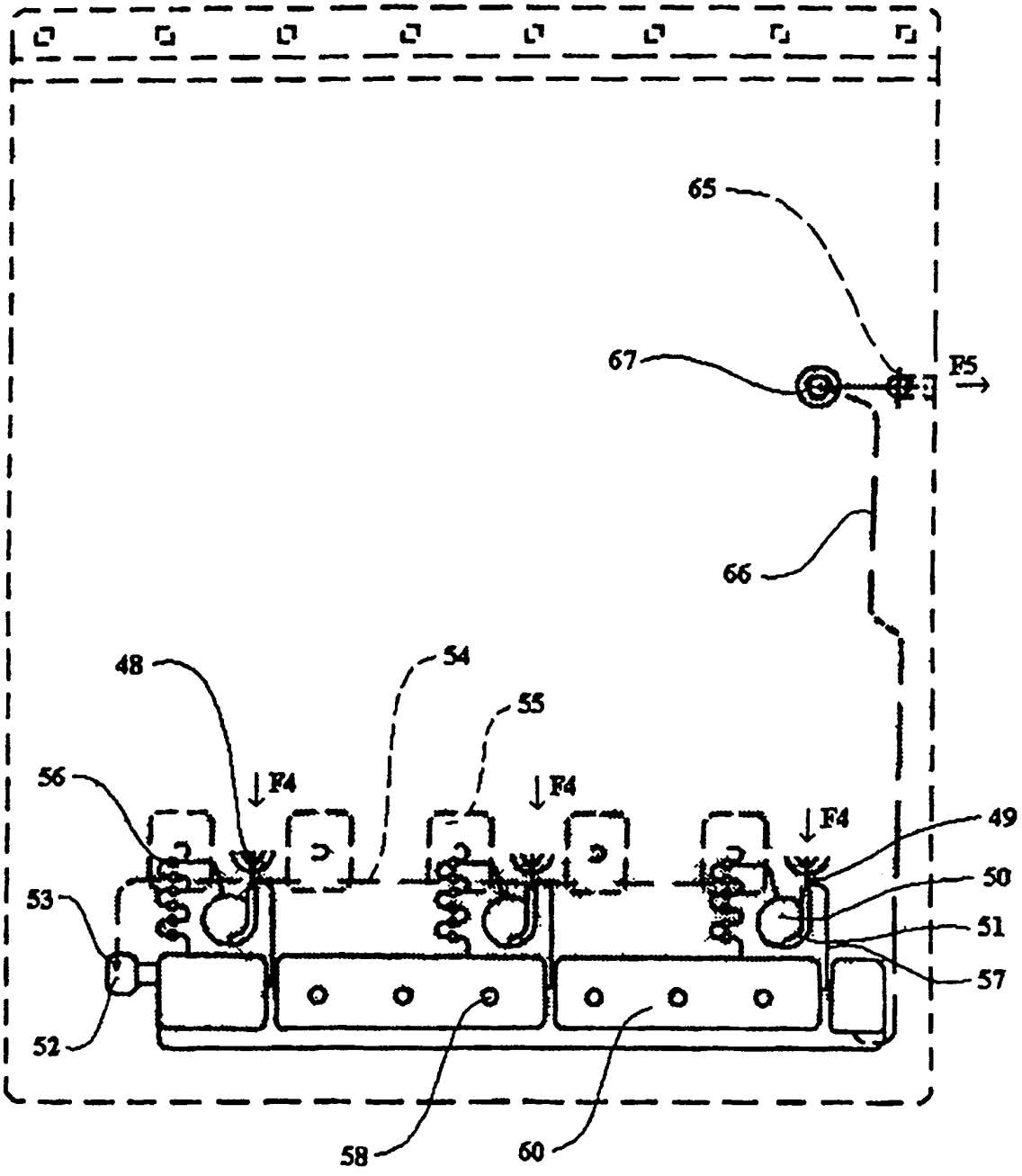


Fig. 5