



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 317 081**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04816604 .5**

96 Fecha de presentación : **23.12.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1706509**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.10.2006**

54

Título: **Chip de análisis con gama patrón, maletines y procedimientos de análisis.**

30

Prioridad: **29.12.2003 FR 03 51222**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

73

Titular/es:
COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
25, rue Leblanc - Immeuble "Le Ponant D"
75015 Paris, FR
BIOMERIEUX S.A.

72

Inventor/es: **Ginot, Frédéric;**
Novelli-Rousseau, Armelle;
Mallard, Frédéric y
Ricoul, Florence

74

Agente: **Justo Vázquez, Jorge Miguel de**

ES 2 317 081 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

Chip de análisis con gama patrón, maletines y procedimientos de análisis.

5 Sector técnico

La presente invención se refiere a un chip de análisis que incluye una gama patrón, a un procedimiento de análisis de una muestra utilizando el citado chip, y a un maletín de diagnóstico o de análisis que incluye el citado chip.

10 La presente invención está adaptada al análisis cualitativo, y sobre todo cuantitativo, de cualquier analito presente en una muestra.

La presente invención se ubica, por lo tanto, principalmente en el sector de los chips químicos o biológicos, por ejemplo de ADN, de proteínas, de anticuerpos, de antígenos, de células, de receptores, o de otros ligandos conocidos por el experto en la materia y capaces de capturar y fijar específicamente uno o varios analitos.

Habitualmente, las aplicaciones que utilizan chips de ADN se dividen en dos grandes categorías: la expresión de genes (i) y el genotipado (ii). (i) La expresión de gen consiste en utilizar uno o varios chips de ADN para estudiar la variación de todo o parte del transcriptoma de una célula según determinados parámetros biológicos o fisiológicos: evolución de una célula en el transcurso del desarrollo de un organismo, de la caracterización del tejido, etc. Cada vez está más claro que tales perfiles de expresión pueden servir también como marcador diagnóstico para las enfermedades multifactoriales, especialmente en cancerología. (ii) En aplicaciones de tipo genotipado, la respuesta solicitada al chip de ADN es por lo general del tipo de sí/no, cualitativa. De hecho, se desea saber si una o varias secuencias particulares se encuentran presentes en la muestra. Cuando se precisa una gran necesidad de especificidad, por ejemplo en el caso de la detección de mutaciones, se disponen sobre el chip varios oligonucleótidos que no difieren más que en una o dos bases, y en general, se sacan conclusiones en presencia de la secuencia correspondiente a la señal, por ejemplo la fluorescencia, más fuerte.

La presente invención está adaptada a estas dos grandes categorías de aplicaciones, y resuelve ventajosamente los numerosos problemas de la técnica anterior que se han mencionado en lo que antecede, en particular en la elaboración de tales estudios y perfiles.

Gracias a su gama patrón, el chip de la presente invención permite convertir señales de detección y/o análisis de un chip, por ejemplo de un chip biológico, en una unidad absoluta, reproducible, estable y comparable con otros resultados de medición obtenidos a partir de la misma conversión.

Estado de la técnica anterior

40 Para la cuantificación de variaciones de expresión de genes, el biólogo utiliza casi siempre dos muestras que son hibridizadas al mismo tiempo sobre un chip de ADN: una muestra de referencia, que comprende una cierta masa de ARN o de ADNc marcada con un primer fluorocromo, por ejemplo la fluoresceína (que da luz en color verde), y una muestra de interés cuya medición se debe llevar a cabo, que comprende la misma masa de ARN o de ADNc marcada con un segundo fluorocromo, por ejemplo Cy3 o Cy5 (que dan luz en color naranja o en color rojo). Tras la hibridación, el chip de ADN da luz en las dos longitudes de onda, y esto constituye la relación entre las dos intensidades de las señales emitidas, que sirve de señal.

Se trata por tanto de una medición relativa con referencia interna en cada experimento. Este método funciona bien, pero resulta bastante laborioso de llevar a cabo, y existen algunas inconveniencias, tales como los sesgos de marcado según las secuencias, o una deriva de lectura diferente según la longitud de onda.

Existe otra técnica de cuantificación para los chips de expresión de genes, puesta a punto por la sociedad Affymetrix. En este método, cada secuencia puesta sobre el chip está representada por un conjunto de oligonucleótidos, y cada oligonucleótido existe bajo la forma de dos oligonucleótidos, uno perfectamente complementario con la secuencia planteada, y otro que incluye una mutación puntual ("mismatch"). La muestra de interés es hibridizada después sobre el chip, utilizándose un solo color. La diferencia complementario-mismatch se utiliza entonces como señal primaria, siendo estas señales promediadas sobre el conjunto de oligonucleótidos que representan un gen. A continuación, se dispone un "gen patrón" sobre el chip según la misma técnica; este gen patrón, incluido en los genes conocidos como de gestión del organismo, se supone que se mantiene con expresión constante cualesquiera que sean las condiciones fisiológicas de la célula. Se divide después la "señal primaria" de cada gen por la del gen de referencia, para estar libres de, por ejemplo, las variaciones de brillo de la fluorescencia por parte del entorno. Se pueden comparar entonces los diferentes experimentos entre sí.

Esta técnica presenta la ventaja de ser monocromo, por lo que no tiene los inconvenientes citados anteriormente respecto a los dos marcadores. Sin embargo, utiliza el forzamiento de los oligonucleótidos cortos (20 a 25 bases), y de otras gamas existentes, puesto que algunos genes existen bajo formas diferentes (empalme alternativo). Este método necesita por lo tanto ventajas de sitios sobre el chip de ADN, y más conocimientos sobre las diferentes formas de los ARNs de los genes representados en el chip que con otros métodos de la técnica anterior. Además, los resultados varían

según la elección del gen patrón, incluso cuando éste se elige precautoriamente. La comparación de los resultados no es, por tanto, siempre posible.

Los métodos citados anteriormente, mediante ciertos controles y ciertas repeticiones de los experimentos, pueden ser relativamente fáciles, y proporcionan así un medio de estudio utilizable por los biólogos. Sin embargo, debe apreciarse que las mediciones son relativas, puesto que la señal es un número sin dimensiones que resulta de la relación entre dos mediciones con unidades generalmente arbitrarias (unidades arbitrarias de fluorescencia). No es, por tanto, posible comparar los experimentos realizados con muestras de referencia diferentes, por ejemplo, sin un experimento complementario. Además, al estar las mediciones en una unidad arbitraria, es asimismo bastante difícil saber de dónde vienen los problemas en caso de intensidades débiles: es difícil saber si se trata de un problema instrumental, de un problema asociado al propio chip, a la muestra, al protocolo operativo, o al resultado del experimento.

En aplicaciones de tipo genotipado, la respuesta demandada al chip de ADN es generalmente del tipo sí/no, cualitativa, como se ha explicado en lo que antecede. Incluso en ese caso, sobre los chips de la técnica anterior, los resultados son relativos, puesto que se comparan entre sí las intensidades de diferentes oligonucleótidos investigados sobre un mismo chip.

Sin embargo, para determinadas aplicaciones, como la detección de mezclas de varias secuencias, sería ventajoso poder comparar las señales entre varios experimentos, lo que es imposible en la actualidad con los chips actualmente disponibles; hace falta, de forma permanente, repetir uno o varios experimentos para disponer de mediciones relativas que permitan obtener conclusiones, lo que resulta largo y costoso.

Por otro lado, en cuanto a diagnóstico rutinario, el problema de la cuantificación de los resultados puede ser resuelto mediante una curva de calibración. Una muestra de referencia se diluye de forma predeterminada con diferentes concentraciones en un diluyente apropiado, y se realiza el ensayo biológico para cada dilución fuera del chip. Se obtiene así una curva patrón. Cuando se realiza un ensayo biológico real, el resultado en la unidad arbitraria, se lleva a la curva patrón, y se deduce la concentración de analito de la muestra. Sin embargo, es importante que el ensayo se realice exactamente con los mismos elementos que los utilizados para el establecimiento de la curva patrón. Además, en los ensayos con revelado enzimático para lectura, por ejemplo los ensayos ELISA, ELOSA, etc., hace falta además una curva patrón para cada lote de fabricación de los ensayos. Además, los puntos suplementarios de calibrado que permiten poner en su lugar la curva patrón para cada usuario, deben ser llevados a cabo para corregir las variaciones de una máquina a otra, de una temperatura a otra, de un laboratorio a otro, de un posible envejecimiento de los reactivos, etc. Estos ensayos suplementarios de calibración deben ser renovados constantemente por los usuarios, por ejemplo cada semana.

Este método de cuantificación, por otro lado habitual, resulta así complejo y costoso. Además, no se aplica bien a los chips de ADN; en efecto, haría falta utilizar un chip de ADN para cada punto de la gama patrón, y repetir constantemente el experimento (con cada cambio de lote de marcador, o de período regular, por ejemplo todos los meses, para vigilar cualquier deriva eventual de la instrumentación), lo que resulta demasiado costoso para los laboratorios.

Schuchhardt y otros, (2000) [17], describen un chip de análisis de al menos un analito presente en una muestra líquida, comprendiendo el citado chip: a) varios sitios de análisis dispuestos sobre el chip de manera que permiten el reconocimiento y la fijación específica del analito, y una gama patrón (Materials and methods: Array preparation). La gama patrón está constituida por varios sitios patrón que incluyen al menos una molécula sonda patrón que permite reconocer y fijar específicamente una molécula objetivo patrón determinada (figura 1).

Existe por tanto una necesidad real de un chip y de un procedimiento de análisis que permitan resolver los numerosos problemas de la técnica anterior citados anteriormente, y en particular que sean fiables, precisos, reproducibles; que se apliquen a los diferentes chips de ADN conocidos y futuros; que permitan comparar las señales entre varios experimentos; que permitan evitar la utilización de un chip de ADN para cada punto de la gama patrón; y que permitan evitar repetir constantemente el experimento de contrastado (en cada cambio de lote de marcador, o de período regular, por ejemplo todos los meses, para vigilar una deriva eventual de la instrumentación), con el fin de reducir la complejidad y los costes de los análisis sobre chip, por ejemplo sobre un chip biológico, para los laboratorios, en la industria y en la investigación.

En la descripción que sigue, las referencias entre corchetes [] reenvían a la lista de referencia dada a continuación de los ejemplos de realización de la invención que se describen en lo que sigue.

Exposición de la invención

La presente invención responde precisamente a esta necesidad y resuelve los problemas citados anteriormente de la técnica anterior, e incluso otros, al proporcionar en particular un chip de análisis, así como un procedimiento de análisis que utiliza este chip, según se definen en lo que sigue.

El chip de análisis de la presente invención es un chip de análisis de al menos un analito presente en una muestra líquida, comprendiendo el citado chip:

a) al menos un sitio de análisis del citado al menos un analito, estando el citado sitio de análisis dispuesto sobre el chip de manera que permite el reconocimiento y la fijación específica del analito; y

ES 2 317 081 T3

b) una gama patrón (G), estando la citada gama patrón constituida por varios sitios patrón dispuestos, cada uno de ellos, sobre el citado chip de manera determinada e independientes unos de otros, incluyendo cada sitio patrón de esta gama, fijadas a su superficie y en una proporción determinada P diferente para cada sitio con relación a los otros sitios patrón de la citada gama: (i) al menos una molécula sonda patrón (MSE) que permite reconocer y fijarse específicamente a una molécula objetivo patrón (MCE) determinada, y (ii) al menos una molécula neutra (MN) incapaz de reconocer y fijarse a la citada molécula objetivo patrón, siendo tanto la molécula sonda patrón como la molécula neutra incapaces ambas de reconocer y fijar dicho o dichos analitos; con $P = \frac{\text{número de MSE}}{\text{número de MSE} + \text{número de MN}}$ y $0 \leq P \leq 1$, siendo la suma de número de MSE + número de MN constante de un sitio patrón a otro.

El procedimiento de análisis de la presente invención es un procedimiento de análisis *in vitro* de al menos un analito susceptible de estar presente en una muestra líquida, que comprende las etapas siguientes:

(α) opcionalmente, fijación sobre el analito de un primer medio de detección;

(β) adición a la muestra a analizar, que comprende el analito opcionalmente marcado, de una molécula objetivo patrón (MCE) sobre la que se ha fijado opcionalmente un segundo medio de detección, idéntico o diferente, permitiendo la citada MCE reconocer y fijarse específicamente a la molécula sonda patrón (MSE) de un chip de análisis según la invención, siendo la citada MCE añadida a la citada muestra en una cantidad suficiente para saturar las MSE de gama patrón (G) del citado chip, creando así una gama patrón que es función de la proporción P determinada, diferente para cada sitio patrón;

(γ) puesta en contacto de la muestra a analizar, que comprende la MCE, con el citado chip de análisis que comprende al menos un sitio de análisis del mencionado al menos un analito en condiciones físico-químicas tales que: por una parte, el analito a analizar, si está presente, se fija en su sitio de análisis sobre el chip; y por otra parte, la MCE reconoce específicamente la MSE y se fija a ésta en los diferentes sitios patrón de la gama patrón del chip;

(δ) determinación de una señal patrón emitida, en su caso gracias al segundo medio de detección, por cada sitio patrón de la gama patrón, siendo la citada señal una función de la cantidad de molécula objetivo patrón fijada sobre ésta; y

(ϵ) determinación de una señal de análisis emitida, en su caso merced al primer medio de detección, por el citado al menos un sitio de análisis, y que es función de la cantidad de analito fijada por sitio de análisis, y aproximación a las señales determinadas en la etapa (δ) para expresar esta señal de análisis en función de P.

Mediante “analito” se entiende todo o parte de un corpúsculo o molécula que se desea analizar, es decir, detectar y/o cuantificar, por ejemplo un microorganismo, una molécula, un hongo, un virus, una célula eucariótica, una célula tal como una célula tumoral, un compuesto o una molécula química, una molécula tal como un péptido, una proteína, una glicoproteína, una lipoproteína, una enzima, un polisacárido, un lípido, un glicolípido, un lipopolisacárido, un ácido ribonucleico (ARN), un ácido desoxirribonucleico (ADN), una hormona, un antígeno, un anticuerpo, un factor de crecimiento, un hapteno, etc.

La muestra puede ser una solución, un extracto celular, una extracción realizada sobre un organismo animal o vegetal. Esta muestra puede ser diluida, en caso necesario, para su utilización en la presente invención. El experto en la materia conoce la manipulación de tales muestras y su puesta en solución y/o su dilución, su purificación y/o su concentración, para su análisis sobre un chip de análisis, por ejemplo un chip biológico o químico. Estas mismas manipulaciones se aplican para la puesta en práctica de la presente invención.

El chip de la presente invención comprende, en combinación, por una parte, al menos un sitio de análisis de al menos un analito a analizar y, por otra parte, una gama patrón, estando los dos dispuestos en la superficie de un mismo chip de acuerdo con la presente invención.

El chip de la presente invención está constituido de la misma manera que los chips de análisis de la técnica anterior, mientras que comprende además una gama patrón en el sentido de la presente invención. Las etapas de fabricación de la gama patrón se ajustan así a las de fabricación del chip. Los chips de ADN utilizables para la puesta en práctica de la presente invención y su o sus procedimientos de fabricación se encuentran descritos por ejemplo en el documento [1] de la lista de referencia. Los chips de proteínas utilizables para la puesta en práctica de la presente invención y su o sus procedimientos de fabricación se encuentran descritos por ejemplo en los documentos [2] y [3] de la lista de referencia.

El chip de la presente invención presenta por tanto un espectro muy amplio de utilización como herramienta de análisis. También, por “análisis” se entiende el “análisis cualitativo” de una muestra, es decir, la detección de analito o analitos presentes en una muestra y/o el “análisis cuantitativo”, es decir, la dosificación de analito o analitos presentes en una muestra. Se proporcionan ejemplos en lo que sigue.

Según la invención, los “sitios” (denominados “spots” en inglés) incluyen los medios que permiten reconocer y fijar exclusivamente y específicamente, ya sea el “analito” (sitio de análisis) o ya sea “la molécula objetivo patrón” (sitio de la gama patrón).

Para el “sitio de análisis”, estos medios comprenden moléculas sonda específicas del citado analito. La molécula sonda específica puede ser, por ejemplo, una molécula de ADN o de ARN que permite un reconocimiento y una fijación de un analito complementario (ADN o ARN) por hibridación; de un antígeno o de un anticuerpo que reconoce y fija el analito por medio de una interacción de tipo antígeno/anticuerpo; de una proteína que reconoce y fija el analito por medio de una interacción de tipo proteína/proteína; de una enzima o de un substrato que reconoce y fija el analito por medio de una interacción de tipo enzima/substrato; etc.

Por ejemplo, cuando el analito es un ácido nucleico, el al menos un sitio de análisis es un sitio funcionalizado por medio de un ácido nucleico complementario de éste. Por ejemplo, también cuando el analito es un anticuerpo o un antígeno, el al menos un sitio de análisis es un sitio funcionalizado respectivamente por un antígeno o un anticuerpo.

Los procedimientos de fabricación de estos sitios de análisis y su funcionalización, son conocidos por el experto en la materia, y están expuestos, por ejemplo, en los documentos citados anteriormente. La funcionalización de los sitios de análisis del chip puede ser llevada a cabo, por ejemplo, por medio de un robot dispensador de gotas de una solución de funcionalización, por ejemplo un robot de tipo Packard Instrument o GeSim (marcas comerciales).

El chip de la presente invención puede comprender varios sitios de análisis, idénticos o diferentes, de la misma manera que los chips de análisis utilizadas actualmente en laboratorios.

La gama patrón de la presente invención está constituida por sitios patrón que son asimismo sitios de reconocimiento y fijación de un objetivo, pero estos sitios patrón están caracterizados porque no pueden reconocer y fijar el o los analitos a analizar, sino únicamente una molécula patrón determinada. Los sitios patrón de esta gama patrón son tales como los que se han definido en lo que antecede, en los puntos (i) y (ii) del procedimiento de la invención.

Según la invención, la molécula sonda patrón, la molécula objetivo patrón y la molécula neutra se eligen conjuntamente y en función del analito al que se destina el chip de la presente invención, con el fin de que interactúen lo menos posible con el analito.

Según la invención, con preferencia, la molécula objetivo patrón es de la misma naturaleza que el analito. Esta puede ser, asimismo, de naturaleza diferente. Lo esencial es que la molécula objetivo patrón no sea ni reconocida ni fijada por el citado al menos un sitio de análisis.

Según la invención, la molécula sonda patrón se elige para reconocer y fijar específicamente la citada molécula objetivo patrón. Con preferencia, esta molécula sonda patrón es de la misma naturaleza que la molécula sonda específica del analito. La misma puede ser, igualmente, de naturaleza diferente. Lo esencial es que la molécula sonda patrón no reconozca y no fije el analito.

Por ejemplo, según la invención, la molécula objetivo patrón y la molécula sonda patrón pueden ser, por ejemplo, oligonucleótidos (ADN o ARN) complementarios para un reconocimiento y una fijación de la molécula objetivo patrón por hibridación sobre los sitios de la gama patrón que incluyen la molécula sonda; por ejemplo, un antígeno y su anticuerpo específico que permiten un reconocimiento y una fijación de la molécula objetivo patrón por medio de una interacción de tipo antígeno/anticuerpo sobre los sitios de la gama patrón que incluyen la molécula sonda; por ejemplo, las proteínas que permiten un reconocimiento y una fijación del objetivo patrón para una interacción de tipo proteína/proteína sobre los sitios de la gama patrón que incluyen la molécula sonda; etc.

Según la invención, el al menos un analito y la molécula objetivo patrón son, con preferencia, oligonucleótidos o anticuerpos. La funcionalización de los diferentes sitios (análisis y gama patrón) sobre un chip conforme a la presente invención, utilizando oligonucleótidos o anticuerpos o antígenos sondas y/o neutros, puede ser llevada a cabo utilizando las técnicas de funcionalización que el experto en la materia domina perfectamente en el sector de los chips de oligonucleótidos o de anticuerpos o de antígenos. Las técnicas utilizables están descritas, por ejemplo, en los documentos mencionados anteriormente.

Según la invención, la molécula neutra de la gama patrón, denominada también “no específica”, se elige de manera que no reconozca ni fije la molécula objetivo patrón y el o los analitos. Con preferencia, según la invención, la molécula neutra es de la misma naturaleza que la molécula sonda patrón. En efecto, esto permite tener en cuenta interacciones no específicas que podrían interferir en el análisis, en el transcurso de la utilización del chip de la presente invención, por ejemplo entre la molécula neutra y el o los analitos por una parte y la molécula objetivo patrón por otra parte, y obtener una gama patrón fiable. En los ejemplos anteriores, la molécula neutra de la gama patrón puede ser, por lo tanto, respectivamente ADN o ARN, un antígeno o un anticuerpo, una proteína, una enzima o un substrato. La molécula neutra patrón se fija igualmente en los sitios de la gama patrón siguiendo las técnicas de funcionalización de chips conocidas por el experto en la materia, por ejemplo las descritas en los documentos citados anteriormente.

Según la invención, con preferencia la molécula sonda patrón, la molécula objetivo patrón y la molécula neutra, son oligonucleótidos. La fabricación de secuencias oligonucleotídicas, por ejemplo artificiales, que responden a las definiciones de moléculas sonda y objetivo patrón y de molécula neutra de la presente invención, y la funcionalización de sitios sobre un chip utilizando estos oligonucleótidos sonda y neutro para la fabricación de la gama patrón, se ve en efecto facilitada y utiliza técnicas que el experto en la materia domina perfectamente en el campo de los chips de oligonucleótidos.

ES 2 317 081 T3

Caso de sistemas *in situ*: algunos procedimientos de fabricación de chips de ADN utilizan una síntesis *in situ* de oligonucleótidos (por ejemplo, los procedimientos de fabricación de chips GeneChip de la sociedad Affymetric (marca registrada), o los chips de la sociedad Agilent). En estos procedimientos, cada oligonucleótido se sintetiza *in situ* sobre el chip. El direccionamiento espacial de los monómeros que se han de acoplar, se realiza ya sea a nivel de la desprotección en un ciclo clásico de síntesis de oligonucleótidos (foto-desprotección para Affymetrix), o ya sea a nivel del acoplamiento de los monómeros (“spotting” para Agilent). Una técnica de síntesis *in situ* de ese tipo permite fabricar los sitios de análisis del chip de la presente invención, y, añadiendo tantos ciclos de síntesis como puntos de la gama patrón existan, y acoplado directamente, en esos ciclos de síntesis, la mezcla oligonucleótido sonda patrón/oligonucleótido neutro (no específica) al recinto que interesa sobre el soporte que forma el chip (en lugar de acoplar solamente un monómero), se fabrica una gama patrón según la invención.

Según la invención, la gama patrón está constituida por varios sitios patrón dispuestos sobre el citado chip de manera determinada, e independientes unos de otros. En efecto, para que la gama patrón pueda ser utilizable, es necesario que cada sitio patrón sea distinto de los otros sitios patrón con el fin de que los diferentes sitios de esta gama proporcionen señales independientes y aprovechables para el análisis durante la utilización del chip.

Cada sitio de la gama patrón se distingue de los otros sitios de la gama por su proporción P determinada, tal y como se ha definido en lo que antecede: la cantidad de moléculas sonda patrón con relación a las moléculas neutras es así conocida para cada sitio patrón. Esta proporción P determinada se obtiene en cada sitio patrón funcionalizando cada sitio, independientemente de los otros, por medio de una solución de concentración determinada en cuanto a moléculas sonda patrón y/o en cuanto a moléculas neutras. Según la invención, esta proporción P puede ir desde 0, en caso de que el sitio patrón no incluya más que la molécula neutra, hasta 1, en caso de que el sitio patrón no incluya más que la molécula sonda patrón. Lo esencial es que la cantidad total de molécula sonda patrón y de molécula neutra (MSE + MN) sea igual de un sitio a otro, con el fin de que la gama patrón sea precisa.

Con preferencia, en el ejemplo en el que las moléculas sonda patrón y neutras son oligonucleótidos, se eligen de tal forma que su eficacia de injerto en los sitios de la gama patrón durante la fabricación del chip sea la misma. De ese modo, tras el injerto, la proporción de oligonucleótido patrón es igual a la de la dilución de partida. Esto permite pasar ventajosamente desde la unidad “% de dilución” a la unidad “% de nucleótidos patrón injertados” en el transcurso de un análisis que utilice el chip de la presente invención.

En el ejemplo de chips de oligonucleótidos conforme a la presente invención, por oposición a los chips de ADNc o a un producto de PCR, con preferencia, la cantidad global de “oligonucleótidos sonda patrón + oligonucleótidos neutros no específicos” es equivalente a la cantidad de sondas oligonucleotídicas utilizadas para cada sitio de análisis para la fabricación del chip. Se utilizan igualmente, con preferencia, oligonucleótidos de la misma longitud. Así, siendo la eficacia de injerto poco dependiente de la secuencia, para cada sitio, es posible expresar la señal en “porcentaje de sitios hibridizados”, 100% correspondiente a la saturación de la superficie.

Con preferencia, los sitios de la gama patrón están dispuestos sobre el chip de manera lineal y están ordenados en función de la proporción P de cada sitio, por ejemplo desde el sitio más concentrado al sitio menos concentrado en cuanto a moléculas sonda patrón. En efecto, esto proporciona una escala de contraste más fácilmente aprovechable durante la utilización del chip. El aumento de la proporción P de un sitio patrón a otro contiguo a éste en una gama de ese tipo, puede ser lineal, por ejemplo, en porcentaje de moléculas sonda patrón sobre diferentes sitios sucesivos, de 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, y 100%; o no lineal, por ejemplo, 0%, 5%, 10%, 20%, 50%, 100%; o incluso 0%, 0,1%, 1%, 10% y 100%. No existen más limitaciones para la puesta en práctica de la presente invención que las de poder atribuir claramente a una señal dada de un sitio de la gama patrón, una proporción de moléculas sonda patrón determinada.

El número de sitios patrón de la gama patrón se determina en función de la precisión de análisis que se busque y de la gama dinámica del ensayo durante la utilización del chip. Por ejemplo, tres sitios patrón que presentan, por ejemplo, sucesivamente un 0%, 50% y 100% de molécula sonda patrón, no proporcionan más que tres resultados de contrastado en base a los cuales deberán fundarse los resultados de análisis del analito, mientras que cinco sitios patrón que presenten, por ejemplo, sucesivamente 0%, 20%, 40%, 60%, 80% y 100% de molécula sonda patrón, proporcionan seis resultados de contrastado que permiten una lectura más precisa de los resultados de análisis. A título de ejemplo, la gama patrón puede comprender de 1 a 50 sitios patrón, por ejemplo de 2 a 20. El experto en la materia determinará fácilmente, según la precisión de análisis que se busque y la gama dinámica de las concentraciones, el número de sitios patrón diferentes requeridos y su distribución o disposición sobre el chip.

La figura 1 anexa representa, esquemáticamente en corte, una gama patrón (G) sobre un chip (P) conforme a la presente invención. En esta figura, se han representado diferentes sitios patrón (1a, 1b, 1c y 1d), en los que se han fijado las moléculas sonda patrón (MSE) (con trazos gruesos) y las moléculas neutras (MN) (con trazos finos). Los sitios de análisis no han sido representados. El sitio más a la izquierda no incluye más que MSE (100%), y el sitio más a la derecha solamente MN (0% MSE). Los sitios intermedios incluyen proporciones intermedias de MSE. La suma MSE + MN es constante de un sitio a otro.

Según la invención, varias gamas patrón, iguales o diferentes, pueden ser dispuestas sobre un mismo chip. La utilización de varias gamas patrón, aunque no sea obligatoria, permite en algunos casos mejorar la precisión de los análisis efectuados. Éste puede ser el caso de, por ejemplo, cuando la muestra comprende varios analitos que se van a

analizar simultáneamente sobre el chip, por medio de un oligonucleótido y de un anticuerpo. El experto en la materia determinará fácilmente, según el análisis al que se destine el chip, la puesta en práctica más apropiada.

5 La presente invención pone de manifiesto toda su importancia en la utilización del chip que incluye esta gama patrón para el análisis de una muestra que comprende, o que es susceptible de comprender, uno o varios analitos a analizar, especialmente en el procedimiento de la invención.

10 En el procedimiento de la invención, el analito y la molécula objetivo patrón son, con preferencia, de la misma naturaleza, sin estar limitados a este modo de realización. También con preferencia, el analito y la molécula objetivo patrón son oligonucleótidos o anticuerpos, sin estar limitados a este modo de realización. En un modo de realización particularmente ventajoso de llevar a cabo, la molécula sonda patrón, la molécula objetivo patrón y la molécula neutra son oligonucleótidos por las mismas razones que las expuestas en lo que antecede.

15 De la misma manera, y por las mismas razones que las expuestas en lo que antecede, el al menos un analito es ventajosamente un ácido nucleico, y el sitio de análisis del citado analito sobre el chip es un sitio funcionalizado por un ácido nucleico complementario de éste. El analito puede ser asimismo un antígeno o un anticuerpo, y el sitio de análisis del citado analito sobre el chip, un sitio funcionalizado respectivamente por un anticuerpo o un antígeno que lo reconoce y que lo fija.

20 La etapa (α) del procedimiento de la invención es opcional. En esta etapa, un primer medio de detección puede ser fijado sobre el analito. Se puede tratar de cualquier medio conocido por los expertos en la materia, útil para poner de relieve un analito fijado sobre una molécula sonda específica (conjunto sonda/analito) fijada sobre un chip. Este medio puede implicar, por ejemplo, un primer marcador, que puede estar fijado ya sea sobre la molécula sonda específica, o ya sea sobre el analito. Este medio puede ser asimismo otra molécula para un marcado indirecto, por ejemplo una biotina, según la técnica de marcado utilizada. Los marcadores y las técnicas de marcado utilizables para la puesta en práctica de la presente invención son, sin limitación, los conocidos por los expertos en la materia en el sector de los chips de análisis, por ejemplo los chips biológicos, por ejemplo los chips de ADN o de ARN, los chips de anticuerpos/antígenos, o los chips que utilizan una interacción enzima/substrato.

30 Los marcadores utilizables pueden ser elegidos, por ejemplo, en el grupo constituido por los marcadores fluorescentes; los marcadores radioactivos; las partículas de látex, estándar, coloreadas o fluorescentes; los cristales fotónicos (conocidos también como "quantum dots"); el oro coloidal, y los marcadores enzimáticos. Entre los marcadores fluorescentes se puede citar la fluoresceína, el Cy3, el Cy5 y la rodamina. Entre los marcadores radioactivos, se pueden citar, por ejemplo, el P^{32} , P^{33} , S^{35} , I^{125} , H^3 . Entre los marcadores enzimáticos, se puede citar la fosfatasa alcalina (PAL), la peroxidasa de rábano blanco (HRP o "horse radish peroxydase"), la β -galactosidasa, la acetilcolinesterasa. Para estas enzimas, se encuentran marcadores coloreados, fluorescentes o luminiscentes. En este caso, son moléculas transformadas por la enzima, y que después de la transformación, se vuelven coloreadas (o cambian de longitud de onda de absorción), fluorescentes, luminiscentes o redox. Los marcadores enzimáticos que se utilizan de forma rutinaria en los inmunoanálisis de diagnóstico, pueden ser utilizados igualmente. Estos marcadores fluorescentes o enzimáticos, y otros utilizables en la presente invención, están disponibles, por ejemplo, a partir de los catálogos de las sociedades Sigma/Aldrich, Molecular Probes, Amersham Pharmacia Biotech., Stratagene, etc. Los documentos [4] y [5] de la lista de referencias describen procedimientos de utilización de estos marcadores utilizables para la puesta en práctica de la presente invención. Los marcadores en forma de partículas utilizables en la presente invención están disponibles en varios proveedores, por ejemplo Molecular Probe, Miltenyi, Estapor/Merck, Polymer Solutions, etc. El documento 45 [6] de la lista de referencias describe procedimientos que utilizan estos marcadores en forma de partículas, látex o coloide, utilizables para la puesta en práctica de la presente invención. Para la utilización de cristales fotónicos se podrá utilizar, por ejemplo, el procedimiento descrito en el documento [7] de la lista de referencia.

50 Para determinados marcadores, en particular los marcadores enzimáticos, el producto detectable puede alejarse del sitio ("spot") en el que se ha producido, por difusión molecular, y contaminar sitios contiguos. Esto puede ser molesto para la utilización a la vez de la gama patrón y de señales emitidas por los sitios de reconocimiento del analito o analitos. Ésta es la razón por la que los inventores prefieren marcadores luminiscentes, puesto que la difusión es limitada: una vez que ha emitido un fotón, el producto enzimático no puede emitir más. Para evitar el fenómeno de difusión, resulta igualmente posible utilizar substratos enzimáticos conocidos como precipitantes: el producto enzimático es insoluble, y precipita en el lugar, es decir, sobre el sitio. Por ejemplo, se puede utilizar la tetrametilbenzidina (TMB) para la enzima HRP, y la asociación Nitro Bleu de Tetrazolio con Fosfato 5-Bromo-4-Cloro-Indolil (NBT + BCIP) para la fosfatasa alcalina.

60 Según la invención, con el fin de detener estos fenómenos de difusión que pueden obstaculizar la lectura del chip con determinados marcadores, pero también, de manera general, con el fin de parar cualquier fenómeno de difusión entre sitios contiguos, los inventores preconizan la utilización de chips en las que los sitios (de reconocimiento y de fijación del analito y/o de la gama patrón) están provistos de medios que permiten la formación circunscrita de gotas de la muestra obtenida en la etapa (β) exclusivamente sobre cada uno de los sitios, sin que estas gotas puedan difundirse entre sí. Estos medios pueden estar, por ejemplo, en forma de ribete, por ejemplo de resina, rodeando a cada sitio. 65 Estos medios pueden presentarse igualmente en forma de anillo que rodea a cada sitio y que presenta una mojabilidad para la muestra muy superior al resto de la superficie del chip, con el fin de que sea retenida una gota de la muestra por cada anillo exclusivamente en cada sitio. Este anillo puede ser, por ejemplo, un anillo de silicio negro obtenido por micro-grabado sobre una superficie de sílice o un electrodo de captura de una gota de muestra por electro-mojado.

ES 2 317 081 T3

Cualesquiera que sean los medios que permitan la formación de gotas, la superficie del chip es, con preferencia, no mojante frente a la muestra. El chip de la presente invención puede estar ventajosamente provisto de estos medios, con el fin de aumentar la calidad o la fiabilidad de las mediciones obtenidas.

5 En la etapa (β), se añade a la muestra, tal y como se ha definido en lo que antecede, la molécula objetivo patrón sobre la que se ha fijado opcionalmente un segundo medio de detección idéntico o diferente del primer medio de detección. Este segundo medio puede implicar, por ejemplo, un segundo marcador, que puede ser fijado sobre la molécula objetivo patrón o sobre la molécula sonda patrón. Igualmente, puede implicar una molécula diferente de un marcador, pero que interviene en un procedimiento de marcado indirecto (por ejemplo, biotina). Este marcador puede ser elegido, por ejemplo, entre los citados anteriormente. El segundo medio de detección es, con preferencia aunque no obligatoriamente, idéntico al primer medio de detección. Lo esencial, es que la fijación de la molécula sonda patrón de la gama patrón pueda ser detectada sobre el chip por medio de una señal detectable.

15 Según la invención, solamente el analito puede estar marcado, o quizás solamente la molécula objetivo patrón, o las dos, o ninguna de las dos. En efecto, algunas técnicas de detección permiten detectar una interacción molecular (fijación sonda/objetivo sobre un chip) sin marcador. En lo que sigue se proporcionan ejemplos.

20 La molécula objetivo patrón sobre la se fija opcionalmente el segundo medio de detección, se añade a la muestra en cantidad suficiente como para que el máximo de moléculas sonda de los sitios de la gama patrón reconozcan y fijen la molécula objetivo en las condiciones experimentales utilizadas para la puesta en contacto (etapa (γ)) de la muestra con el chip. La adición a la muestra puede hacerse mediante mezcla, con preferencia homogénea, con la muestra.

25 En la etapa (γ), se pone en contacto la mezcla de la etapa (β) con el chip de la presente invención, en las condiciones físico-químicas definidas en lo que antecede. Estas condiciones son conocidas por el experto en la materia en el sector de los chips de análisis, por ejemplo de los chips biológicos, por ejemplo de los chips de ADN, de ARN, de anticuerpo/antígeno, de proteínas, etc. Se trata, por ejemplo para los chips citados anteriormente, de las condiciones de pH, de temperatura y de fuerza iónica que permitan el reconocimiento y la fijación del analito o analitos (ADN, ARN, anticuerpos, antígeno, proteína, etc.) en su o sus sitios de reconocimiento, y de la molécula objetivo patrón (ADN, ARN, anticuerpos, antígeno, proteína, etc.) en los sitios de la gama patrón que incluyen la molécula sonda patrón. La ventaja de la presente invención consiste en que el reconocimiento y la fijación del analito por parte del al menos un sitio de análisis, y la formación de la gama patrón mediante la fijación de la molécula sonda patrón en los sitios patrón, se efectúan simultáneamente y en las mismas condiciones operativas. El impacto es evidente: las señales emitidas por la gama patrón han sido obtenidas en las mismas condiciones operativas que las utilizadas para la fijación del analito. Los resultados de análisis son, por lo tanto, más fiables que los obtenidos mediante los procedimientos de la técnica anterior.

35 De forma general, la puesta en contacto de los sitios de análisis y de los sitios de la gama patrón con la muestra, puede hacerse con los medios habituales de la técnica de los chips de análisis utilizados para la repartición de una muestra por las zonas funcionalizadas.

40 Sobre un chip que comprenda medios que permitan la formación circunscrita de gotas de muestra en los sitios del chip, esta puesta en contacto puede hacerse muy fácilmente cubriendo los sitios con la muestra, retirando después la muestra de manera que no queden más que gotas de muestra capturadas por estos medios en los sitios de análisis y en los sitios de la gama patrón del chip.

45 La figura 2 anexa representa esquemáticamente, en corte, la gama patrón (G) de la figura 1 después de la etapa de puesta en contacto. En esta figura, se han representado las moléculas objetivo patrón (MCE) fijadas sobre las moléculas sonda patrón (MSE). Las MCE han sido marcadas por medio de un marcador (Mq). Queda claro que el sitio más a la izquierda (100% MSE) proporcionará la señal del marcador más fuerte, y el sitio más a la derecha (0% MSE) no dará señal. Las señales intermedias aparecerán en los sitios de en medio.

50 Al igual que para la utilización de los chips de análisis conocidos por los expertos en la materia, esta etapa (γ) puede ir seguida de etapa o etapas de lavado y de enjuagado en condiciones físico-químicas que no destruyan la fijación del analito sobre su sitio de análisis, así como la fijación de la molécula objetivo patrón sobre la molécula sonda patrón. Estas etapas de lavado y de enjuagado son conocidas por los expertos en la materia, y pueden ser encontradas en los documentos mencionados anteriormente. Las mismas permiten retirar los excesos de reactivos y de moléculas no fijadas sobre el chip.

60 En la etapa (δ) del procedimiento de la invención, se determina una señal emitida por cada sitio de la gama patrón que refleja la cantidad de fijación de molécula objetivo patrón fijada en cada sitio de la gama patrón. En la etapa (ε) del procedimiento de la invención, se determina especialmente una señal emitida por cada sitio de análisis que refleja la cantidad de analito fijada sobre cada sitio de análisis.

65 Estas determinaciones pueden ser realizadas de diferentes maneras, según la utilización o no de marcadores en el procedimiento de la invención. Lo esencial consiste en poder atribuir una señal cierta y representativa de la cantidad de objetivos fijados en cada uno de los sitios de la gama patrón, y una señal cierta y representativa de la cantidad de analito fijado en cada sitio de análisis.

ES 2 317 081 T3

Cuando se utilizan marcadores, se utilizan medios técnicos apropiados para la detección de estos marcadores. Si los primeros y segundos medios de detección utilizados hacen uso de los mismos marcadores, el medio de detección será el mismo para los diferentes sitios de análisis y para los diferentes sitios de la gama patrón. Estas técnicas de lectura de señal son conocidas por los expertos en la materia. En los ejemplos de marcadores citados anteriormente, permiten detectar, por ejemplo, una cantidad de fluorescencia, una cantidad de radiactividad, una cantidad de producto de la reacción enzimática, una luminiscencia, etc. Los documentos citados anteriormente, relativos a los marcadores, presentan técnicas de determinación de estas señales que son utilizables para la puesta en práctica del procedimiento de la invención.

Según la invención, la determinación de la señal de cada sitio de la gama patrón y/o de cada sitio de análisis, puede ser llevada a cabo igualmente, en particular cuando no se utiliza ningún marcador, mediante un método elegido en el grupo que comprende las técnicas de detección por resonancia plasmónica de superficie, las técnicas de detección fototérmicas, las técnicas elipsométricas, las técnicas de detección fotométricas y las técnicas de detección acústicas. Los documentos [8] y [9] de la lista de referencias, exponen técnicas de detección fototérmicas utilizables para la puesta en práctica del procedimiento de la presente invención, para detectar una señal sin marcador.

Según la invención, es posible utilizar técnicas diferentes de determinación de las señales, con o sin marcadores, para el sitio de análisis y para la gama patrón. Así, el procedimiento de la invención permite comparar los resultados obtenidas con un método sin marcado (sitio de análisis o gama patrón) con otros resultados obtenidos en el mismo chip con marcado (sitio de análisis o gama patrón), por ejemplo por fluorescencia. Lo esencial es que las condiciones operativas de fijación del analito en su sitio de análisis y de la molécula objetivo patrón en la gama patrón, se efectúan simultáneamente sobre el mismo chip y en las mismas condiciones operativas.

En la etapa (ϵ) se aproxima la señal emitida por cada sitio de análisis a las diferentes señales emitidas por la gama patrón para expresar la citada señal del sitio de análisis en función de la proporción P definida en lo que antecede. De hecho, se compara la intensidad de la señal emitida por cada sitio de análisis con las diferentes señales de la gama patrón para deducir, con relación a una señal equivalente de la gama patrón, un valor de señal referida a la proporción P. Son igualmente posibles otras aproximaciones que tienen en cuenta otros criterios de la gama patrón (número MN, número MSE, relación MN/MSE, relación MSE/MN, etc.)

Ventajosamente, si la naturaleza del analito y de la sonda patrón es la misma, es posible determinar directamente y de manera fiable y reproducible, mediante simple lectura, la proporción de analito o analitos en cada sitio de análisis. En efecto, esta determinación se efectúa, gracias a la presente invención, por medio de una gama patrón realizada simultáneamente, a partir de la misma muestra, y por tanto en las mismas condiciones operativas, que para el analito.

Si la naturaleza del analito es diferente de la naturaleza de la molécula sonda patrón, es posible determinar un valor relativo, pero que presenta no obstante la ventaja de ser estable, reproducible, e integrar las condiciones operativas de análisis en las que se permite formar simultáneamente la gama patrón, sobre el mismo chip, a partir de la misma muestra. Este valor relativo es por tanto más fiable que los que se obtienen mediante los procedimientos de la técnica anterior.

En un ejemplo particular de realización de la presente invención, cuando el analito, las moléculas sonda específicas del analito, las moléculas sonda patrón, objetivo patrón y neutras, son oligonucleótidos, la etapa (γ) de puesta en contacto tiene como objetivo la hibridación sobre el chip del analito con la molécula patrón, y la hibridación de la molécula objetivo patrón con la molécula sonda patrón. Para esta hibridación, se añade a la muestra que contiene el analito, un oligonucleótido objetivo patrón que contiene la secuencia complementaria del oligonucleótido sonda patrón de la gama patrón, y marcado preferentemente, aunque no obligatoriamente, de la misma manera que el analito. Este oligonucleótido se dispone en ligero exceso, de forma que todas las moléculas sonda patrón del sitio de la gama patrón que contienen el 100% de oligonucleótido patrón, son hibridadas en las condiciones experimentales de hibridación utilizadas. Así, para cada sitio de la gama patrón, todos los sitios hibridizables serán hibridados. Se podrá expresar entonces la señal de cada sitio de análisis del chip de ADN en “% de dilución patrón”. Utilizando en diferentes análisis los mismos oligonucleótidos patrón y no específicos (es decir, que no reconocen y no fijan el analito), esta unidad es independiente de la muestra, de la química de marcado, del marcador utilizado (verde, rojo o azul, fluorescente, fotónico, etc.), de las condiciones de hibridación (a condición de que la hibridación del oligonucleótido sea completa), del lote del chip, de la eficacia del injerto, etc., lo que permite comparar directamente los experimentos entre sí, sin experimentaciones complementarias como se necesita en las técnicas de la práctica anterior.

De manera general, es posible proceder a una lectura directa, o hacer, a partir de la gama patrón, una curva patrón, por ejemplo (señal determinada) = f(P), aprovechable para el análisis de los sitios de análisis del citado chip.

El chip y el procedimiento de la presente invención son por tanto fiables, precisos, y los resultados son reproducibles. La presente invención se aplica a los diferentes chips de ADN conocidos y futuros; la misma permite comparar las señales entre diversos experimentos, evita utilizar un chip de ADN para cada punto de gama patrón, y permite evitar repetir constantemente experimentos de contrastado como es necesario en los procedimientos de la técnica anterior.

Ventajosamente, en el caso de los métodos de detección con marcado enzimático, por ejemplo con luminiscencia, la presente invención permite evitar tener que calibrar la actividad de cada lote de enzima, ya sea por parte del fabricante o ya sea por parte del cliente. Esto representa, por lo tanto, una simplificación considerable de la “cadena metrológica”.

La presente invención disminuye así la complejidad y los costes de los análisis sobre chip, por ejemplo sobre chip biológico, para los laboratorios, en la industria y en la investigación.

5 Dado que la presente invención puede apoyarse en todos los chips de análisis de la técnica anterior que ponen en juego sitios de reconocimiento y de fijación de un analito, el experto en la materia comprenderá fácilmente que la misma encuentra aplicación en todos los sectores en los que pueda ser utilizado este tipo de chip.

10 Así, la presente invención se refiere igualmente a un maletín de diagnóstico que comprende un chip según la invención. En este caso, los sitios de análisis del chip de la presente invención comprenden moléculas sonda específicas de reconocimiento del analito investigado para poder obtener los resultados que serán después interpretables para establecer un diagnóstico. Por ejemplo, puede tratarse de moléculas sonda elegidas entre los oligonucleótidos, los ADNc, los anticuerpos, las lectinas, los aptámeros, etc.

15 La presente invención se refiere igualmente a un maletín de análisis que comprende un chip según la invención. En este caso, los sitios de análisis del chip de la presente invención comprenden moléculas sonda específicas de reconocimiento del analito investigado para poder efectuar el citado análisis. Puede tratarse de un maletín de análisis cualitativo o cuantitativo. Por ejemplo, puede tratarse de moléculas sonda elegidas entre los oligonucleótidos, los ADNc, los anticuerpos, las lectinas, los aptámeros, etc.

20 La presente invención se refiere igualmente a la utilización de un chip según la presente invención para seguir variaciones de expresión de genes en células de tejidos *in vitro*. Por ejemplo, el documento [1] describe un protocolo utilizable sobre el chip de la presente invención para seguir estas variaciones de expresión de genes.

25 La presente invención se refiere igualmente a la utilización de un chip según la invención en un procedimiento de genotipado *in vitro*. Por ejemplo, el documento [1] describe un protocolo utilizable sobre el chip de la presente invención para la puesta en práctica de un procedimiento de genotipado.

30 Por ejemplo, sobre la utilidad y para la utilización de chips de expresión de gen según la presente invención, se puede hacer referencia a la descripción accesible en el documento [10] que describe protocolos utilizables para la puesta en práctica del procedimiento de la invención en estas aplicaciones.

Por ejemplo, sobre la utilización de la presente invención en un procedimiento de genotipado, por ejemplo con fines de diagnóstico, se podrá hacer referencia a los documentos [11] y [12] que describen, cada uno de ellos, protocolos utilizables para la puesta en práctica del procedimiento de la invención en esta aplicación.

35 Otras características y ventajas se pondrán aún de manifiesto con la lectura de los ejemplos que siguen, dados a título de ejemplo ilustrativo, con referencia a las figuras anexas.

Breve descripción de las figuras

40 - La figura 1 es una representación esquemática de una gama patrón sobre un chip, conforme a la presente invención.

45 - La figura 2 es una representación esquemática de una gama patrón sobre un chip conforme a la presente invención, cuando las moléculas objetivo patrón han sido fijadas sobre las moléculas sonda patrón. Se han representado asimismo marcadores.

- La figura 3 representa dos negativos de imágenes de una gama patrón sobre un chip según la invención, con exposición de 560 ms, ganancia 0 (izquierda) o 16 (derecha).

50 - La figura 4 es un gráfico que representa curvas de señales en función de la proporción de oligonucleótido patrón sobre los sitios de captura, para cuatro experimentos independientes (P1, P5, P6 y P7).

Estas curvas constituyen curvas patrón obtenidas a partir de gamas patrón conforme a la presente invención.

55 - La figura 5 es un gráfico que reagrupa los resultados de señales determinadas para cada uno de los sitios de una gama patrón de la presente invención con un marcado por medio de partículas fluorescentes.

- La figura 6 es una representación esquemática del montaje utilizado por los actuales inventores para la fabricación de chips según la presente invención.

60 - La figura 7 es un esquema del mecanismo bioquímico de marcado indirecto, con partículas de látex, de la fijación de la molécula objetivo patrón sobre la molécula sonda patrón sobre un chip de la presente invención.

- La figura 8 es una fotografía de un soporte de chip utilizado para fabricar un chip según la presente invención.

65 - La figura 9 es una representación esquemática de un chip de análisis según la invención, que permite detectar la presencia de virus RSV A y RSV B, responsables de los bronquialitos (RSV de "Respiratory Syncytial Virus"), y de virus Inf A (Influenza A) e Inf B (Influenza B) responsables de la gripe, por parte de un paciente.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 *Chip conforme a la presente invención*

1.1 *Soporte del chip*

10 El soporte utilizado para fabricar un chip conforme a la invención es un configurador de imágenes en blanco y negro del tipo "VV5501 VGA Monochrome Image Sensor" (marca comercial de ST Microelectronics), cuyas principales características técnicas se dan en la tabla que sigue:

15	Formato de imagen	640 x 480 píxeles (VGA)
	Tamaño del píxel	5,6 μm x 5,6 μm

20 Este soporte está representado en fotografía en la vista de arriba de la figura 8 adjunta. Comprende en su centro una superficie de silicio. La figura 6 descrita en lo que sigue es un corte transversal esquemático de este chip que incluye, además, un tubo de plástico pegado por arriba (véase lo que sigue).

25 Este soporte está destinado, de hecho, a la realización de una cámara digital de bajo coste que incluye funciones de control de ganancia y de exposición, y presenta teóricamente una relación de señal - ruido de 56 dB. Además, se necesitan solamente muy pocos componentes externos para asegurar su funcionamiento, y dispone de un kit (lógico y matricial) que permite la gestión de los parámetros internos de la cámara.

30 1.2 *Primeras etapas de fabricación del chip*

35 Soportes de chips como los descritos en el párrafo 1.1 anterior, han sido modificados para poder funcionalizar una superficie de silicio (véase la figura 1). Para acceder a la superficie de silicio del foto-detector (en el centro del soporte), la tapa de vidrio ha sido quitada y las conexiones de enlace ("bonding") han sido sumergidas bajo una resina de globtop (término genérico que designa cualquier resina utilizada para proteger las conexiones de enlace). La capa de pasivado (nitruro de silicio) del centro del fotodetector, ha sido funcionalizada (salinización + injerto de sondas de captura en los sitios).

40 Para los experimentos siguientes de funcionalización de la superficie de silicio, se ha encolado un tubo de plástico (cola UV) sobre el chip para definir una cámara de reacción por encima de la superficie activa, en la que se han realizado las hibridaciones, lavados, y revelado. La figura 6 anexa es una representación esquemática del montaje utilizado: comprende una resina (R) de protección de las conexiones del chip, la superficie de silicio (P), un marco cerámico (Cc), el tubo de plástico encolado (Tp), y los sitios (se = un sitio patrón, y sa = un sitio de análisis) en los que se han fijado las moléculas sonda específicas del analito. Con este esquema, se muestra que el tubo ha sido previsto para contener un líquido de reacción (Lr) en contacto con la superficie de silicio.

45 La (S) y el (Cc) son visibles en la vista desde arriba de la fotografía de la figura 8, representada con anterioridad al encolado y al depósito de la resina.

50 1.3 *Funcionalización de la superficie de silicio por medio de moléculas sonda y neutras que son oligonucleótidos*1.3.1 *Hacer que aparezcan silanoles*

55 i) Se hace que aparezcan, en primer lugar, silanoles en la superficie de nitruro de silicio del chip: Agitación 2 h a temperatura ambiente en la solución: NaOH 1 g/agua 3 ml/etanol al 99% 4 ml. Lavados abundantes con agua. Agitación 1 h en HCl 0,2 N, después aclarados abundantes con agua. Secado a 80°C en estufa.

60 ii) silanización: las láminas son bañadas a temperatura ambiente durante 24 horas en 3-aminopropiltrióxosilano al 10% (vol/vol) en etanol, bajo argón. Después se secan. Después se lavan en etanol al 99%, después un segundo lavado con etanol al 99% + ultrasonidos. Cada lavado dura algunos minutos. Secado. Recocido 3 horas a 110°C en seco.

65 iii) pre-activación: las láminas son sumergidas en una solución de KOH (1,5 g de KOH en 20 ml de agua). Incubación de 5 a 10 minutos, a temperatura ambiente, con agitación. A continuación aclarado con agua pura.

iv) activación: las láminas son sumergidas en una solución de glutaraldehído (4 ml de glutaraldehído dispuesto en 16 ml de agua). Incubación de 1h30 a temperatura ambiente. Aclarado con agua pura. Secado.

ES 2 317 081 T3

1.3.2 Inmovilización de los oligonucleótidos

Tras la activación de estas agrupaciones NH₂ mediante glutaraldehído, los oligonucleótidos (ODN en lo que sigue de la descripción) aminados pueden ser depositados sobre los diferentes sitios de la superficie del chip para su injerto, por medio de un robot de la sociedad Karl Zües equipado con una pipeta de la sociedad Mikrodrop. El diámetro de los sitios ha sido evaluado en alrededor de 140 μm.

Preparación de las soluciones de oligonucleótidos a depositar: las soluciones utilizadas comprenden, cada una de ellas, 10 μM de ODN en total (sonda + neutra) a depositar en cada sitio de la gama patrón del chip. Éstas contienen una mezcla de ODN sonda patrón y de ODN neutro (no específico) en proporciones 100% patrón, 10% patrón, 1% patrón, 0,1% patrón, y 100% no específico, es decir, una gama patrón fabricada con 5 sitios o puntos. Estas soluciones han sido depositadas según 5 líneas de sitios con el robot de la sociedad Karl Züss, dotado de una pipeta piezoeléctrica de la sociedad Mikrodrop. Los sitios son depósitos con un paso de 200 μm. La separación inter-líneas es de 400 μm aproximadamente. El diámetro de los sitios es de aproximadamente 140 μm.

Todos los oligonucleótidos de este experimento tienen una longitud de 22 bases. Las secuencias utilizadas son las siguientes:

- Secuencia de oligonucleótido sonda (SEQ ID n° 1):

5' (H₂N-)ATGAACAAGTAGATAAATTAGT 3'

- Secuencia de oligonucleótido neutro (SEQ ID n° 2):

5' (H₂N-)CTAAAGGAATAGTGTAATAAT 3'

Las agrupaciones -NH₂ sirven para el injerto en los aldehídos del glutaraldehído utilizado en este ejemplo.

(la secuencia de oligonucleótido objetivo patrón se describe en el ejemplo 3).

1.4 Hibridación y marcado

Estos chips han sido hibridados con una solución de 15 nM de conjugado HRP a 37°C durante 30 minutos, lavados, después conformados en imágenes en presencia de mezcla de substrato Pierce ("Super ELISA Femto Maximum Sensitivity Kit") (marca comercial). El conjugado HRP es un oligonucleótido complementario del oligonucleótido sonda, al que se ha acoplado la enzima HRP ("Horse Radish Peroxydase").

Todas las hibridaciones han sido realizadas, en cámara húmeda, a 37°C durante 30 minutos en TE 1X, NaCl 1 M, Triton X-100 al 0,05%. El volumen de hibridación es de 200 μl (es decir, una vena líquida de aproximadamente 3 mm de espesor). No existe agitación. La hibridación va seguida de 3 lavados de 400 μl con TE 1X, NaCl 1 M, Triton X-100 al 0,05%, después un lavado con TE 1X, NaCl 1 M. TE 1X significa: Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.

Tras la hibridación y los lavados, el chip se monta en una tarjeta de lectura.

1.5 Determinación de las señales de la gama patrón y lectura

El medio de aclarado se retira, después de lo cual se añaden 200 μl de la mezcla de substrato SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce, #37075 (marca comercial)).

Adquisición de imágenes: 50 imágenes con ganancia 15 divisor 15 (1,8 imágenes/s), 50 imágenes ganancia 0 divisor 15 (1,8 imágenes/s). La primera serie de imágenes permite visualizar las señales fuertes, que saturan el captador en las condiciones anteriores. Las 50 imágenes de luminiscencia son promediadas píxel a píxel, así como las 50 imágenes en negro. Después, se subtrae la media de las imágenes en negro de la media de las imágenes de luminiscencia. Sobre la imagen resultante obtenida, se toma la media de la intensidad de cada sitio, de la que se subtrae el valor medio del ruido de fondo alrededor del sitio. El valor obtenido representa la señal de luminiscencia del sitio.

En efecto, la dinámica del captador (estimada teóricamente en 320) no es suficiente para cubrir la dinámica de señal generada por la biología. Ha fallado por tanto la realización de dos tomas con regulaciones de ganancia o de exposición diferentes. Las condiciones elegidas (ganancia 0/exposición 560 ms, y ganancia 16/exposición 560 ms) permiten obtener una imagen no saturada para las señales fuertes, y una imagen de las señales débiles: fotografías de la figura 3, a la izquierda ganancia 0 y a la derecha ganancia 16. En la imagen de la derecha, se pueden distinguir claramente, con anterioridad incluso al tratamiento de la imagen, cuatro líneas horizontales de sitios ("spots"), de arriba abajo: 100%, 10%, 1%, 0,1% patrón, seguidas de una línea de sitios que no comprenden ninguna molécula sonda patrón, sino únicamente la molécula neutra (no específica) que no es visible.

ES 2 317 081 T3

Los niveles de gris (ng) de los sitios sobre las imágenes tratadas han sido cuantificados, después normalizados, y los valores obtenidos han sido llevados a la gráfica representada en la figura 4 anexa. En esta figura, P1, P5, P6 y P7 (P de “puce”, chip en idioma francés) representan cuatro experimentos independientes sobre cuatro chips diferentes y conformes con la presente invención. En ordenadas, se ha representado la señal corregida (Sc) (en ng), y en abscisas, se ha representado el porcentaje de molécula sonda capturada (% SCS).

Se puede apreciar en esta gráfica que la detección por hibridación de objetivos patrón acoplados a una enzima, permite distinguir concentraciones superficiales de cada sitio de la gama patrón (aquí, sondas patrón de captura específicas del objetivo patrón) sobre una gama útil de 1000 (del 0,1% al 100%).

Este sistema expresa una variación de la concentración superficial de sitios de objetivos patrón capturados. Se puede por tanto detectar los objetivos con una gama de concentraciones, es decir, tener una dinámica de detección, del orden de 1000.

En este ejemplo, realizado a efectos de demostración, el chip se ha hibridado con un oligonucleótido acoplado directamente a la enzima HRP. En las aplicaciones reales, existirán con toda seguridad en el chip otros sitios además de los sitios patrón. El chip será por tanto, por ejemplo, hibridado con la muestra previamente marcada mediante un hapteno, por ejemplo con biotina. A la muestra se añadirá, durante la hibridación, un oligonucleótido complementario del oligonucleótido patrón, y marcado con la biotina. Tras la hibridación, se incubará un conjunto de estreptavidina-HRP que se fijará a las biotinas presentes sobre el chip. Después, se procederá al revelado mediante luminiscencia como se ha descrito en lo que antecede. Este método es el que se ha utilizado “en dos tiempos” en el que ejemplo que sigue, pero con partículas como marcadores, y no con enzimas.

Ejemplo 2

Marcado directo de la molécula objetivo patrón mediante partículas fluorescentes

En este ejemplo, la molécula objetivo patrón (MCE) hibridada sobre el chip (P), se marca con un hapteno, la biotina (b), por medio de un ODN de detección (ODNd). Después tiene lugar una etapa de “coloración”, incubando la superficie del chip con partículas fluorescentes (Pf) funcionalizadas con estreptavidina (St), que se van a fijar con ello a las biotinas (b). Las secuencias se indican en lo que sigue. La figura 7 representa esquemáticamente el mecanismo bioquímico utilizado en este procedimiento, sobre la superficie (S) del chip: un ODN de captura se fija al soporte que forma el chip, y juega el papel de oligonucleótido sonda patrón (MSE) de la invención; el conjunto objetivo + ODN de detección juega el papel del oligonucleótido complementario (objetivo) (MCE). El ODN de captura (sonda) está constituido por 70 oligonucleótidos. El ODN de detección está constituido por 16 nucleótidos. Las secuencias son las siguientes:

- Secuencia del oligonucleótido sonda (SEQ ID n° 3):

```
5' TCACTATTAT CTTGTATTAC TACTGCCCCT TCACCTTTC AGAGGAGC
TT TGCTGGTCCT TTCAAAGTG 3'
```

- Secuencia del oligonucleótido neutro (SEQ ID n° 4):

```
5' ACTGTTACTG ACCTACCATT TGTTACCTAT GCTAAGCTCA TTGCACCT
CT GATTGCCGAG GCCTTCTTT 3'
```

- Secuencia del oligonucleótido objetivo (SEQ ID n° 5):

```
5' ACAGCAGTAC AAATGGCAGT ATTCATCCAC AATTTTAAAA GAAAAGGG
GG GATTGGGGGG TACAGTGCAG GGGAAAGAAT AGTAGACATA ATAGCAAC
```

ES 2 317 081 T3

AG ACATACAAAC TAAAGAATTA CAAAAACCCCT TACAAAAATT CAAAATTT
TC GGGTTTATTA CAGGGACAGC AGAAATCCAC TTTGGAAAGG ACCAGCAA
5 AG CTCCTCTGGA AAGGTGAAGG GGCAGTAGTA ATACAAGATA ATAGTGAC
AT AAAAGTAGTG CCAAGAAGAA AAGCAAAGAT CATTAGGGAT TATGGAAA
AC AGATGGCAGG TGATGATTGT GTGGCAAGTA GACAGGATGA GATTAGAA
10 CA TGGAAAAGTT TAGTAAACA CCATATGTAT GTTTCAGGGA AAGCTAGG
GG TAGGTTTTAT AGACATCACT ATGAAAGCCC TCATCCAAGA ATAAGTTC
AG AAGTAAATCG AATTCCTCGCG GCCATGGCGG CCGGGAGCAT GCGACGTC
15 GG GCCCAATTCG CCC 3'

- Secuencia del oligonucleótido de detección (ODNd) (SEQ ID nº 6):

20 5' TTCTGAACTTATTCTT 3'

El rendimiento de esta etapa de coloración está incluso mal entendido, y varía según las condiciones experimentales, la química de superficie utilizada para la fabricación del chip de ADN, las partículas fluorescentes utilizadas, etc. Así, aunque se puedan contar las partículas individualmente, hace falta también, en los procedimientos de la técnica anterior, calibrar las mediciones para poder comparar los experimentos entre sí.

De ahí también el interés de la presente invención para este tipo de marcado, ya que permite ventajosamente no tener que realizar esta calibración.

El soporte que forma el chip en este ejemplo es una placa de microscopio, 25 x 75 mm. Para todas las operaciones, la placa de microscopio se sumerge en una pequeña copa que contiene la solución deseada. Las operaciones son las siguientes:

35 Se aplican a este soporte las etapas (i) a (iv) del párrafo 1.3.1 del ejemplo 1 anterior. A continuación:

(1) Inmovilización de los oligonucleótidos sonda y neutros citados anteriormente: Depósitos manuales, con micropipeta, de oligonucleótidos aminados a 10 μ M, en gotas de 3 μ l. El tamaño de los sitios es de aproximadamente 3 mm. Incubación en cámara húmeda durante una noche a temperatura ambiente.

40 Preparación de soluciones de los oligonucleótidos a depositar: la mezcla de 10 μ M de ODN de captura depositada contiene una mezcla de ODN patrón y no específico, en proporciones de 100% patrón, 1% patrón, 0,2% patrón, 0,1% patrón, 0,033% patrón y 100% molécula neutra (no específica) (es decir, una gama patrón realizada con 6 puntos). Estas 6 soluciones han sido depositadas manualmente.

45 (2) Tratamiento post-inmovilización. Reducción de los aldehídos todavía presentes: agua 30 ml NaBH₄ 105 mg/incubación 1 h a temperatura ambiente, sin agitación. Aclarado en agua 5 minutos, después con dodecil sulfato de sodio al 5% durante 5 minutos, después de nuevo en agua pura durante 5 minutos. Secado.

50 (3) Hibridación del chip y detección: los chips han sido hibridados con la molécula objetivo citada anteriormente de 513 bases (SEQ ID nº 5) a 100 nM durante 30 minutos a temperatura ambiente en TE NaCl 1M Triton 0,05%. Después estos chips han sido hibridados con una solución a 200 nM del oligonucleótido de detección a temperatura ambiente durante 1 hora, y después lavados. Este oligonucleótido ha sido marcado con la biotina. A continuación, la placa ha sido incubada con partículas fluorescentes de neutravidina de 100 nm de diámetro (Molecular Probes, T8861).

55 Hibridación: Todas las hibridaciones han sido realizadas a temperatura ambiente en TE 1X, NaCl 1 M, Triton X-100 0,05%. No hay agitación. La hibridación va seguida de 3 lavados en TE 1X, NaCl 1 M, Triton X-100 0,05%, después un lavado en TE 1X, NaCl 1 M. TE 1X significa: Tris 10 nM, EDTA 1 mM, pH 8.

60 (4) Revelado y lectura: la incubación de las partículas fluorescentes se realiza en TE NaCl 1M, a una concentración de 10⁶ partículas por μ l durante 3 h, a temperatura ambiente. Las partículas tienen un diámetro de 100 nanómetros.

65 (5) Extracción de resultados numéricos: cada sitio constituye una imagen al microscopio en cuanto a fluorescencia (cubo fluoresceína). Después se contabiliza la densidad de partículas en cada sitio, ya sea manualmente, o ya sea de forma automática con la ayuda de una rutina matlab (marca comercial). Los resultados entre estos dos métodos son coherentes.

ES 2 317 081 T3

Se obtiene una gama patrón utilizable. Está representada por el gráfico de la figura 5 anexa, en la que las ordenadas representan el número de partículas por $10000 \mu\text{m}^2$ y en la que las abscisas representan $P (\% \text{MSE}/(\text{MN}+\text{MSE}))$.

Utilizando, en lugar del marcador citado anteriormente, partículas fluorescentes Quantum Dot (marca comercial) de la sociedad Quantum Dot Corp., se puede llegar a obtener un rendimiento de marcado mucho mejor que el obtenido aquí mediante los látex fluorescentes.

Ejemplo 3

10 *Análisis de una muestra*

Se propone como ejemplo un chip sencillo dedicado a un primer cribado de pacientes que presentan una infección de las vías respiratorias superiores. El chip pretende, de manera más precisa, detectar la presencia de los virus RSV A y RSV B, responsables de la bronquialita, y de los virus Influenza A (Inf A) e Influenza B (Inf B), responsables de la gripe.

En todos los casos, se trata de virus de ARN, muy polimorfos; los síntomas son relativamente próximos, y estos virus pueden ser peligrosos tanto para los bebés, como para las personas de edad, como para todos los inmunodeprimidos de una manera general.

El chip que se utilizará será exactamente de la misma tecnología que la del ejemplo 1, con una química de funcionalización idéntica a la del ejemplo 2.

Los sitios (de análisis, así como los de la gama patrón) tienen un diámetro de $160 \mu\text{m}$ aproximadamente, y están dispuestos con un paso de $300 \mu\text{m}$. La figura 9 anexa representa esquemáticamente este chip conforme a la presente invención. Los sitios han sido representados como circulares.

Para los RSV A, RSV B, Inf A e Inf B, así como para el control “stain” (coloración) y revelado (T&R), es el mismo sitio que se ha repetido cinco veces.

Las moléculas en los sitios de control de “stain” y revelado (T&R) son un oligonucleótido idéntico a las moléculas MCE, ya marcadas, durante la fabricación de los oligonucleótidos, mediante una biotina.

El control positivo (C+) es una gama patrón en el sentido de la invención, en las proporciones de 100%, 10%, 1%, 0,1%, 0% (de izquierda a derecha).

El chip será utilizado de la manera siguiente:

a) El biólogo purifica los ARNs de las muestras según los métodos de la técnica.

b) Se mezcla con la muestra biológica, la molécula objetivo patrón marcada con la biotina durante la fabricación.

c) Se marca la muestra con la biotina, según una de las variantes del método LDC, que ha sido objeto de solicitudes de patentes depositadas por BioMerieux en las familias de patentes correspondientes a los documentos [13], [14], [15] ó [16] de la lista de referencia.

d) Se incuba el conjunto sobre el chip (etapa de hibridación), después se realizan los lavados, como para el ejemplo 1.

e) Se añade el conjugado enzimático estreptavidina/HRP, como en el ejemplo 1. En esta etapa, el conjugado se engancha a los analitos presentes en los sitios de análisis, así como a las moléculas MCE presentes sobre los sitios de la gama patrón, así como a las moléculas de los sitios del control “stain” y del revelado.

f) Se procede al revelado por luminiscencia como en el ejemplo 1.

Las secuencias de los oligonucleótidos MCE, neutro y MSE, son idénticas a las del ejemplo 1.

Lista de referencias

[1] François **GELI**, “Chips de ADN y otros sistemas de análisis”, Biofutur n° 206, El tecnoscopio de Biofutur, páginas 1-14, diciembre de 2000.

[2] **Cahill DJ, Nordhoff E.**, “Protein arrays and their role in proteomics”, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 2003, 83, 177-187.

[3] **Lopez MF, Pluskal MG**, “Protein micro- and macro-arrays: digitizing the proteome”, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2003, 787(1), 19-27.

ES 2 317 081 T3

[4] Documento EP-A-1119769.

[5] Documento FR-A-2784189.

5 [6] Documento WO-A-03/023061.

[7] Bar-coding biomolecules with fluorescent nanocrystals, *Nature Biotechnology*, 2001, 19, 621-622.

[8] Documento FR-A-2799281.

10

[9] Documento FR-A-2799282.

[10] Bertrand **Jordan**, “Viaje al país de los chips”, *medicina/ciencias*, 1998, 14, 1097-1102.

15

[11] **Troesch A.** y otros, “Mycobacterium species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe array”, *J. Clin. Microbiol.*, 1999, 37, 49-55.

[12] **Christen R.** y **Mabilat C.**, “Aplicaciones de los chips de ADN en bacteriología”, *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*, 1998, 13, 10-17.

20

[13] “Procedimiento de marcado de un ácido ribonucleico y fragmentos de ARN marcados así obtenidos”, documento FR 9807870 y sus extensiones a otros países (familia de patentes). Inventor: A. Laayoun.

25

[14] “Process for labelling a nucleic acid”, documento EP-A-1238116. Inventores: A. Banerjee, A. Laayoun, M. Becker, K. Browne, M. Friedenberg, F. Hajjar.

[15] “Process for labeling a nucleic acid and labeled RNA fragments which are obtained thereby”, WO-A-01/44506. Inventores: A. Laayoun, D. Do, C. Miyada.

30

[16] “Procedimiento de marcado y de fragmentación de ADN”, documento nº FR 0106039. Inventores: J. Lhome, E. Trevisiol, A. Laayoun, C. Bourget, M. Kotera, C. Tora.

[17] **SCHUCHHARDT J.** y otros, “Normalization strategies for CDNA microarrays”, *Nucleic Acids Research*, Oxford University Press, Surrey, GB, vol. 28, nº 10, 15 de mayo de 2000 (2000-05-15), páginas E471-E47V.

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Chip de análisis de al menos un analito presente en una muestra líquida, comprendiendo el citado chip:

5 a) al menos un sitio de análisis del citado al menos un analito, estando el citado sitio de análisis dispuesto sobre el chip de manera que permite el reconocimiento y la fijación específica del analito; y

10 b) una gama patrón (G), estando la citada gama patrón constituida por varios sitios patrón dispuestos, cada uno de ellos, sobre el citado chip de manera determinada e independientes unos de otros, incluyendo cada sitio patrón de esta gama, fijadas a su superficie y en una proporción determinada P diferente para cada sitio con relación a los otros sitios patrón de la citada gama: (i) al menos una molécula sonda patrón (MSE) que permite reconocer y fijarse específicamente a una molécula objetivo patrón (MCE) determinada, y (ii) al menos una molécula neutra (MN) incapaz de reconocer y fijarse a la citada molécula objetivo patrón, siendo tanto la molécula sonda patrón como la molécula

15 neutra incapaces ambas de reconocer y fijar dicho o dichos analitos; con $P = \frac{\text{número de MSE}}{\text{número de MSE} + \text{número de MN}}$ y $0 \leq P \leq 1$, siendo la suma de número de MSE + número de MN constante de un sitio patrón a otro.

2. Chip según la reivindicación 1, en el que el analito y la molécula objetivo patrón son de la misma naturaleza.

20 3. Chip según la reivindicación 2, en el que el analito y la molécula objetivo patrón son oligonucleótidos o anticuerpos.

4. Chip según la reivindicación 1, en el que la molécula sonda patrón, la molécula objetivo patrón y la molécula neutra son oligonucleótidos.

5. Chip según la reivindicación 1 ó 4, en el que el al menos un analito es un ácido nucleico, y en el que el al menos un sitio de análisis es un sitio funcionalizado mediante un ácido nucleico complementario de éste.

30 6. Chip según la reivindicación 1, en el que los sitios de la gama patrón están dispuestos sobre el chip de manera lineal y están ordenados en función de la proporción P de cada sitio.

7. Maletín de diagnóstico que comprende un chip según la reivindicación 1.

35 8. Maletín de análisis que comprende un chip según la reivindicación 1.

9. Utilización de un chip según la reivindicación 1, para seguir las variaciones de expresión de genes en las células o en tejidos *in vitro*.

40 10. Utilización de un chip según la reivindicación 1, en un procedimiento de genotipado *in vitro*.

11. Procedimiento de análisis *in vitro* de al menos un analito susceptible de estar presente en una muestra líquida, que comprende las etapas siguientes:

45 (α) opcionalmente, fijación sobre el analito de un primer medio de detección;

50 (β) adición a la muestra a analizar, que comprende el analito opcionalmente marcado, de una molécula objetivo patrón (MCE) sobre la que se ha fijado opcionalmente un segundo medio de detección, idéntico o diferente del primer medio de detección, permitiendo la citada MCE reconocer y fijarse específicamente a la molécula sonda patrón (MSE) de un chip de análisis según la reivindicación 1, siendo la citada MCE añadida a la citada muestra en una cantidad suficiente para saturar las MSE de la gama patrón (G) del citado chip, creando así una gama patrón función de la proporción determinada P que es diferente para cada sitio patrón;

55 (γ) puesta en contacto de la muestra a analizar, que comprende el analito y la MCE opcionalmente marcados, con el citado chip de análisis según la reivindicación 1 que comprende al menos un sitio de análisis del citado al menos un analito en condiciones físico-químicas tales que: por una parte, el analito a analizar, si está presente, sea fijado en su sitio de análisis sobre el chip; y por otra parte, la MCE reconozca específicamente la MSE y se fije a ésta en los diferentes sitios patrón de la gama patrón del chip;

60 (δ) determinación de una señal patrón emitida, en su caso merced al segundo medio de detección, por cada sitio patrón de la gama patrón, siendo la citada señal función de la cantidad de molécula objetivo patrón fijada a éste, y

65 (ϵ) determinación de una señal de análisis emitida, en su caso merced al primer medio de detección, por el citado al menos un sitio de análisis, y que es función de la cantidad de analito fijado mediante el sitio de análisis, y aproximación a las señales determinadas en la etapa (δ) para expresar esta señal de análisis en función de P.

12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que el analito y la molécula objetivo patrón son de la misma naturaleza.

ES 2 317 081 T3

13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que el analito y la molécula objetivo patrón son oligonucleótidos o anticuerpos.

5 14. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que la molécula sonda patrón, la molécula objetivo patrón y la molécula neutra, son oligonucleótidos.

10 15. Procedimientos según la reivindicación 11 ó 14, en el que el al menos un analito es un ácido nucleico, y en el que el al menos un sitio de análisis es un sitio funcionalizado por medio de un ácido nucleico complementario de este ácido nucleico.

16. Procedimiento según la reivindicación 11 ó 15, en el que el primer y el segundo medios de detección implican, respectivamente, un primer y un segundo marcadores.

15 17. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que el primer y el segundo marcadores se eligen independientemente en el grupo constituido por marcadores fluorescentes, marcadores radiactivos, marcadores enzimáticos, partículas de látex, cristales fotónicos, y oro coloidal.

20 18. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que la determinación de la señal de cada sitio de la gama patrón y/o de cada sitio de análisis, se realiza mediante un método elegido en el grupo que comprende las técnicas de detección por resonancia plasmónica de superficie, las técnicas de detección fototérmicas, las técnicas elipsométricas, y las técnicas de detección fotométricas.

25 19. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que el análisis es una detección o una dosificación.

30

35

40

45

50

55

60

65

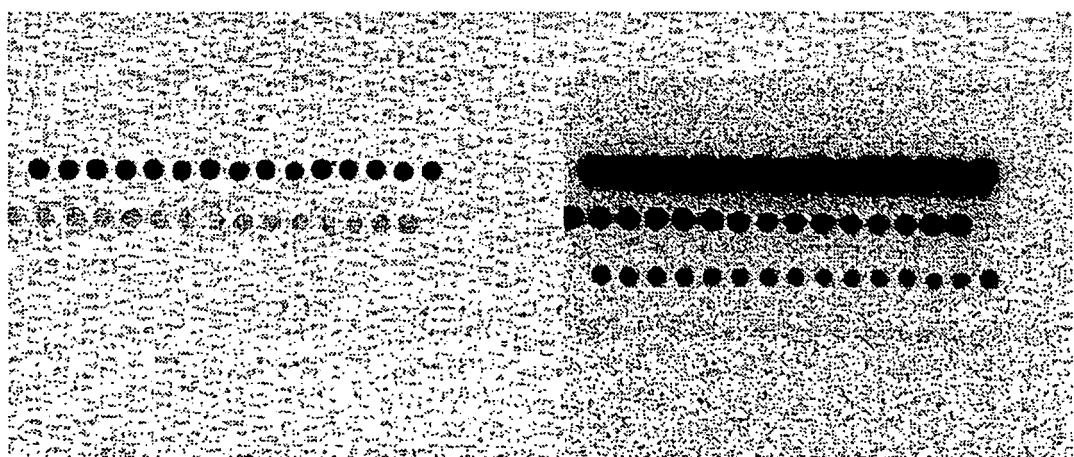
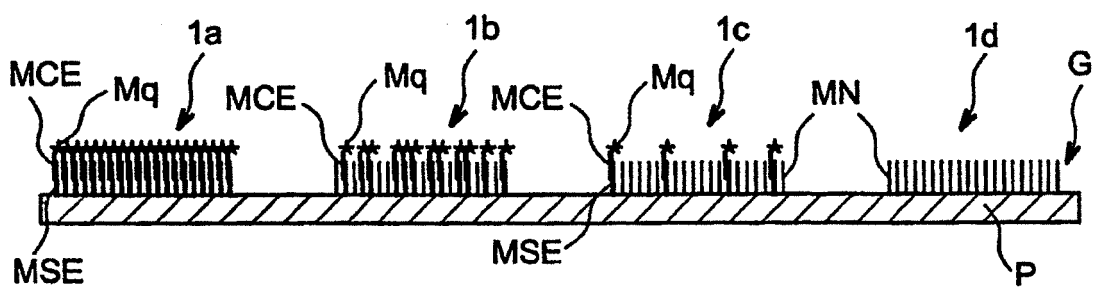
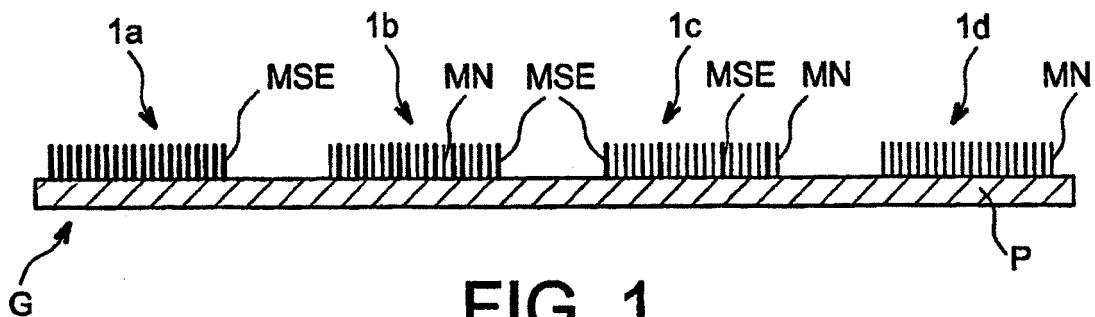


FIG. 3

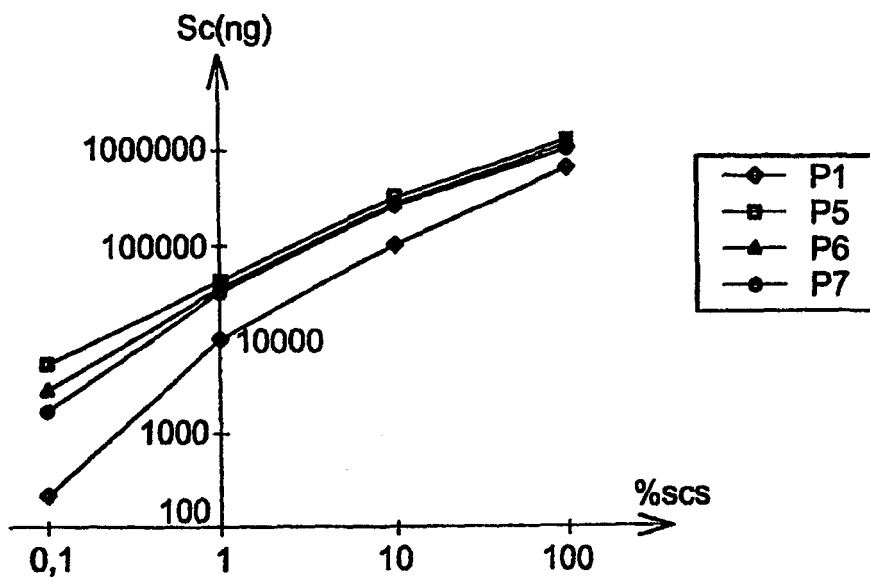


FIG. 4

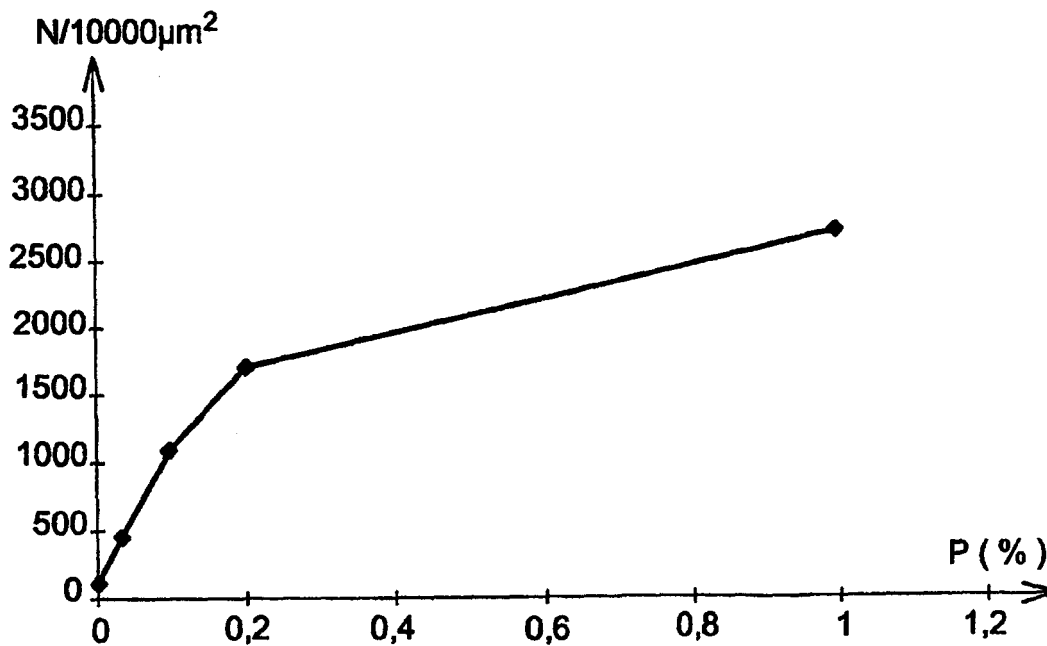


FIG. 5

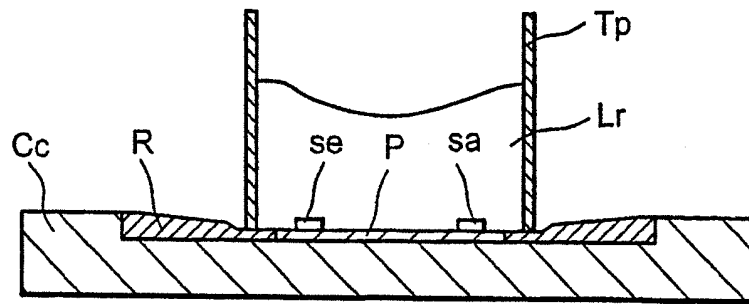


FIG. 6

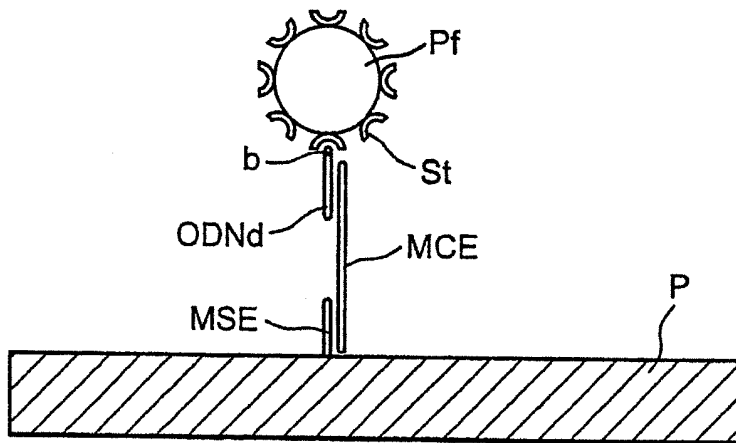
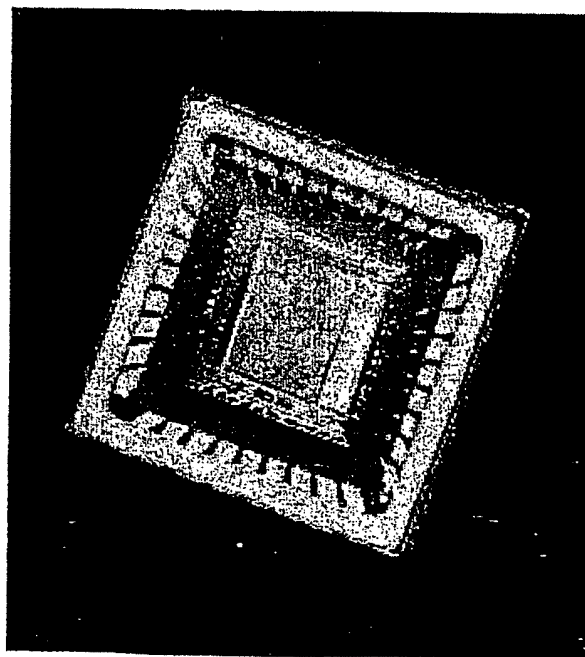


FIG. 7

FIG. 8



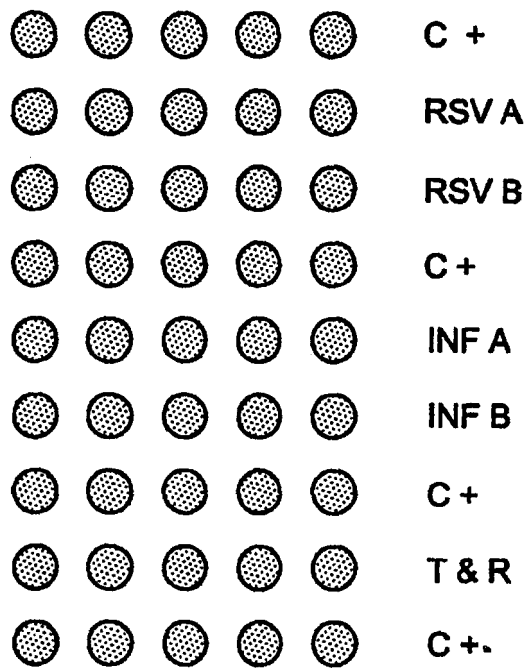


FIG. 9